

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO CELULAR Y MOLECULAR EN CULTIVOS DE
FIBROBLASTOS TRATADOS CON FÁRMACOS INDUCTORES
DE AGRANDAMIENTO GINGIVAL**



Doctorando: ALBERT RAMÍREZ RÁMIZ

Alumno del Programa de Doctorado:
ORGANOGENESIS Y ANATOMÍA CLÍNICA APLICADA
Bienio: 1995-1997

Departamento:
ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Tutor:
Prof. Dr. JESÚS COSTA VILA

Directores:
Prof. Dr. CARLES MENDIETA FITER
Prof. Dr. RICARDO E. PÉREZ TOMÁS
Prof. Dr. JAUME MIRANDA RIUS

DEDICATORIA

En reconocimiento a mis padres y a mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

-A los Profesores, Dr. Carles Mendieta Fiter, Dr. Jaume Miranda Rius, y Dr. Ricardo E Pérez-Tomás, directores de esta Tesis Doctoral que con su dedicación han sabido conducir este estudio interdisciplinario que relaciona la Farmacología, la Periodoncia y la Biología Celular.

-Al Prof. Dr. Jesús Costa, tutor del programa de doctorado, por su vinculación e interés.

-Al Master de Periodoncia y a su director el Prof. Dr. Carles Mendieta, por su aportación en el material de experimentación.

-Al Prof. Dr. Leonardo Berini Aytés de la Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona, por su buena predisposición durante las múltiples consultas de algunos aspectos relevantes del Estudio.

-A las Profesoras y técnicas de laboratorio del Departamento de Biología Celular: Wilmar Castillo-Avila, Elisabeth Costa, Vanessa Soto-Cerrato, Esther Llagostera, Marta Monge y Beatriz Montaner, por su dedicación en la parte práctica de este Trabajo.

-A la Prof. Dra. Pepita Giménez-Bonafé, del Departamento de Ciencias Fisiológicas II, por la supervisión técnica de la Tesis.

-A la Prof. Dra. Avelina Tortosa, del Departamento de Enfermería Fundamental, por sus indicaciones en el estudio estadístico.

-A la Prof. Dra. Montse Nacher, del Institut Municipal d'Investigació Mèdica, por sus consejos en el establecimiento de los cultivos primarios.

-A los Laboratorios Bayer, Pfizer y Novartis, en concreto a las Dras. Montse Manero y Pilar Oliva, por facilitarme los fármacos Nifedipina, Ciclosporina y Fenitoína que se han utilizado en el trabajo de la Tesis.

-Agradezco el soporte incondicional de mi esposa Aurelia y mis hijos Joaquim, Alvaro y Carmen, ya que les he robado muchas horas de nuestro tiempo de convivencia y estima, dedicadas a mi formación de doctorado.

-A la memoria de mis padres que supieron transmitirme un espíritu de lucha, tenacidad y fortaleza. A los dos les quiero expresar con este trabajo de Tesis Doctoral mi gratitud, y reconocer su apoyo a lo largo de mis años de formación universitaria.

Muchas gracias a todos.

--ÍNDICE--

A - JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	1
-Abreviaturas y sinónimos.....	6
B - ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	7
1- Anatomía del periodonto.....	9
1.1- La encía. Morfología.....	10
1.1.1- Vascularización e inervación de la encía	12
1.1.2- Histología de la encía.....	13
1.1.2.1- La Sustancia fundamental y sus componentes.....	18
1.1.2.2- Proteínas fibrosas	19
1.1.2.3- Proteínas estructurales.....	20
1.1.2.4- Elementos celulares de la encía.....	22
1.2- Ligamento periodontal	23
1.2.1- Vascularización e inervación del ligamento periodontal	25
1.2.2- Matriz extracelular del ligamento periodontal.....	25
1.2.3- Elementos celulares del ligamento periodontal	26
1.3- Cemento radicular	26
1.3.1- Características del cemento radicular	27
1.4- Hueso alveolar	28
1.5- Sistema linfático periodontal	29
1.6- Salud clínica.....	29
2- Inflamación gingival y respuesta adaptativa inmunitaria	31
2.1- Defensa inespecífica.....	31
2.1.1- Microbiota autóctona	31
2.1.2- Barrera mucosa y epitelio de unión.....	31
2.1.3- Inflamación	32
2.1.3.1- Sustancias humorales inespecíficas	35
2.1.3.2- Enzimas matriciales y de los patógenos.....	35
2.1.3.3- Prostaglandinas.....	37
2.1.3.4- Citocinas	39
2.2- Defensa específica	41

2.3- Características físico-químicas de los ecosistemas orales.....	44
2.4- Flora habitual autóctona	45
2.5- Factores virulentos bacterianos	47
2.6- Secuencia de la lesión gingival inflamatoria.....	48
3- El Agrandamiento gingival.....	51
3.1- Concepto y sinonimia	52
3.2- Clasificación del Agrandamiento gingival	53
3.2.1- Agrandamiento gingival inflamatorio.....	54
3.2.2- Agrandamiento gingival no inflamatorio.....	55
3.2.2.1- Agrandamiento gingival farmacológico.....	56
3.2.3- Agrandamiento gingival combinado	57
3.2.4- Agrandamiento gingival condicionado	57
3.2.5- Agrandamiento gingival neoplásico.....	59
3.2.6- Agrandamiento gingival asociado a erupción dentaria.....	62
4- El Agrandamiento gingival farmacológico.....	66
4.1- Historia del Agrandamiento gingival farmacológico	66
4.2- Estudio de los fármacos inductores de Agrandamiento gingival.....	68
4.2.1- Fenitoína	68
4.2.2- Antagonistas del calcio	72
4.2.2.1- Canales del calcio	73
4.2.3- Ciclosporina A.....	77
4.3- Epidemiología: Incidencia y Prevalencia del Agrandamiento gingival farmacológico. Factores de riesgo.....	81
4.3.1- Factores de riesgo del Agrandamiento gingival farmacológico..	85
4.3.1.1- Presentación del fármaco y dosificación. Presencia en los fluidos:.....	85
4.3.1.1.1- Relación del fármaco en el flujo gingival crevicular	91
4.3.1.1.2- Relación del fármaco en la saliva	92
4.3.1.2- Tiempo de exposición al tratamiento	92
4.3.1.3- Terapia combinada y substituciones.....	94
4.3.1.4- Variables demográficas: edad, sexo, raza, peso.....	98
4.3.1.5- Placa bacteriana y nivel de inflamación. Control de higiene oral	100
4.3.1.6- Factores genéticos	103

4.3.1.7- Otras variables: maloclusión, hábitos, iatrogenia, infecciones.....	104
4.4- Patogenia del Agrandamiento gingival farmacológico.....	107
4.4.1- Genotipos distintos de la población fibroblástica.....	108
4.4.2- Homeostasis del colágeno	109
4.4.3- Inflamación gingival inducida por la placa bacteriana. Respuesta inmune.....	113
4.4.4- Interacción con el metabolismo hormonal.....	117
4.4.5- Aumento de los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular	119
4.4.6- Factores de crecimiento y citocinas.....	122
4.4.7- Influencia del flujo del Calcio a través de la membrana celular	126
4.4.8- Depleción de ácido fólico.....	127
4.4.9- Influencia vírica	127
4.4.10- Alteraciones génicas.	128
4.5- Histopatología del Agrandamiento gingival farmacológico.....	129
4.5.1- Microscopía óptica y técnicas de inmunofluorescencia	129
4.5.2- Microscopía electrónica.....	134
4.6- Clínica, semiología. Diagnóstico y pronóstico del Agrandamiento gingival farmacológico.....	136
4.7- Índices de medida del Agrandamiento gingival.....	144
4.8- Prevención y tratamiento del Agrandamiento gingival farmacológico.....	150
4.8.1- Prevención del Agrandamiento gingival farmacológico.....	150
4.8.2- Tratamiento farmacológico.....	153
4.8.3- Intervención quirúrgica del Agrandamiento gingival.....	156
 C - HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	163
Hipótesis de trabajo	165
Objetivos	166
 D - DISEÑO DEL ESTUDIO.....	167
1- Transcripción génica, expresión del mRNA	170
2- Traducción proteica, expresión de la proteína	170
3- Colágeno: La proteína fundamental de la matriz extracelular	172

3.1- Síntesis y degradación del colágeno.....	172
4- Colagenasa: La principal metaloproteinasas	176
4.1- Estimuladores de la producción de colagenasa	176
4.2- Inhibidores de la biosíntesis de colagenasa	176
4.3- Modulación extracelular de la actividad de la colagenasa	177
5- TGF β , factor de crecimiento transformador β	178
E - MATERIAL Y MÉTODOS.....	181
1- Procesamiento de muestras de encía humana para el estudio histológico.....	183
1.1- Fijación, deshidratación, inclusión.....	183
1.2- Conformación del bloque y obtención de secciones	184
1.3- Montaje de los cortes y tinción con hematoxilina-eosina.....	185
2- Procedimiento de cultivos celulares	186
2.1- Cultivo primario de fibroblastos procedentes de encía humana.....	188
2.2- Subcultivo de células	189
2.3- Contaje celular	190
2.4- Proceso de congelación de células	190
2.5- Descongelación de la línea celular	191
2.6- Determinación de la viabilidad celular sometida a la inducción farmacológica.....	192
2.7- Técnica de extracción de proteínas.....	195
3- Electroforesis.	196
3.1- Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF	197
3.2- Western-Blot	199
4- Cuantificación de la expresión del mRNA de colágeno, TGF β y colagenasa mediante PCR a tiempo real (<i>Real Time-PCR</i>)	199
4.1- Preparación de las placas	200
4.2- Extracción del RNA	200
4.3- Cuantificación del RNA	201
4.4- Visualización de la calidad del RNA mediante gel de azarosa	201
4.5- Transcripción inversa -RT-	202
4.6- Control de la reacción de retrotranscripción.....	203
4.7- PCR cuantitativa RT-PCR	203
5- Análisis estadístico	205

F - RESULTADOS	207
1- Estudio histológico de muestras de encía humana.....	210
2- Establecimiento de cultivos primarios a partir de muestras de encía humana	214
3- Efecto de la fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la viabilidad celular de cultivos primarios obtenidos a partir de muestras de encía humana	216
3.1- Inducción de fenitoína en fibroblastos de encía sana	216
3.2- Inducción de nifedipina en fibroblastos de encía sana	218
3.3- Inducción de ciclosporina en fibroblastos de encía sana.....	220
3.4- Inducción de fenitoína en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival.....	221
3.5- Inducción de nifedipina en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival.....	223
3.6- Inducción de ciclosporina en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival.....	225
4- Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la viabilidad celular de la línea NIH3T3 de ratón	226
4.1- Inducción de fenitoína.....	226
4.2- Inducción de nifedipina.....	228
4.3- Inducción de ciclosporina	229
5- Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la transcripción del colágeno, del TGF β y de la colagenasa.....	230
6- Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la expresión del colágeno y del TGF β en los cultivos primarios.....	237
 G - DISCUSIÓN.....	 239
1- Morfología tisular en el análisis microscópico	241
2- Cultivos primarios de los fibroblastos	243
3- Proliferación de los fibroblastos y pruebas de viabilidad.....	246
4- La transcripción de TGF β , colágeno y colagenasa.....	251
5- La traducción del colágeno.....	254
 H - CONCLUSIONES.	 259
 I - BIBLIOGRAFÍA.....	 263

A-JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

El Agrandamiento gingival es un dismorfismo que afecta al periodonto y conceptualmente se podría definir como una alteración morfológica, congénita o adquirida de una parte o de la totalidad de la encía. Este sobrecrecimiento gingival se ha relacionado con diferentes factores aparte del farmacológico, tales como el inflamatorio -acumulación de placa bacteriana-, cambios hormonales, de origen neoplásico y de causa genético-hereditaria fundamentalmente.

El Agrandamiento gingival inducido por fármacos se ha relacionado básicamente con el antiepiléptico fenitoína. También en las últimas décadas se ha observado con la administración de otros fármacos tales como el inmunosupresor ciclosporina A y fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades cardio-vasculares como el grupo de los antagonistas de los canales del calcio -nifedipina, verapamil y diltiazem-. Sus características permiten distinguirlo de otros tipos de Agrandamiento gingival:

- Ha aumentado su prevalencia por haberse incrementado las necesidades terapéuticas de la población: en las enfermedades cardiovasculares, trasplantes y enfermedades inmuno-supresivas y en afectaciones neurológicas como la epilepsia.
- Está considerado como efecto adverso por tratarse de una inducción por fármacos.
- Es de causa externa por su relación a la administración del fármaco y de aparición temprana con respecto al inicio de la terapia.
- Podría ser predecible y el médico debería conocer los efectos adversos del fármaco y las alternativas de segunda elección de que dispone en el tratamiento individualizado del paciente.

En la actualidad se conoce el riesgo del Agrandamiento gingival que presenta un paciente tratado con fármacos inductores. Es por ello que el médico que prescribe este tipo de fármacos debe recomendar a sus pacientes un control específico de su salud gingival, ya que el

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

mantenimiento de una correcta higiene oral minimiza la manifestación y la severidad clínica de este dismorfismo. Muchas veces la imposibilidad de modificar la estrategia terapéutica reduciendo la dosis o substituyendo el fármaco -fase sistémica del tratamiento periodontal-, obliga a promover los aspectos preventivos -fase higiénica del tratamiento periodontal- que podrían ayudar a controlar dicha manifestación clínica, y en último lugar indicar su exéresis -fase quirúrgica del tratamiento periodontal-.

El control y tratamiento del dismorfismo gingival se plantea por las molestias clínicas que comporta para el paciente en cuanto a la salud, a la función y a la estética de la encía. Su presencia mantenida durante largo tiempo puede cronificar la lesión tisular y producir una pérdida de inserción dentaria con perjuicio del pronóstico periodontal.

Se comprueba que en los países occidentales donde el progreso y los recursos tecnológicos han permitido una esperanza de vida más larga, se observan de forma más prevalente los efectos adversos de tratamientos médicos a largo plazo.

La interpretación histológica del Agrandamiento gingival, a través de muchos estudios en los últimos años, ha permitido corregir las primeras observaciones y se ha establecido que este tipo de dismorfismo gingival no tiene como fundamento una hiperplasia ni una hipertrofia celular pura. La mayoría de investigadores han concluido a través de estudios de microscopía y técnicas de inmunofluorescencia que el fundamento patológico de esta alteración de la encía está esencialmente establecido en la matriz extracelular por incremento de las fibras colágenas y sustancia fundamental amorfa - glicosaminoglicanos- dependientes en su homeostasis de los fibroblastos -Lucas y cols.1985, Bonnaure-Mallet y cols.1995, Sakamoto y cols.2002-. Por este motivo parece más apropiado catalogarlo con la denominación clínica de "Agrandamiento Gingival".

Se realizará una revisión de las características generales de este proceso de sobrecrecimiento gingival que aparece con una alta prevalencia en la población que está sometida a la administración de estos fármacos.

Se establecerá una metodología de trabajo para estudiar *in vitro* el

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

comportamiento de un cultivo primario de fibroblastos sometidos a la acción de los fármacos inductores -fenitoína, nifedipina y ciclosporina- y observar sus efectos. Los fibroblastos proceden de una encía agrandada de un paciente tratado con ciclosporina, y otro origen es el de una encía normal correspondiente a un paciente sin antecedentes de haber sido tratado con ningún agente conocido capaz de provocar Agrandamiento gingival.

Al valorar los resultados se discutirán con los obtenidos por otros autores y se aportarán las conclusiones del estudio *in vitro*.

El desarrollo de la tesis se centrará en el Agrandamiento gingival inducido por fármacos a partir de:

1. Una observación y examen a microscopía óptica de las características estructurales histopatológicas y diferenciales de ambas muestras de encía.
2. Se estudiará la capacidad proliferativa de los fibroblastos, procedentes de los 2 tipos de encías, en cultivos primarios bajo la acción de los 3 fármacos inductores por separado a distintas condiciones. Se comprobará si los fibroblastos procedentes de las muestras de encía aumentan su número -hiperplasia de la población celular- o modifican su forma -hipertrofia de los fibroblastos- como posibles causas del agrandamiento gingival farmacológico-.
3. Se realizará un estudio de transcripción génica por el método de la "reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real" del RNA de las proteínas más influyentes en la patogenia del agrandamiento gingival como son el colágeno, el factor de crecimiento transformador β y la colagenasa.
4. Se observará la traducción proteica del colágeno como proteína más representativa de la matriz extracelular.

La motivación de esta tesis experimental está en determinar la patogenia del agrandamiento gingival farmacológico en unas condiciones *in vitro* y confrontar los hallazgos con los observados en publicaciones y revisiones científicas de otros autores. También se observarán las características microscópicas de la morfología tisular de las muestras y comprobar su semejanza con el patrón descriptivo histopatológico del Agrandamiento gingival.

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Las condiciones metodológicas en laboratorio tienen sus limitaciones extrapolables al ser vivo -ver Discusión- y ante los resultados que se obtengan conviene ser prudente en las conclusiones.

-Abreviaturas-

La lista de abreviaturas que se expone corresponde a los conceptos más importantes y empleados con mayor frecuencia en el estudio. Hay otros que no están en esta lista pero aparecen en el texto con su equivalencia en abreviatura a continuación, a pie de figura o de página. Estas abreviaturas son las observadas en la mayoría de artículos de la literatura revisados aunque no son invariables y para el lenguaje y comprensión de la tesis me han parecido aceptables.

AG:	agrandamiento gingival
AGIF:	agrandamiento gingival inducido por fármacos
Cs:	ciclosporina
DNA:	ácido desoxiribonucleico
EGF:	factor de crecimiento epidermoide
GAG:	glicosaminoglicanos
MMP:	enzima metaloproteinasas de la matriz
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
Nf:	nifedipina
PHT:	fenitoína
PMN:	leucocitos polimorfonucleares
RT-PCR:	...reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
TGFβ:	factor de crecimiento transformadorβ

-Sinónimos

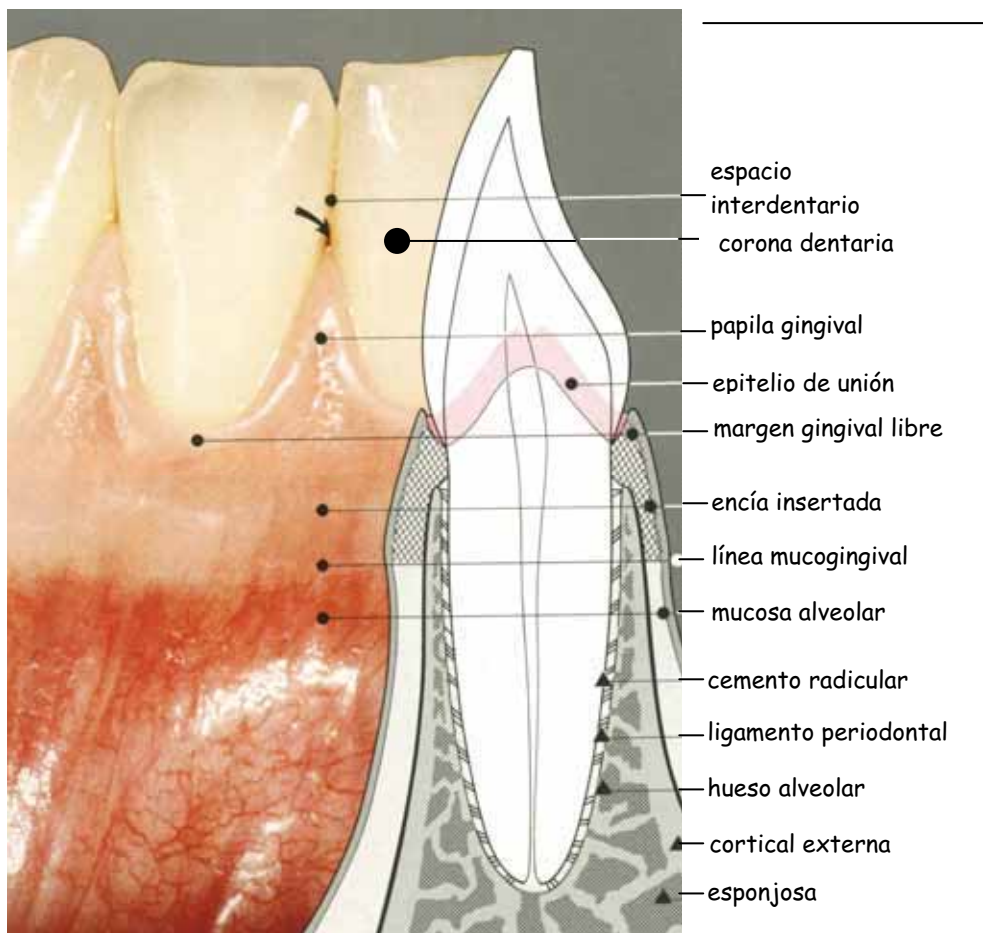
Agrandamiento gingival	~	Sobrecrecimiento g.	~	Lesión exuberante g.
Bloqueadores de los canales del calcio	~	Calcio-antagonistas		
Fibroblastos "responder"	~	F reactivos	~	F de alta actividad
"non responder"	~	F no "	~	F de baja "
Glicosaminoglicanos	~	Proteoglicanos	~	Mucopolisacaridos
Interdigitaciones epiteliales	~	Rete pegs		
MMP-1	~	colagenasa 1,	MMP-3	~ estromelysina

B-ESTADO DE LA CUESTIÓN

1-ANATOMÍA DEL PERIODONTO

El periodonto es el conjunto de estructuras tisulares que protegen y soportan los dientes por lo que también se conoce como aparato de inserción. Está formado por la encía, el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal -Lindhe y cols.2005- -figura 1,1-.

El periodonto de protección/inserción forma una unidad funcional y evolutiva durante las diferentes etapas de la vida. Su formación se produce simultáneamente a la formación de los dientes a partir de las células mesenquimatosas del primer arco branquial procedentes de la cresta neural -Lindhe y cols.2005-.

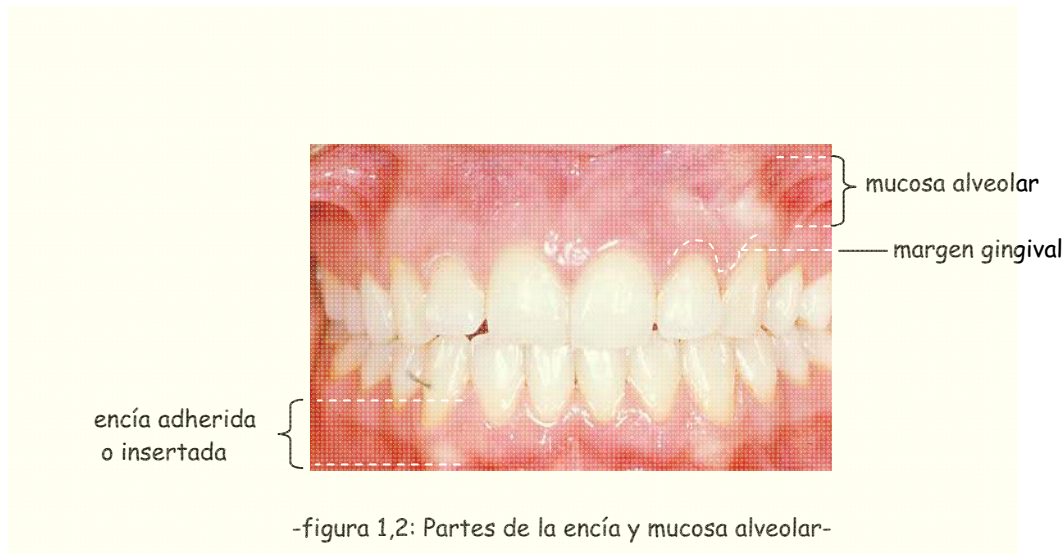


-figura 1,1: Sección de periodonto y sus elementos constitutivos. Modificado de Rateitschak y Wolf1991-

1.1-La encía. Morfología

Es la mucosa bucal que protege y cubre por continuidad los procesos alveolares donde están insertados los dientes. Su disposición firme y festoneada alrededor de las coronas dentarias es consecuencia del soporte fibroso conectivo y por el hueso que la compone.

Se pueden distinguir 3 partes -figuras 1,1 y 1,2-:



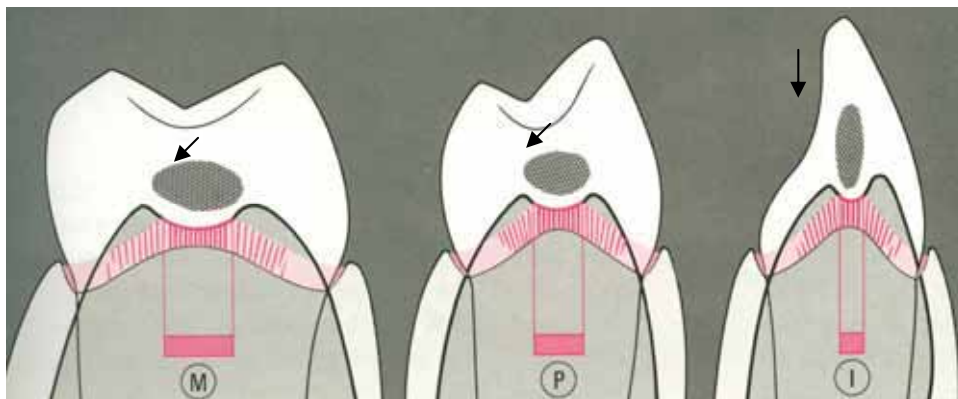
- A. Margen gingival o Encía libre marginal. Es la porción de encía más coronal separada del diente por el surco gingival y el epitelio de unión. Cubre o solapa las caras libres de los dientes: bucal, lingual o palatina.

El surco gingival es el espacio que hay alrededor de la corona del diente, limitado por el esmalte de la corona y por el epitelio del surco y de base el epitelio de unión o adherencia epitelial. La profundidad de este surco es un parámetro importante para el diagnóstico de la enfermedad periodontal si supera su sondaje los 2-3 mm que mide en estado de salud. Durante la exploración la sonda periodontal penetra el epitelio de unión hasta llegar a la inserción conectiva.

- B. Encía adherida o insertada. Corresponde a la franja de encía más apical, desde la base del margen gingival -donde se corresponde con el punto de la inserción conectiva del diente- hasta el límite con la mucosa alveolar -línea

mucogingival-. La anchura puede variar según la zona de la boca.

- C. Encía interdental. Es la que se sitúa en los espacios interdentarios o interproximales adaptándose a la forma y dimensiones que tienen. Se distingue la papila gingival que es la encía triangular que ocupa todo el espacio de separación entre 2 dientes contiguos por debajo del punto de contacto y es la primera en afectarse por sobrecrecimiento -ver 3-El Agrandamiento gingival-. En molares y premolares la anchura de las coronas permite unas superficies de contacto dentario que provoca el desdoblamiento de la papila gingival en lingual y bucal separadas por una depresión denominada col -figura 1,3-.



-figura 1,3: Encía interdental en aspecto interproximal en incisivo -I-, premolar -P- y molar -M-. Modificada de Rateitschak y Wolf 1991-

La función de la encía es de protección estructural -frente a traumatismos de la masticación- y defensiva -por la acción que realiza la saliva en la superficie al actuar como lubricante con la descamación de las células epiteliales. El flujo crevicular y el epitelio de unión aportan inmunoglobulinas y células inflamatorias frente a los microorganismos presentes en el surco gingival.

1.1.1-Vascularización e inervación de la encía.

La vascularización corre a cargo de vasos sanguíneos supraparióísticos que son ramas terminales de diversas arterias (a) de la zona:

Encía inferior:

- Zona posterior---bucal: a bucal -rama de la a maxilar interna-
ramas perforantes de la a dentaria inferior
- Zona anterior---bucal: a mentoniana
ramas perforantes de la a incisiva

encía lingual: a lingual -rama de la a carótida externa-
ramas perforantes de la a dentaria inferior

-Berkovitz y cols.1977-

Encía superior:

- Zona posterior---bucal: a bucal
ramas gingival y perforante de la a alveolar
posterior superior
- Zona anterior---bucal: ramas labiales de a infraorbitaria
ramas perforantes de a alveolar anterior superior

encía palatina: ramas de a palatina mayor

-Berkovitz y cols.1977-

La inervación de la encía varía también si se considera la arcada superior o inferior y la vertiente bucal, lingual y palatina -tabla I y II-:

• **Maxilar:**

	zona anterior	zona posterior
encía palatina	-n nasopalatino	-n palatino mayor
encía bucal	-n infraorbitario	-n alveolar supero- posterior -n. bucal

-tabla I: Inervación de la encía del maxilar superior, n:nervio -Berkovitz y cols.1977-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- **Mandíbula:**

	zona anterior	zona posterior
encía lingual	-n lingual -ramas perforantes n dentario inferior	-n lingual -ramas perforantes n dentario inferior
encía bucal	-n mentoniano	-n bucal -ramas perforantes n dentario inferior

-tabla II: Inervación de la encía de la mandíbula, n:nervio. -Berkovitz y cols.1977-

Estos nervios proceden de los troncos correspondientes a la segunda y tercera rama del trigémino.

La encía interdientaria está inervada por prolongaciones de plexos nerviosos que proceden del ligamento periodontal y ramificaciones supracrestales.

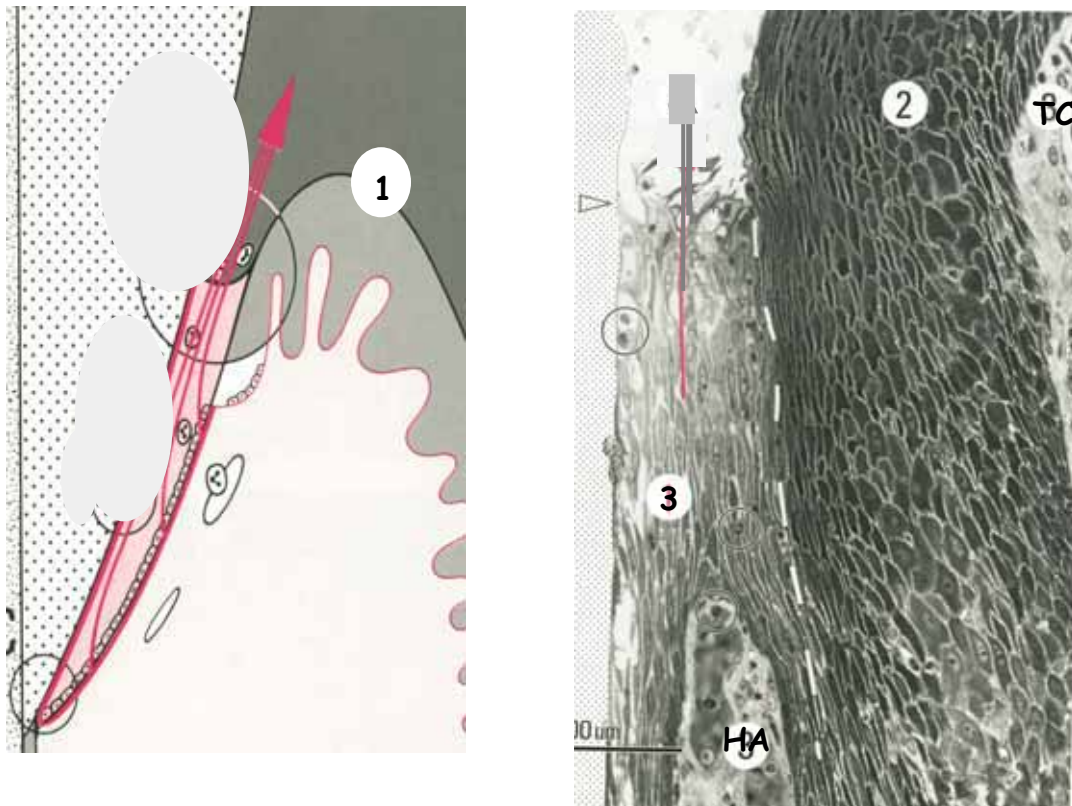
1.1.2-Histología de la encía.

Se compone de un epitelio, con diferentes características según la zona anatómica, y de un tejido conectivo. Se distinguen -figura 1,4-:

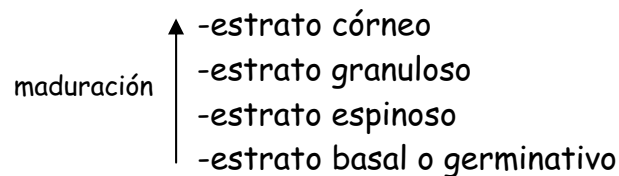
1. -epitelio gingival que se continúa con el epitelio oral -bucal-.
2. -epitelio del surco gingival.
3. -epitelio de unión o adherencia epitelial. -Lindhe y cols.2005-

1. El epitelio gingival cubre la superficie del margen gingival desde la cresta hasta la línea mucogingival, límite de la encía insertada. Es escamoso, estratificado y queratinizado. Su composición es en capas celulares evolutivas de maduración desde la membrana o lámina basal -límite con el tejido conectivo- hasta la superficie córnea desde la que se descaman las células y se sustituyen por las inmediatas inferiores -granulosas-. La queratinización es un proceso de diferenciación para la función y no de degeneración. El límite con el tejido conectivo es festoneado y se prolonga

en su interior formando crestas epiteliales.

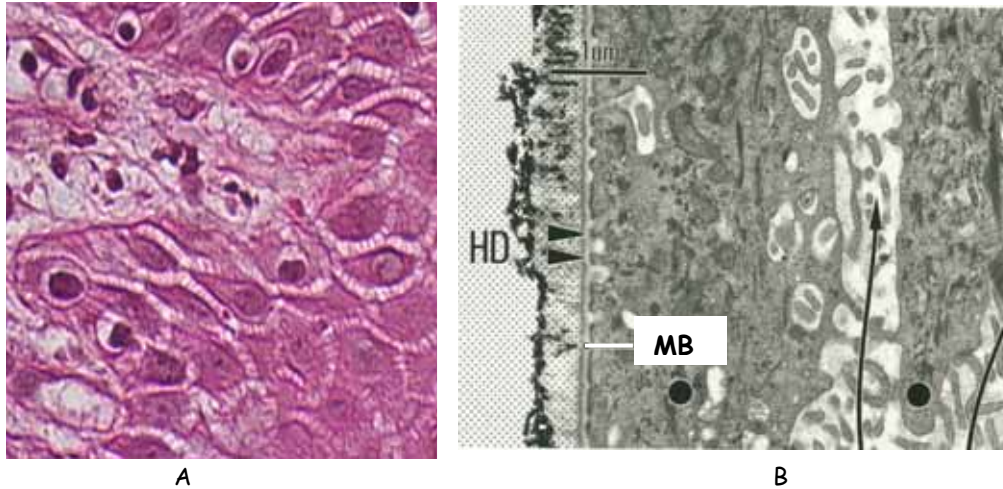


-figura 1,4: Se observan los diferentes tipos de epitelio: 1-Epitelio gingival, 2-Epitelio del surco, 3-Epitelio de unión. TC: tejido conectivo, HA: hueso alveolar. Modificado de Rateitschak y Wolf 1991 -



La diferencia de este epitelio con el de la piel está en la carencia del estrato lúcido que se sitúa entre el granuloso y el córneo. La distinción entre epitelios estratificados se centra en la morfología celular de la capa más superficial: el estrato córneo -Berkovitz y cols.1977, Gartner y Hiatt 1997-. Si permanecen los núcleos celulares en el estrato córneo el epitelio puede no estar queratinizado o bien estar paraqueratinizado y los gránulos de queratohialina no aparecen en el estrato granuloso en ninguno de los dos casos.

El epitelio gingival en los espacios interdentarios posteriores también está libre de queratinización en la zona correspondiente al col.



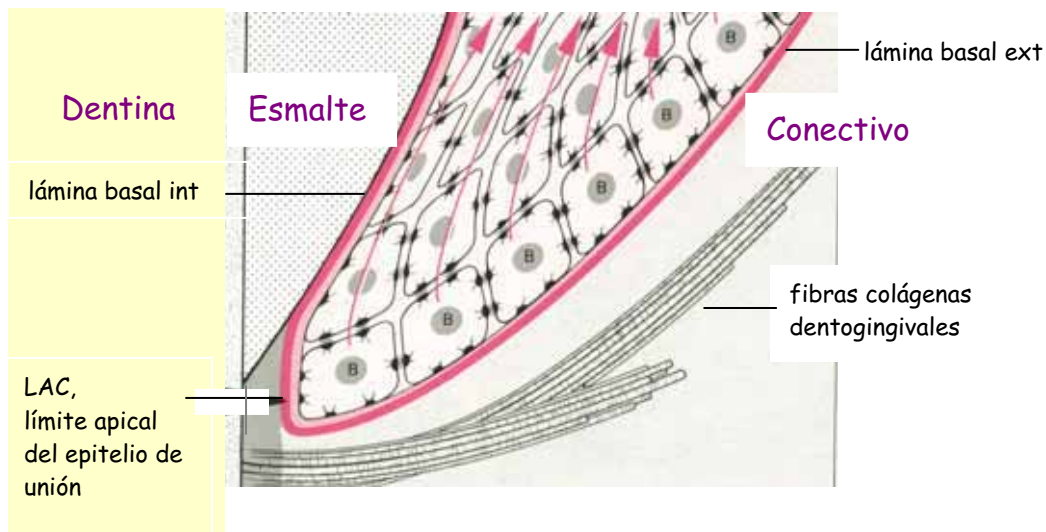
-figura 1,5: Imagen de la composición de la membrana basal y las estructuras de unión y anclaje. A-Aspecto original a microscopía óptica de una zona de la membrana basal a unos 600 aumentos. B-Imagen al microscopio electrónico, se aprecia la unión de la membrana basal -MB- a las estructuras contiguas: a la superficie radicular mediante hemidesmosomas -HD- y a las células del epitelio de unión. Obsérvese la distinción de las 2 capas de la MB: las láminas lúcida y densa. Las flechas largas muestran los espacios intercelulares epiteliales. B, modificada de Rateitschak y Wolf 1991-

La membrana basal presenta a su vez 2 capas: una en contacto con las células basales -lámina lúcida- permeable a los electrones a diferencia de la otra que es la lámina densa adyacente al tejido conectivo. La característica principal es la observación de zonas de unión electrodensas entre las células epiteliales basales y la lámina lúcida llamadas hemidesmosomas. A estas estructuras convergen los tonofilamentos citoplasmáticos de estas células para fijarse a la membrana basal. Interesa citar otras estructuras de anclaje observadas también a microscopía electrónica que son fibras conectivas que emergen de la lámina densa -Lindhe y cols.2005- -figura 1,5 B-.

2. El epitelio del surco gingival tapiza el surco gingival desde el punto más coronal del epitelio de unión hasta la cresta. Es escamoso estratificado no queratinizado. No presenta crestas epiteliales profundas.

3. El epitelio de unión es también un epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Junto con el sulcular tienen un recambio más rápido que el resto de los epitelios -unos 5 días-. Adherido al esmalte por una lámina basal en la que su zona electrodensa está en contacto con el esmalte y la

zona electrolúcida presenta los hemidesmosomas -figura 1,5 B-. Adyacente a la línea amelo cementaria, en la superficie radicular, se une también al cemento. El refuerzo de unión de la encía al diente está en las fibras gingivales que proceden del margen gingival -unión dento-gingival-. Las células que están más cercanas al esmalte -suprabasales- no están unidas directamente a su superficie y presentan una estructura de interfase muy similar a la membrana basal: zona electrolúcida, electrodensa y hemidesmosomas hacia el esmalte -figura 1,6-.



-figura 1,6: Esquema de la morfología del epitelio de unión con el esmalte.
Obsérvense las 2 capas de la membrana basal. LAC: línea amelo-cementaria.
Modificado de Rateitschak y Wolf 1991-

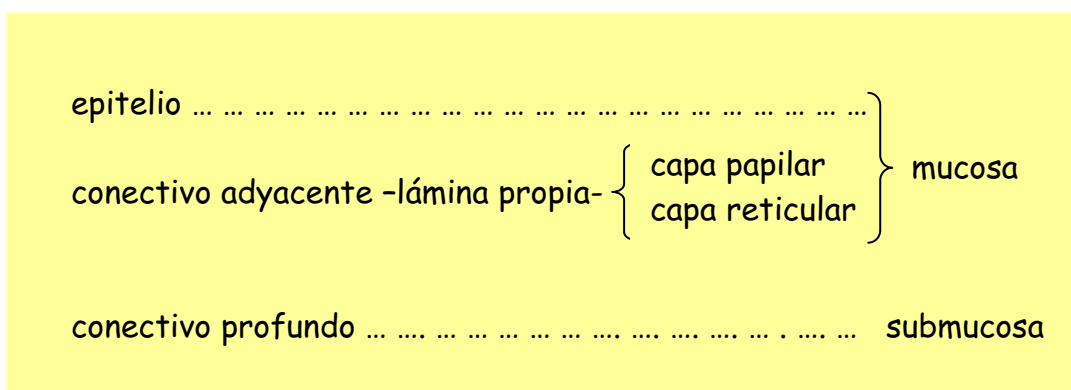
Las células del epitelio son:

- Queratinocitos. De la capa basal a la granular aumentan los tonofilamentos y los desmosomas y disminuyen las organelas.
- No queratinocíticas -células claras- hasta un 10% de las células del epitelio oral. Se mencionan:
 - células de Langerhans -presentadoras de antígenos, para la respuesta inmunitaria temprana-.
 - receptores táctiles de Merkel. Presentan desmosomas en sus uniones-.
 - melanocitos. Sintetizan el pigmento melanina.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

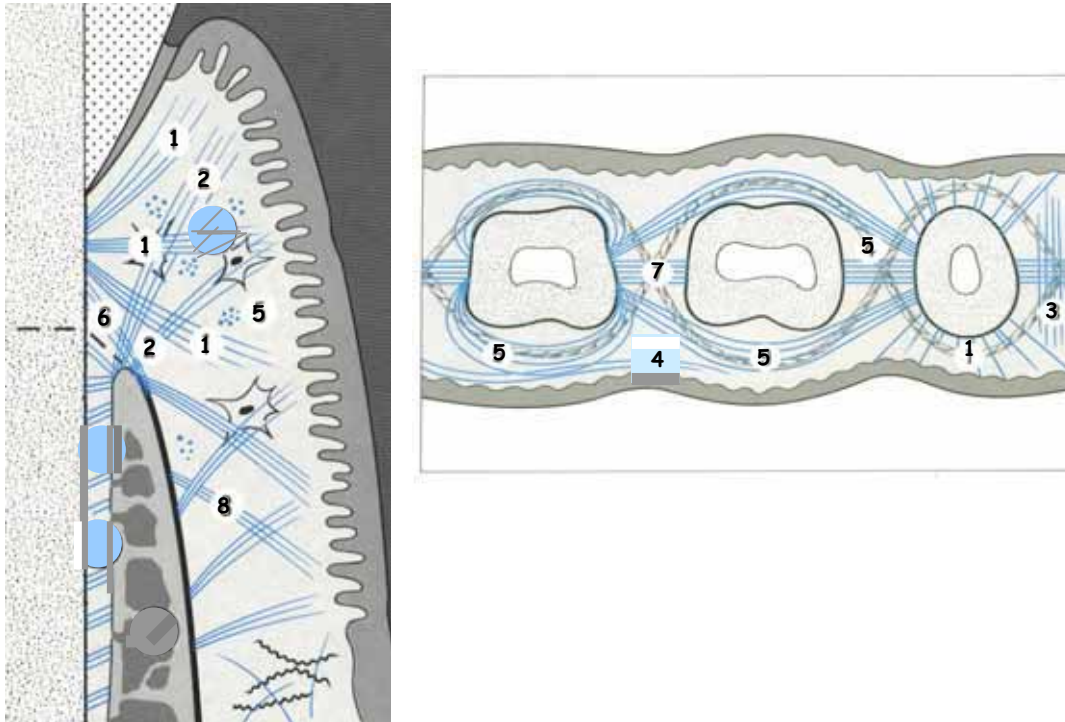
El tejido conectivo de la encía adherido al epitelio por la lámina basal se conoce con el nombre de lámina propia. Por debajo de ésta se sitúa un conectivo más laxo donde aparecen depósitos de lípidos, glándulas, vasos y nervios. Es difícil distinguir el límite entre ambos segmentos conectivos.

Se distinguen 2 capas en la lámina propia: una más superficial o papilar que se presenta como proyecciones conectivas -papilas conectivas- entre las crestas epiteliales que se interdigitan con ellas, las fibras colágenas son finas con acúmulos de poca densidad. La capa profunda o reticular es rica en haces de fibras colágenas más gruesos y organizados.



Las fibras colágenas en su función de adosar y mantener firme la encía alrededor del diente y del hueso alveolar proporcionan una resistencia y defensa de las fuerzas masticatorias y se conocen como fibras gingivales. Los principales grupos se disponen formando distintas direcciones -figura 1,7-:

- dentogingivales*. Por encima de la cresta alveolar, desde el cemento radicular hacia el conectivo de la encía -1-.
- alveologingivales*. Unen la cresta alveolar con la lámina propia de la encía -2-.
- interdentales* o *interpapilares*. Conectan las papilas bucal y lingual -3-.
- longitudinales* -*inter* y *transgingivales*-. De larga longitud dispuestas en la encía marginal -4-.
- circulares*. Rodean los dientes en la encía marginal y por el espacio interdental, coronales a las fibras transeptales -5-.
- dentoperiostales*. De la superficie radicular al periostio -6-.
- transeptales*. Son horizontales y unen dientes vecinos por encima de la cresta -7-.
- periostiogingivales*. Del periostio a la encía -8-.



-figura 1,7: Disposición de los principales grupos de fibras gingivales alrededor de los dientes. Modificado de Rateitschak y Wolf 1991-

1.1.2.1-La Sustancia fundamental y sus componentes.

La matriz extracelular conectiva es rica en sustancia amorfa fundamental - sustancia basal- y presenta condensaciones de ácido hialurónico, mucopolisacáridos y glicosaminoglicanos (GAG). En su interior aparecen las fibras proteicas como un elemento constitutivo importante sintetizadas esencialmente por los fibroblastos que son las células típicas conectivas - Berkovitz y cols.1977-. Su capa pericelular próxima a la superficie es muy diversa en sus características según la función a realizar, en general es la zona de matriz intersticial más fibrosa. Las macromoléculas de GAG y las proteínas estructurales forman una sustancia basal gelificada al incorporar agua en su constitución. Esta incorporación acuosa se debe a la carga negativa de estos mucopolisacáridos por la presencia en su composición de grupos carboxilo y sulfato. Los GAG están unidos a proteínas ya desde su síntesis con enlaces covalentes a diferencia del ácido hialurónico. Este tiene otras características particulares que lo diferencian del resto de GAG:

- Síntesis directa desde la membrana plasmática y no en el aparato de Golgi,

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- -no está sulfatado,
- -es un mucopolisacárido libre y si se une a proteínas no es con enlace covalente, constituyendo agregados de proteoglicanos.

Los *GAG* inician su composición en el retículo endoplasmático rugoso a partir de la síntesis de la proteína de base. La sulfatación y otros cambios moleculares se producen en el complejo de Golgi. Se citan como importantes:

-dermatán sulfato, -heparina, -heparina-sulfato, -queratano-sulfato, -condroitín 4-sulfato, -condroitín 6-sulfato.

La asociación de *GAG* con ácido hialurónico requiere la presencia de proteínas de unión para estabilizar la macromolécula de proteoglicano.

1.1.2.2-Proteínas fibrosas.

El colágeno y elastina forman una red de fibras diseminada en la sustancia basal en relación con *GAG* y los elementos celulares.

El primero es una proteína hidrofóbica del que se conocen unos once tipos distintos pero en la encía aparecen el I, III, IV y V -tabla III-.

Su molécula se compone de tres cadenas polipeptídicas con secuencias más repetidas de 3 aminoácidos: glicina, prolina y tirosina -Ver más detalles en D-Diseño del estudio-.

Colágeno I	+común encías, tendones, huesos, lig periodontal
Colágeno III	participan las fibras reticulares, lig periodontal
Colágeno IV	integra la membrana basal
Colágeno V	relación con tipo I,

-tabla III: Tipos de colágeno en la encía-

La elastina es otra proteína fibrosa fundamental que concede al tejido la propiedad de la flexibilidad y elasticidad. En su composición predominan, como en el colágeno, los aminoácidos tirosina, glicina y prolina, pero no la forma hidroxilada de estos últimos. El entrecruzamiento molecular de los monómeros -tropoelastina- se produce en el exterior celular. Es hidrofóbica por el predominio de grupos no polares. Las fibras elásticas suelen asociarse

a la red vascular y aparecen en el conectivo de la mucosa alveolar. Se ha comprobado que la lámina propia rica en fibras elásticas induce a la formación superficial de epitelio no queratinizado en cambio la que no presenta estas fibras -encía- favorece la expresión genética de epitelio queratinizado -Lindhe y cols.2005-.

1.1.2.3-Proteínas estructurales.

Se conocen también como moléculas de adhesión por su interacción entre la matriz y las superficies celulares mediante la unión a otros componentes matriciales -Ver 2-Inflamación-. Las más importantes son la fibronectina y la laminina.

La primera es una glicoproteína de elevado peso molecular con tres tipos de secuencias de aminoácidos repetidas, con 2 cadenas polipeptídicas unidas covalentemente por puentes disulfuro cerca del extremo carboxilo. Su depósito en la matriz es como fibrillas largas e insolubles. Se sintetiza también por células animales en cultivo y puede actuar como proteína de adhesión entre células y sustratos por eso se han objetivado dominios específicos de unión con la secuencia de aminoácidos: arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)¹. Por esta capacidad de adhesión puede inducir la migración de muchos tipos celulares y participar en la reparación y cicatrización de heridas, con la organización del depósito de la matriz -Smith y Wood 1997-.

La laminina es la proteína no colagénica principal de las membranas basales. Presenta 2 tipos de subunidades unidas mediante puentes disulfuro. Al microscopio electrónico se observa una estructura en forma de cruz por la disposición cruzada de sus cadenas. Su función específica está en promover la adhesión e interacción de las células epiteliales a componentes de la membrana basal -otras proteínas- o al mismo colágeno IV de la lámina densa. La unión a GAG es variable según la clase: la unión más fuerte se produce con heparina y la más débil con ácido hialurónico y condroitín-4-sulfato.

La adhesión focal -placas de adhesión o contactos focales- así como la agregación y la extensión de las células en cultivo promovida por las macromoléculas de la matriz, se pone en evidencia al microscopio electrónico por áreas engrosadas de la superficie celular. Son centros de unión similares a uniones celulares adherentes con la característica de

¹ RGD: R=Arg=arginina, G=Gly=glicina, D=Asp=ácido aspártico

haber microfilamentos en forma de haces -fibras de tensión- que se extienden hasta el núcleo y están formados por actina y constituir una manifestación del citoesqueleto celular.

Otras proteínas estructurales que se conocen son la tromboespondina, el factor de von Willebrand y la condronectina. La primera es una glicoproteína sintetizada y secretada por los fibroblastos especialmente, se incorpora a la matriz extracelular. Es capaz de unirse al fibrinógeno, a la laminina, a la heparina, a la fibronectina y al colágeno tipo V. Posee tres cadenas polipeptídicas unidas transversalmente por puentes disulfuro. Las regiones terminales participan en la agregación plaquetaria. La adhesión celular se establece por secuencias de aminoácidos RGD con receptores específicos de la membrana celular.

Una de las familias de receptores de membrana es la integrina formada en general por 2 cadenas de polipéptidos: α -grande- y β -más pequeña-. Es capaz de unirse a proteínas estructurales en centros de adhesión de fibroblastos y otros tipos celulares.

Se considera que existe una relación recíproca y dinámica entre el fenotipo celular y la composición de la matriz extracelular. Esta es capaz de controlar la forma celular y su metabolismo a través de los receptores de la matriz en la membrana con el citoesqueleto por cambios en la expresión proteica a nivel post-transcripcional y post-traducciona -ver transcripción génica y traducción proteica en D-Diseño del Estudio-, y también esta interacción del citoesqueleto con los receptores de membrana son necesarios para el depósito y las características de la matriz extracelular -Smith y Wood 1997-. Se ha comprobado que la duración y el nivel de estrés sometido al tejido en las fibras colágenas y los GAG es percibido por el fibroblasto en su superficie citoesquelética que regulará la producción de estos componentes de la matriz para adaptarse a la función tanto en las proporciones como en el tipo de colágeno -Nimni y Harkness 1988-.

La fibronectina y otras proteínas estructurales de la matriz -condronectina y laminina-, son capaces de participar en la quimiotaxis del fibroblasto al penetrar en el interior celular ya que esta propiedad depende de la organización del citoesqueleto y está asociada a la presencia de esta proteína en interacción con la actina -Miller 1988, Nimni y Harkness 1988-.



-figura 1,8: Imagen a microscopía electrónica de la morfología de un fibroblasto. Tomada de Lindhe y cols.2005-

1.1.2.4-Elementos celulares de la encía.

Se distinguen las células fijas de las transitorias. Las primeras son las representativas y predominantes del tejido: los fibroblastos. Son células fusiformes, alargadas con prolongaciones citoplasmáticas que les dan un aspecto estrellado. Presentan un núcleo ovoide de color oscuro de gran tamaño, granuloso y un nucleolo muy definido -figura 1,8-. Están distribuidos por el tejido conectivo entre los haces de fibras y en la matriz extracelular que sintetizan y secretan en la mayoría de sus componentes. Se pueden distinguir fibroblastos jóvenes -que son más activos en sus procesos de síntesis y degradación- con gran desarrollo de su retículo endoplásmico rugoso y de su aparato de Golgi y los elementos maduros que se denominan fibrocitos -figura 1,9-.

Los miofibroblastos son fibroblastos con características de células del músculo liso. A la microscopía óptica no se distinguen las diferencias pero en la observación a ultraestructura los miofibroblastos poseen filamentos de actina y cuerpos densos semejantes a los de las células del músculo liso - Gartner y Hiatt 1997- -ver 4.5-Histopatología-.



-figura 1,9: Imagen original de fibroblastos de encía humana en cultivo primario, correspondiente al experimento de la tesis -

Las células transitorias corresponden a células inflamatorias o inmunes y su presencia y proporción varían según la patología y estado tisular. En los tejidos periodontales se encuentran: mastocitos, linfocitos y células plasmáticas.

1.2-Ligamento periodontal

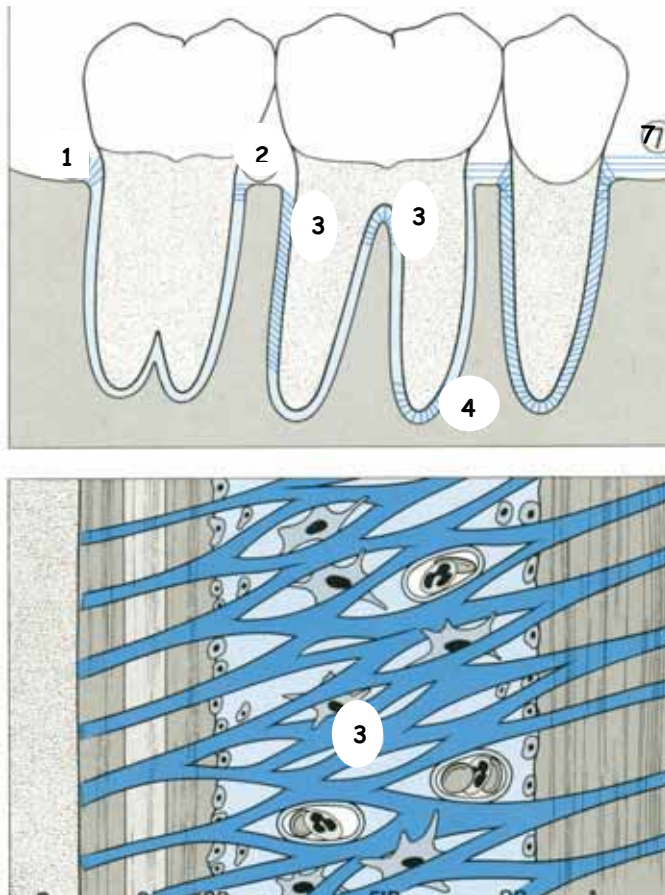
Está formado por fibras conectivas que unen la raíz dentaria al hueso alveolar para fijar el diente al hueso y amortiguar las fuerzas que actúan sobre la corona. En la proximidad del hueso alveolar y del cemento radicular se denominan fibras de Sharpey que se entrecruzan en el centro del espacio periodontal. Se distinguen diferentes grupos:

Hay unas principales de colágeno -figura 1,10-

- *crestales o supracrestales*: unen el cemento a la cresta alveolar y se sitúan por debajo del epitelio de unión -1-.
- *horizontales*: se extienden desde el hueso alveolar hasta el cemento -2-.
- *oblicuas*: las más numerosas, unen también el hueso alveolar y el cemento radicular -3-.
- *apicales*: desde el cemento al fondo del alveolo -4-.

Las secundarias agrupan fibras de colágeno que completan los haces fibrosos, fibras de elastina y de oxitalán. Estas últimas se distribuyen

paralelas al eje axial del diente.



-figura 1,10: Esquema de la disposición de las fibras conectivas del ligamento periodontal. -7- Corresponde a las fibras transeptales según figura 1,7. Modificado de Rateitschak y Wolf 1991-

Todo este conjunto fibroso deja una malla densa de colágeno con unas funciones específicas:

1. Mecánicas: -unión del diente al hueso.
-transmisión de las fuerzas de oclusión al hueso.
-amortiguación y resistencia de estas fuerzas.
-protección de las estructuras vásculo-nerviosas.
2. Formativas: -permite la posición funcional del diente mediante la erupción, sostén y movimiento. Existe una remodelación continua entre procesos de resorción y formación.

3. Reparativas: -capacidad de reparación del hueso alveolar y del cemento.
4. Nutritiva y sensorial: -aporte de nutrientes por la vascularización al hueso alveolar, al cemento y a la encía. La inervación por los mecanorreceptores mantiene una sensibilidad propioceptiva y táctil que autocontrola la masticación por un mecanismo neuromuscular.

1.2.1-Vascularización e inervación del ligamento periodontal.

La red vascular procede de las arterias alveolares superior e inferior correspondientes que forman un plexo vascular. También participan vasos gingivales a través del periostio que son ramas de las arterias lingual y palatina. Otra vía distinta es a través de las paredes alveolares por arterias perforantes de los septos alveolares.

Las venas no acompañan a las arterias. Perforan las paredes alveolares formando una red intraalveolar con anastómosis de venas gingivales -Berkovitz y cols.1977-.

La inervación es rica en fibras nerviosas sensitivas que transmiten estímulos de presión, tacto y dolor. Estas aferencias se conducen por ramificaciones periodontales hacia el nervio dentario así como ramificaciones laterales por la pared ósea al nervio intraalveolar. El tronco nervioso es el trigeminal que transfiere las sensaciones hacia centros neurológicos superiores.

1.2.2-Matriz extracelular del ligamento periodontal.

Su composición es similar a la correspondiente de la encía, con una cantidad importante cercana a un 60% en los haces de fibras de colágeno. Las funciones también son comunes: control de la síntesis y orientación de las fibras de colágeno y captación e intercambio de agua e iones; pero la diferencia está en su participación en el mecanismo de erupción del diente. Al parecer la presión del líquido intercelular -unos 10 mmHg mayor que la presión atmosférica- actuaría como presión hidrostática de la vascularización para la fuerza eruptiva del diente y en su capacidad de sostén. Según la función que realice o las circunstancias ambientales la composición de proteoglicanos puede variar -en la erupción del diente

umenta de forma significativa el nivel de un proteoglicano híbrido formado por condroitín sulfato y dermatán sulfato-. Todos los componentes de la sustancia amorfa también son secretados en su mayoría por los fibroblastos residentes -Berkovitz y cols.1977-.

1.2.3-Elementos celulares del ligamento periodontal.

Las células representativas son los fibroblastos. Estos al igual que los que se localizan en la encía tienen una alta capacidad de síntesis y metabolismo proteico, con una diferencia en su estructura y relación: la presencia de cilios que al parecer intervienen en el control del ciclo celular y contactos intercelulares del tipo de desmosoma simple -Berkovitz y cols.1977-.

También forman esta población celular los elementos celulares que se hallan en las superficies del cemento y del hueso: cementoblastos, cementoclastos, osteoblastos y osteoclastos. Todas ellas procedentes de un tronco celular común aunque con funciones distintas de síntesis y degradación. También se pueden observar acúmulos de células epiteliales que corresponden a los restos epiteliales de Malassez, vestigios de la vaina radicular de Hertwig durante el desarrollo del diente. Los fibroblastos del ligamento periodontal presentan algunas diferencias con respecto a los cementoblastos: un retículo endoplásmico y aparato de Golgi más desarrollados con mayor capacidad para sintetizar colágeno, en cambio presentan menor densidad y volumen de partículas de glucógeno en su citoplasma -Yamasaki y cols.1987b-.

Se pueden observar también células transitorias: macrófagos, mastocitos, eosinófilos,...

1.3-Cemento radicular

Es una capa calcificada que cubre la totalidad de la superficie de la dentina radicular. Su origen embriológico está en la capa que reviste el folículo dental. Por su dureza se parece al hueso pero no contiene vasos sanguíneos ni inervación. Su grosor no es uniforme: a nivel apical o en zonas de furcaciones es máximo -50-200µm- y mínimo en el área cervical -10-50µm-. Su formación es continua e indefinida con una capa no calcificada o precemento y unas fibras de Sharpey que se refijan continuamente. Su

función principal es el soporte del diente y la participación en la reparación de lesiones de la raíz con el mantenimiento de su longitud. Sufre reabsorción pero con mayor dificultad que con el hueso -Berkovitz y cols.1977-.

Se distinguen 2 tipos de cemento:

- Acelular o primario: formado antes de la erupción completa del diente. Se halla en los 2/3 cervicales del diente y no contiene células.
- Celular o secundario: se forma posteriormente, más irregular y se sitúa en el área más apical del diente. Presenta células en lagunas -cementocitos- que están intercomunicadas.

Las fibras colágenas que se observan son las de Sharpey -fibras extrínsecas- que corresponden a la inserción de las fibras del ligamento periodontal en el cemento y que son sintetizadas por los fibroblastos periodontales y unas fibras colágenas intrínsecas en la matriz del cemento y que a su vez son sintetizadas por los cementoblastos que también producen la sustancia fundamental glicoproteica.

1.3.1- Características del cemento radicular.

De menor dureza que la dentina y una permeabilidad que disminuye con la edad. El cemento celular es más permeable aunque debido al menor grosor cervical y con la frecuencia de recesión gingival se produce una eliminación por la abrasión al exponerse la raíz al medio oral por lo que es la dentina la que queda al ambiente directo de la boca.

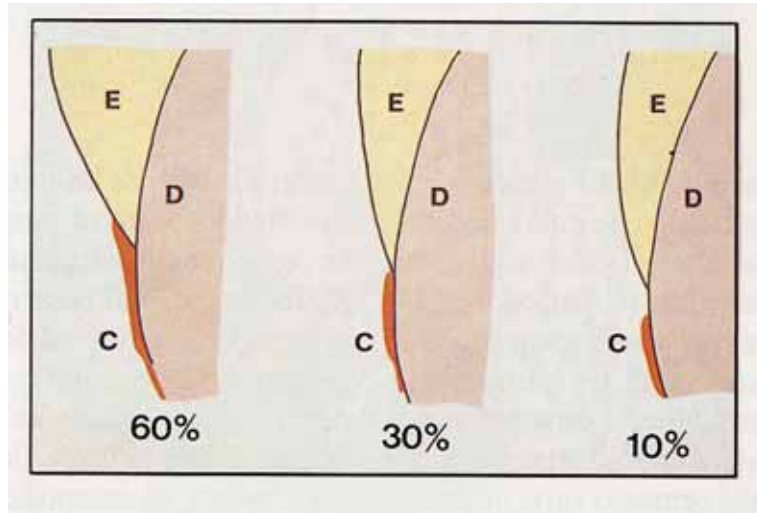
Existe en su composición una gran presencia de sustancia inorgánica en cuanto a peso y volumen al comparar con la sustancia orgánica. Hay zonas calcificadas en forma de hidroxapatita que varían según el punto que se considere. No presenta alternancia de aposición-reabsorción como ocurre con el hueso.

La sustancia orgánica presenta un colágeno tipo I.

El límite del cemento con el esmalte a nivel cervical en la línea amelocementaria está definido de tres maneras distintas -figura 1,11-:

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- unión borde a borde ~ 30% casos
- el cemento cubre al esmalte en una franja ~ 60-65% casos
- separación entre el esmalte y el cemento con exposición de dentina ~ 5-10% casos



-figura 1,11: Esquema de los distintos tipos de terminación en la relación entre el esmalte y el cemento. E: Esmalte, D: Dentina, C: Cemento. Tomado de Berkovitz y cols.1977-

1.4-Hueso alveolar

Se distinguen el hueso alveolar o fasciculado que forma el alveolo y con una zona de inserción de las fibras colágenas del ligamento periodontal -fibras de Sharpey- y el hueso de la apófisis alveolar que no se considera parte del aparato de inserción específico.

Alrededor de las fibras de Sharpey se observa hueso calcificado. Está formado por esponjosa o hueso trabeculado y dos corticales o hueso compacto en su límite periférico: la interna adyacente a las fibras del ligamento periodontal hacia medial y la externa limitada por el periostio y el conectivo de la encía, lateralmente. La cortical interna está perforada por numerosos conductos de Volkmann que permiten el paso de vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas hacia el ligamento periodontal.

El nivel de la cresta alveolar con respecto al diente se sitúa a 1 mm apical a la línea amelocementaria.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

El hueso de soporte alveolar es denso laminar con sistemas de Havers. La esponjosa es rica en células -osteoblastos y osteoclastos- procedentes del endostio con capacidad de formación y resorción indicativas de actividad ósea.

La aportación sanguínea depende de vasos procedentes de arterias alveolares superior e inferior. Se sitúan a través del septo interdentario acompañadas de venas, linfáticos y nervios. Hay anastomosis con ramas que atraviesan la lámina cribiforme que proceden desde el ligamento periodontal a través de las arteriolas dentarias que son derivaciones de las arterias alveolares.

1.5-Sistema linfático periodontal

Los capilares linfáticos se distribuyen en forma de red por todo el tejido conectivo. La linfa se absorbe en el estroma tisular y circula desde los capilares a los vasos linfáticos de mayor calibre. Llega a los ganglios linfáticos donde se filtra y afluyen linfocitos antes de entrar en la circulación sanguínea -tabla IV-.

GL SUBMENTONIANOS	GL SUBMANDIBULARES	GL CERVICALES PROFUNDOS	GL YUGULO DIGASTRICO
-Encía bucal-lingual de incisivos inf	-Encía bucal max sup -Encía bucal-lingual de prem-mol inf	-Encía palatina	
-Periodontos incisivos inf	-Periodontos restantes		-Periodontos 3º molares

-tabla IV: Distribución de drenaje linfático en las distintas zonas gingivales y periodontos
-Lindhe y cols.2005-

1.6-Salud clínica

Antes de exponer la patología del periodonto es importante establecer el criterio de salud periodontal. Conviene admitir que el límite entre encía sana y patológica es difícil de precisar y con rigor habría que aceptar una ausencia total de inflamación a un nivel de microscopía óptica -encía teórica sana-. Aunque en la práctica sí se pueden aceptar unas condiciones de

salud con algún elemento inflamatorio y se puedan distinguir con claridad de signos patológicos y servir como criterio de definición de salud clínica del periodonto.

A la inspección clínica hay que observar un color de encía rosa pálido que destaca con respecto al rojo intenso de la mucosa alveolar. Puede haber variabilidad si hay pigmentación melánica por influencia racial o geográfica o por la circulación sanguínea gingival.

La forma y el tamaño han de estar reflejados en el perfil festoneado constante de la encía marginal en contacto con el diente, con la papila gingival triangular bien delimitada en el espacio interdentario. El vértice de la papila es un punto gingival y el más coronal de toda la encía. El punto más apical de la encía marginal está situado en la cara libre del diente a nivel de la línea amelocementaria. Este margen gingival ha de ser fino y acabado en filo de cuchillo contra el diente.

Con la exploración se podrá apreciar la inmovilidad de la encía al movilizar la mucosa alveolar, los labios o las mejillas. Se aprecia que la encía está adherida y de aspecto queratinizado. Se comprueba a la palpación con un instrumento que la consistencia es fuerte y bien adaptada a los tejidos duros subyacentes y es resistente al intentar separar el margen gingival del diente.

Mediante el sondaje se comprueba que el surco gingival está libre en la entrada sin existir restos alimentarios, cálculo ni placa bacteriana. Hay cierta resistencia al sondar con una profundidad de sondaje inferior a 3 milímetros y sin sangrado ni supuración -Löe y cols.1993-.

2-INFLAMACIÓN GINGIVAL Y RESPUESTA ADAPTATIVA INMUNITARIA

El agrandamiento gingival inducido por fármacos, como otros tipos de agrandamientos gingivales, es un sobrecrecimiento que va asociado a algún proceso inflamatorio que perpetua el dismorfismo y en ocasiones lo agudiza. Aunque se describe la defensa innata y la adaptativa o específica por separado, sus mecanismos están interrelacionados con la participación de los microorganismos de la cavidad oral y sus toxinas que condicionan en muchos casos las diferentes respuestas defensivas.

2.1-Defensa inespecífica

La inflamación es el proceso básico de defensa del organismo ante una agresión. Se caracteriza por ser innata. En esta resistencia inespecífica se asocian distintos factores que actúan de forma simultánea: moleculares, estructurales, procesos funcionales, ambientales y de predisposición genética. Todos en conjunto formarían las primeras líneas de defensa y se citan a continuación en sus características más importantes -Casal y Liébana 1995-: población microbiológica propia, barreras físicas de la mucosa y adherencia epitelial, características del proceso inflamatorio.

2.1.1-Microbiota autóctona.

Los microorganismos de la flora habitual de la mucosa oral son capaces de secretar sustancias protectoras -citocinas- frente a patógenos potenciales. Al ocupar los receptores celulares evitan la acción de los patógenos. Alteran las condiciones físico-químicas del medio ya sea en el interior de los tejidos o en el surco gingival y estimulan factores inmunitarios.

2.1.2-Barrera mucosa y epitelio de unión.

La mucosa de revestimiento de la cavidad oral en su integridad asegura una primera resistencia al agente agresor. Sus células epiteliales se descaman regularmente. Además la superficie está reforzada por la acción de la saliva en sus propiedades protectoras y lubricantes. Existe un flujo salival continuo que permite una acción mecánica de limpieza -tabla V-. Con la

masticación y la deglución se favorece el arrastre y el flujo de los microorganismos.

El epitelio de unión proporciona un sellado alrededor de la superficie dentaria en su adherencia mediante hemidesmosomas y cubriendo la inserción conectiva del diente al hueso alveolar. En su composición se encuentran las células de Langerhans, presentadoras de antígenos, junto con los macrófagos en el estroma conectivo -ver 1-Anatomía-. El surco gingival constituye la primera línea de defensa donde siempre aparecen leucocitos polimorfonucleares (PMN) y el flujo crevicular que permite la eliminación de patógenos y sus productos. Al ser un líquido que procede de la circulación, después de atravesar el tejido gingival, aporta muchos componentes -albúmina, glucoproteínas, inmunoglobulinas, complemento, iones, citocinas y marcadores patogénicos-.

- sistema tampón: bicarbonato-ácido carbónico
- factores de coagulación: VIII, IX, X, XII
- lisozima
- lactoferrina
- lactoperoxidasa
- glucoproteínas
- calcio y fosfato
- Inmunoglobulinas: IgA, IgG, IgM
- Complemento

-tabla V: Composición de la saliva-

2.1.3-Inflamación.

Es un proceso de reacción complejo que puede presentar en algunas circunstancias una respuesta más intensa en relación con la causa producida y tener una repercusión negativa. Se distingue aguda y crónica según la rapidez de la respuesta y el tiempo que se mantiene frente a la noxa.

Se establecen 2 fases de defensa -Del-Nero y cols.1998-:

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- **Vascular.** Es exudativa y el objetivo está en acercarse, identificar y destruir al agente agresor que en la mayoría de ocasiones es un microorganismo y en eliminar también los restos biológicos no viables consecuencia de la invasión y de la defensa.
- **Reconstructiva.** La finalidad está en la reparación y restauración de la lesión producida.

Esta respuesta está condicionada por 2 factores:

- Naturaleza del agente agresor: químico
físico
biológico -microorganismos-
- Capacidad y calidad de defensa del hospedador

Las causas agresoras que provocan la inflamación del tejido gingival se distinguen en las categorías ya mencionadas con especial incidencia de las biológicas, por los microorganismos de la placa bacteriana. Su presencia en el surco gingival facilita la formación de nichos ecológicos con riqueza y variedad de colonias. Según las características físico-químicas del surco y el grado de oxigenación se establecen diferentes biofilms con respuestas inflamatorias tisulares por la presencia e invasión inter e intracelular de algunos microorganismos patógenos.

Se inician cambios en el plexo vascular con dilatación de los capilares en la red terminal. La presión hidrostática aumentada permite una permeabilidad microvascular más acentuada con extravasación de células -leucocitos-, líquido plasmático y proteínas -de defensa, como anticuerpos, complemento-. En estos cambios producidos en arteriolas, capilares y vénulas intervienen también la histamina, prostaglandinas (PGs) -figura 2,1-, factor activador plaquetario (FAP), cininas, etc -tabla VI-.

En esta fase los PMN neutrófilos y los monocitos se acercan a las paredes del vaso -marginación- y se adhieren al endotelio por unión de receptores entre las superficies -celular y endotelial-.

La adherencia a la pared del vaso permite la emigración y quimiotaxis al espacio extravascular hacia el foco por acción de factores bacterianos solubles, leucotrienos (LT) -figura 2,1-, complemento, citocinas -interleucina 1 (IL1), factor necrosis tumoral (TNF)-, y adhesinas -entre ellas interesa citar las moléculas de adhesión intercelular y de adhesión leucocitaria

ESTADO DE LA CUESTIÓN

endotelial-. Su función estaría en facilitar la extravasación de los leucocitos y la defensa contra los microorganismos en el epitelio de unión conjuntamente con factores quimiotácticos -Kinane y cols.2005-. La fibronectina, como proteína de adhesión, atrae las adhesinas bacterianas o enmascara receptores específicos para evitar la colonización tisular -ver 1-Anatomía-.

En el foco de agresión, los PMN se concentran y tienen propiedades de desplazamiento en los tejidos -diapédesis-. Se activan con capacidad de fagocitosis para la eliminación de la noxa y de los detritus tisulares en el proceso de defensa que requiere un reconocimiento del patógeno facilitado por las opsoninas -anticuerpos, complemento- con adhesión a diferentes estructuras, ingestión y digestión.

Los monocitos tienen una gran capacidad de fagocitosis y se transforman en macrófagos en cuanto maduran y proceden de la circulación vascular. Se activan por los productos resultantes de la fagocitosis de los PMN neutrófilos, citocinas, productos bacterianos,... Si se integran en el tejido se conocen como histiocitos. También secretan enzimas, citocinas -IL1-, mediadores de la inflamación -PGs, LT....- -tabla VI-.

<p><u>Mastocitos y leucocitos basófilos.</u> Liberan los mediadores inflamatorios vasoactivos -histamina, heparina, PG, LT y tromboxanos-.</p> <p><u>Plaquetas,</u> en la coagulación.</p> <p><u>Leucocitos.</u> Con defensa innata, no específica y <u>linfocitos</u> con defensa adquirida, específica y con memoria.</p> <p><u>Células presentadoras de antígenos:</u> Langerhans, dendríticas y macrófagos. Presentan los antígenos a los linfocitos para identificarlos.</p> <p><u>Citocinas</u></p> <p><u>Constituyentes de los lisosomas y radicales derivados del oxígeno.</u></p> <p><u>FAP</u></p>	<p><u>Moléculas de fase aguda.</u> Complemento, proteína C reactiva, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinógeno, albúmina, transferrina, α-antitripsina, α-macroglobulina, proteína amiloide A sérica.</p> <p><u>Sistema de las cininas.</u> La lesión focal con el calcio iónico activan el FXII de la coagulación y éste en cascada: precalicreína, calicreína, bradikinógeno y bradisinina, que provoca dolor y atracción de leucocitos.</p> <p><u>Proceso de coagulación.</u> Se inicia con el sistema de cininas mediante calcio y FXII con participación de las plaquetas.</p> <p><u>Sistema fibrinolítico.</u> La calicreína activa la plasmina para disgregar la fibrina del coágulo e iniciar la reparación del tejido.</p>
--	---

-tabla VI: Mediadores de la inflamación y células inflamatorias-

La inflamación aguda evoluciona hacia la curación en cuanto se elimina la causa y se inicia el proceso de cicatrización o regeneración. En caso contrario se puede producir un absceso por persistencia o virulencia de la noxa o bien el establecimiento de una inflamación crónica. En esta situación predominan los macrófagos en el infiltrado inflamatorio a diferencia de la fase aguda donde los PMN neutrófilos son más abundantes.

Los macrófagos activados tienen la capacidad de modificar el fenotipo según señales inductoras y sintetizar diversos factores de crecimiento y citocinas, con secreción de hidrolasas ácidas, peroxidasas, lisozimas y mediadores de la inflamación. Este fenotipo variante de macrófago sería determinante del establecimiento en la encía de un proceso inflamatorio destructivo o proliferativo -Iacopino y cols.1997-ver 4.4,6-Factores de crecimiento-.

Las células que se comportan como intermediarias hacia la defensa específica son las que sensibilizan a los linfocitos al presentarles a los antígenos para reconocerlos específicamente. Son las células presentadoras de antígenos: las estrelladas de Langerhans, las dendríticas y los macrófagos que aparecen en tejidos linfoides -tablaVI; figura 2,2-.

2.1.3.1-Sustancias humorales inespecíficas.

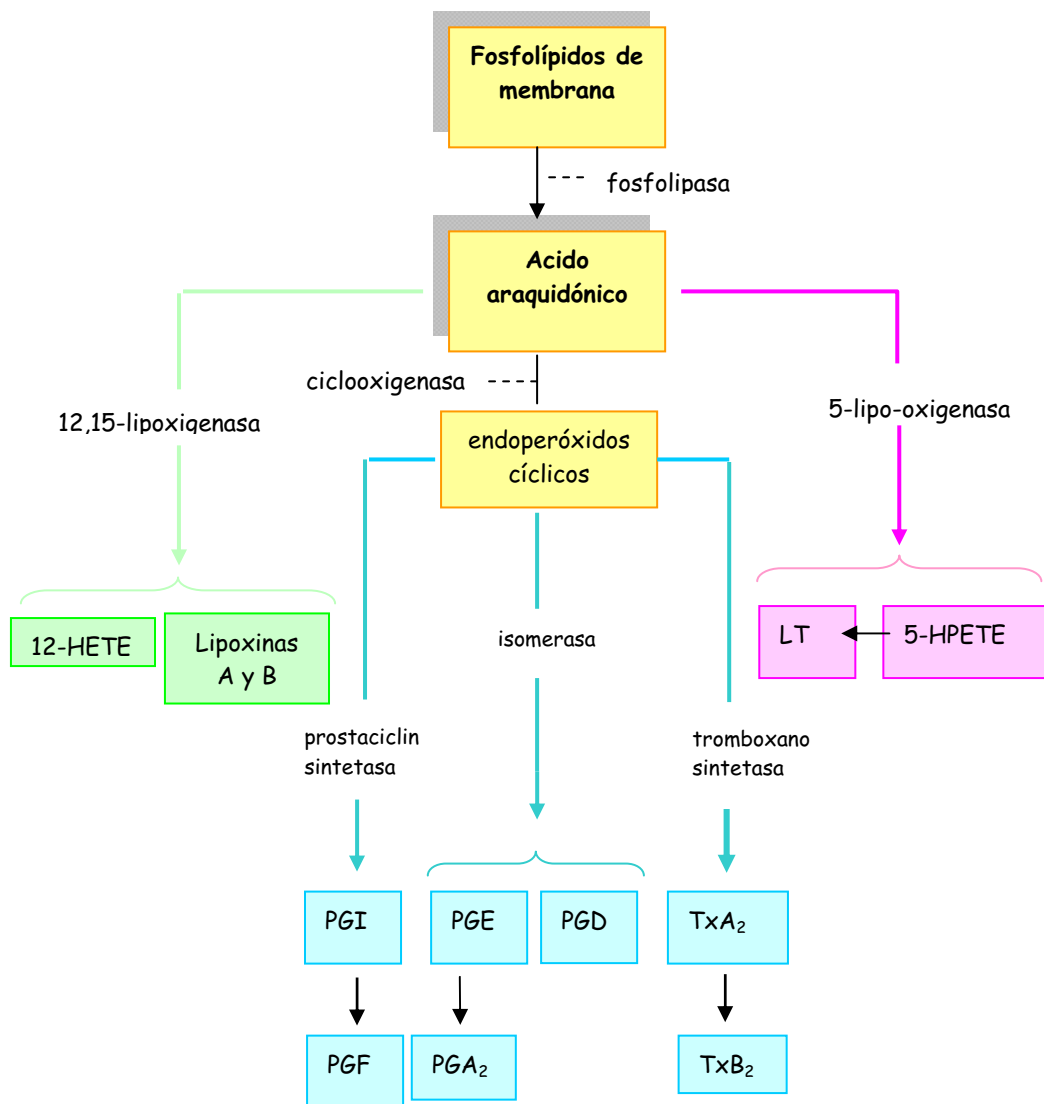
Son moléculas que participan también con efectos de resistencia al patógeno -lactoferrina, lisozima, hidrolasas, transferrina, citocinas, properdina -y globulina con acción antibacteriana y antivírica-, leucinas y plaquinas -polipéptidos secretados por PMN neutrófilos y plaquetas-, β -lisina -proteína activa sobre la pared de bacterias grampositivas-. La elastasa y la lactoferrina son componentes granulares de los PMN y su distinta liberación en cantidad indicaría diferente fase de enfermedad periodontal -Kinane y cols.2005-.

2.1.3.2-Enzimas matriciales y de los patógenos.

Entre las enzimas de la matriz conocidas como metaloproteinasas interesa destacar la colagenasa secretada por los fibroblastos y los PMN con una función degradativa del colágeno en fases inflamatorias gingivales establecidas y avanzadas -ver 2.6-Secuencia de la lesión gingival inflamatoria-. Esta reducción de colágeno evolutiva se compensa por la infiltración inflamatoria

ESTADO DE LA CUESTIÓN

creciente -Kinane y cols.2005-. También puede secretarse colagenasa como factor virulento por algunos microorganismos agresivos: AA², PG³ para avanzar a través del estroma conectivo. Otras moléculas enzimáticas virulentas tendrían acciones similares desintegradoras: leucocidinas, necrolisinas, hemolisinas, hialuronidasas, fibrinolisin... Hay enzimas, propias de los patógenos y del hospedador, que hidrolizan y dividen proteínas -proteinasas- con inhibidores de las enzimas contrarias homólogas -inhibidores de las proteinasas: α 2macroglobulina y α 1antitripsina -tabla VI-.



-figura 2,1: Metabolismo del ácido araquidónico y sus productos entre los que conviene mencionar las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (Tx) y los leucotrienos (LT)-

² AA: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

³ PG: *Porphyromonas gingivalis*

2.1.3.3-Prostaglandinas.

Los metabolitos del ácido araquidónico ya citados como mediadores tienen una especial importancia en la patogenia de la inflamación por sus propiedades y relaciones con otras moléculas y elementos biológicos en procesos de gingivitis y con reabsorción del hueso alveolar en periodontitis. Estudios *in vitro* han puesto en evidencia esta participación activa de PGs, LT y ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETE) en periodontitis crónica en las que se produce mayor síntesis y secreción de metabolitos por la vía de la lipooxigenasa al comparar con la síntesis de productos de la vía prostaglandinsintetasa -Mendieta y cols.1985-. Los HETE -figura 2,1- son quimiotácticos para los PMN neutrófilos como el tromboxano (Tx)₂ aunque no lo es la prostaciclina (PGI) que sintetizada en las células endoteliales actúa en cambio en el aumento de la permeabilidad vascular y la potencia con otros mediadores, modulando la fagocitosis leucocitaria -Mendieta 1988-.

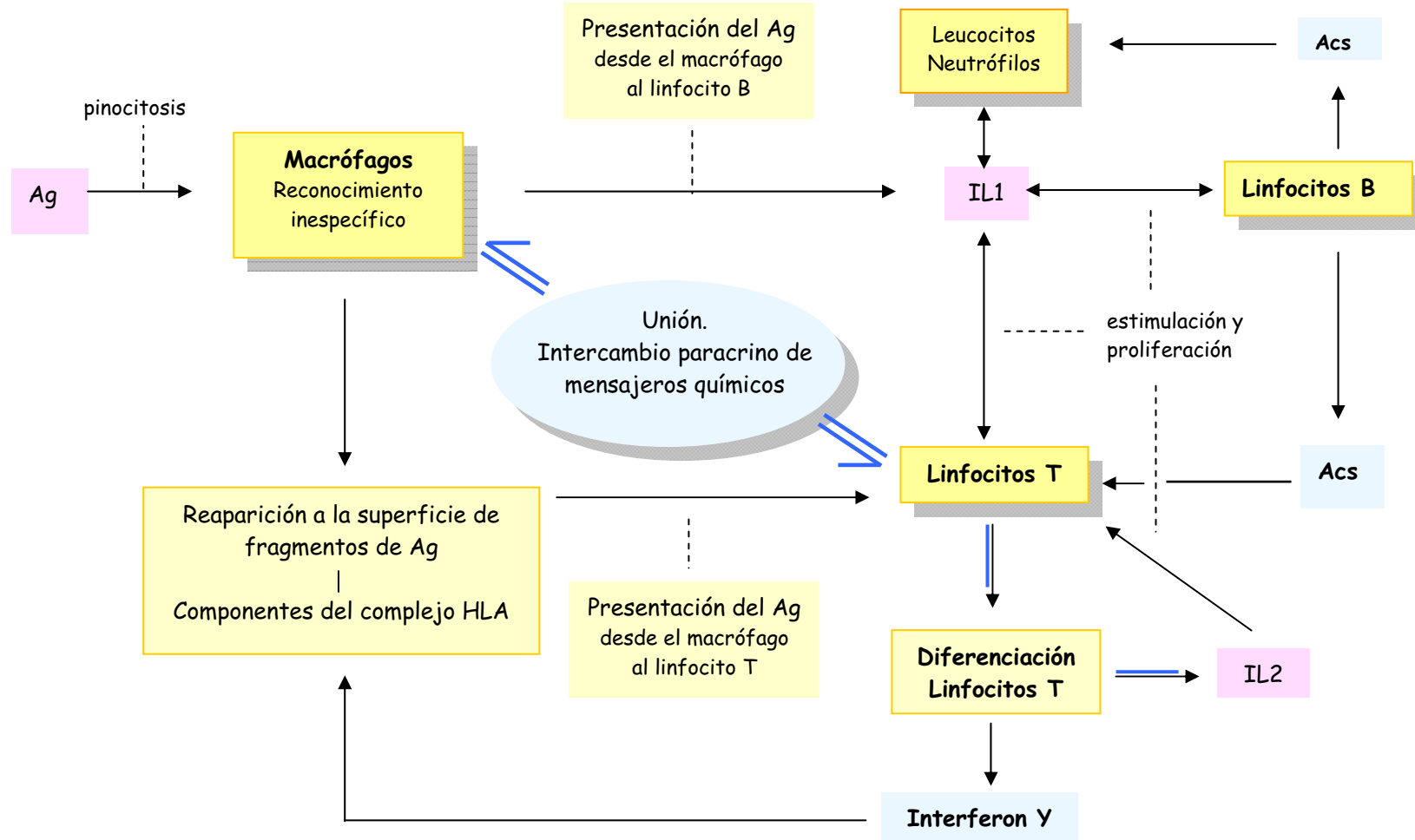
Sobre la agregación plaquetaria el TxA₂ secretado desde ellas, ejerce una acción positiva e intensa a diferencia de la que produce la PGI y su metabolito 6-keto-PGF_{1α}. Según la concentración de ácido araquidónico se formará mayor cantidad de uno o de otro metabolito antagónico en las plaquetas y en el endotelio y su efecto prevalecerá sobre el otro: concentraciones bajas -fisiológicas- de sustrato favorecerían 6-keto-PGF_{1α} sobre TxA₂ -Mendieta 1989-.

En la reabsorción ósea que se produce en la enfermedad periodontal crónica estarían implicados PGE₂ sintetizada y secretada por macrófagos y TxA₂. La primera

- regula directamente la producción del Factor Activador de los Osteoclastos;
- induce un incremento en el tamaño y en el número de los osteoclastos potenciando sus propiedades y
- estimula la secreción de enzimas lisosomales y colagenasa por los macrófagos.

Su mecanismo de acción -PGE₂- estaría a través del sistema de la adenilciclasa. En cultivos de células óseas se produce un primer periodo de inhibición de la movilización mineral y de la degradación del colágeno y posteriormente, a las 24 horas un efecto de estimulación de estas acciones, contrario al inicial. Al parecer dependería de los niveles intra y

ESTADO DE LA CUESTIÓN

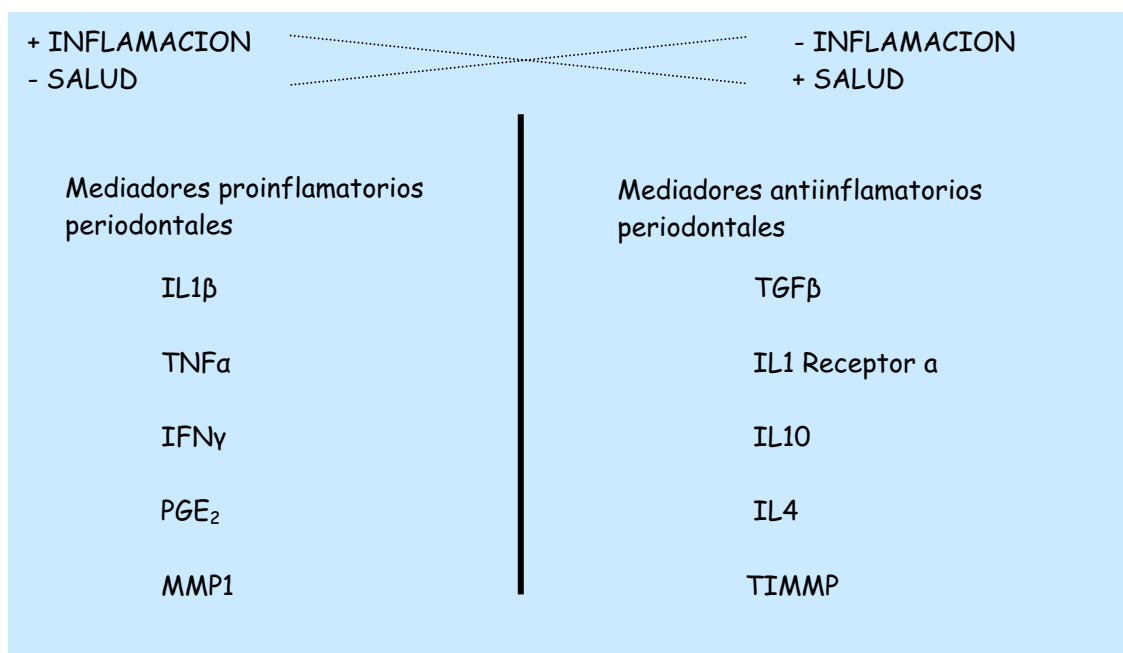


-figura 2,2: Relaciones entre los macrófagos y las células inmunes a partir de la presencia del antígeno, con activación de los linfocitos para su proliferación y diferenciación. Esta maduración promueve la secreción y función de citocinas. Ag: Antígeno, IL1: Interleucina 1 β , IL2: Interleucina 2. HLA: Sistema de histocompatibilidad, Acs: Anticuerpos. Esquema adaptado de Genco y cols.1992, Lozano y cols.1995-

extracelulares del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). PGE₂ tendría también un efecto inhibitor de la respuesta inmunitaria celular. Al parecer los linfocitos de pacientes con periodontitis agresivas tienen menor sensibilidad a la inhibición que provoca PGE₂. El TxA₂ produciría indirectamente reabsorción ósea -Mendieta 1989-.

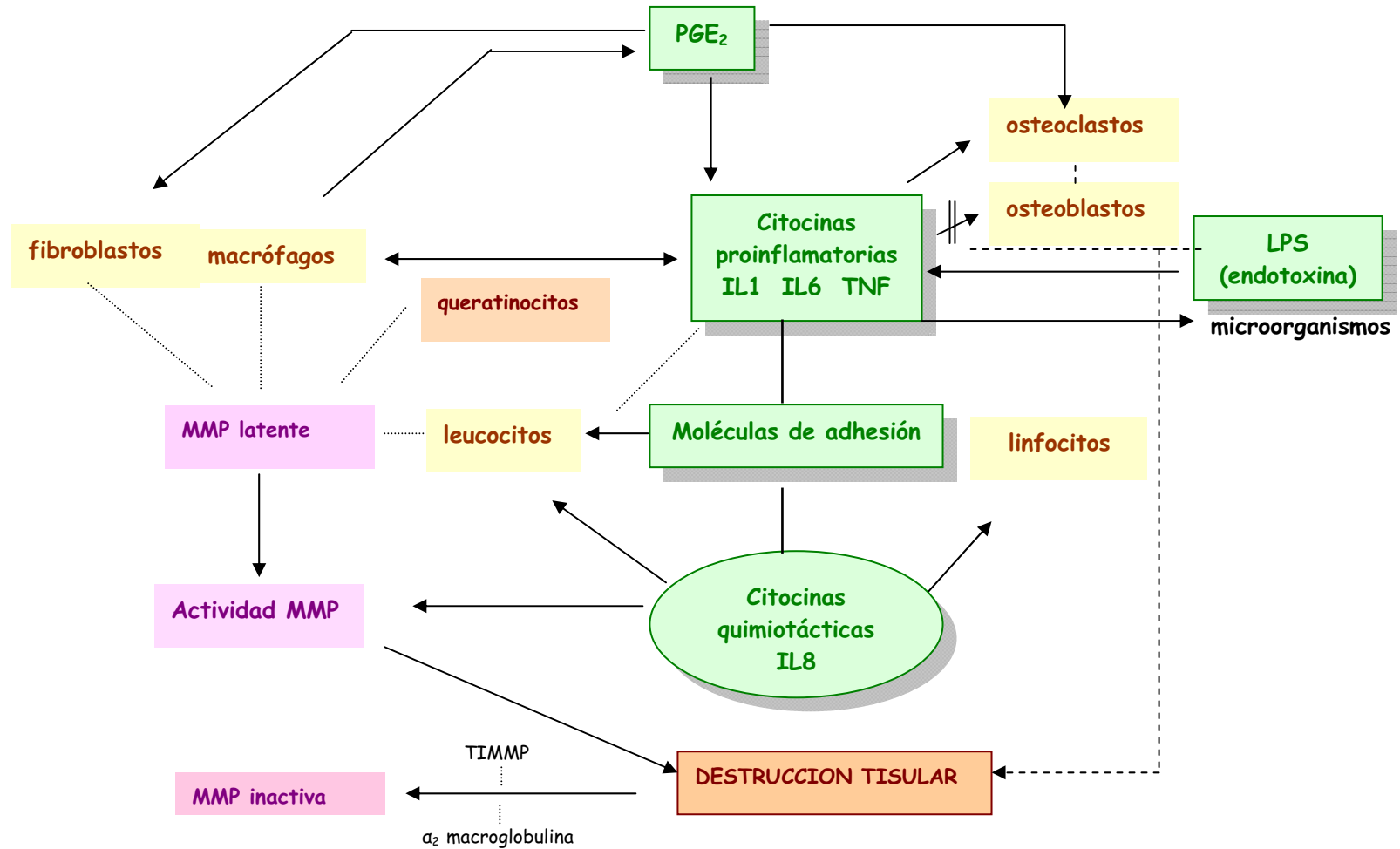
2.1.3.4-Citocinas.

Son moléculas proteicas que actúan como reguladores del crecimiento y diferenciación celular. Son mensajeras para la transmisión de señales a otras células y participan en la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inflamatoria e inmunitaria. Por eso participan de la defensa inespecífica y de la adquirida. Se distinguen por su función en: proinflamatorias, quimiotácticas, señaladoras linfocitarias, y factores de crecimiento. Entre las que participan en la defensa innata se citan las interleucinas (IL) -1, 6, 8,-, el interéferon tipo I (IFN1), y el factor necrosis tumoral (TNF). Algunas de ellas -IL5, IL10, IL12, IFN γ -



-figura 2,3: Relación de citocinas y factores de crecimiento en estado de salud y de inflamación. IL: Interleucina, TNF: Factor necrosis tumoral, IFN: Interferon, PG: Prostaglandina, MMP1: Metaloproteinasas matriciales, collagenasas, TGF: Factor de crecimiento transformador, TIMMP: Inhibidor tisular de la metaloproteinasas de la matriz -Page 1998, FDI Barcelona-

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 2,4: Diferentes relaciones entre los elementos moleculares y celulares de la inflamación y de la inmunidad. LPS: Lipopolisacáridos, MMP: Metaloproteinasa de la matriz -colagenasa-, TIMMP: Inhibidor de la MMP Adaptado de Page 1992

regulan la inflamación de origen inmunitario por estar secretadas por linfocitos T y activar funciones de células efectoras inespecíficas -Abbas y Lichtman 2004, figuras 2,3 y 2,4-.

IL8 es una citocina quimiotáctica para los PMN neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Es capaz de concentrar estas células en los focos estratégicos y mediar en la respuesta inmunitaria celular.

En la inmunidad específica destacan las interleucinas IL2, IL4, y factor de crecimiento transformante β (TGF β). Se caracterizan por la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria y provocar reabsorción ósea por inhibición de la síntesis.

Las citocinas señaladoras de linfocitos T Helper o cooperadores (LTH) refuerzan ambas respuestas inmunitarias específicas, con predominio de la humoral. Se distinguen: IL2, IL4, IL5. Se ha observado mayor presencia de células plasmáticas en muchas enfermedades periodontales -figura 2,5-.

La encía estaría en un equilibrio constante entre destrucción inflamatoria -presencia de factores proinflamatorios -reabsorción ósea- y reparación -factores de crecimiento- que permiten la proliferación, crecimiento y desarrollo de todas las estructuras del estroma- -figuras 2,3 y 2,5-.

2.2-Defensa específica

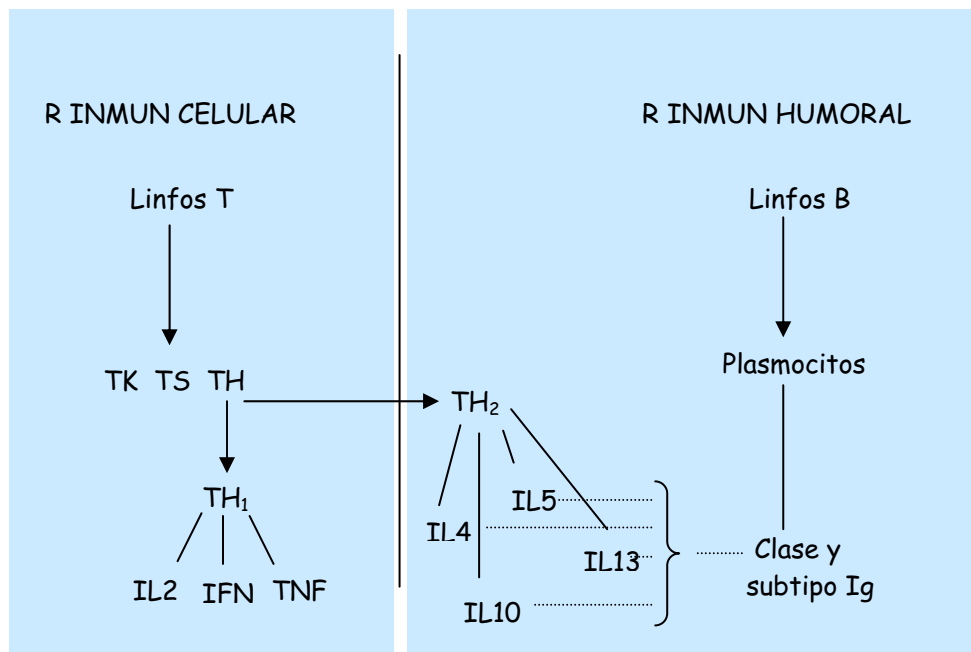
Consiste en una respuesta inmunitaria de adaptación o aprendida por la exposición previa al agente agresor. Depende de los linfocitos de las poblaciones B y T responsables de la inmunidad humoral y celular respectivamente capaces de reconocer y actuar específicamente contra fracciones o sustancias antigénicas de la noxa. Este comportamiento requiere una memoria inmunológica del agente extraño con especificidad de respuesta y que puede ser eficaz o excesiva -reacción de hipersensibilidad-.

Inmunidad humoral. Su vinculación con la defensa a nivel molecular estriba en la formación de anticuerpos (Ac) específicos a los antígenos (Ag) del agente agresor. La naturaleza del Ag es proteica y de alto peso molecular. Cuando se produce la presentación del Ag a los linfocitos B éstos inician un proceso de crecimiento y diferenciación a Células Plasmáticas que son las que producen directamente las inmunoglobulinas. Una porción de linfocitos B

ESTADO DE LA CUESTIÓN

queda de reserva y memoria frente al Ag específico. Esto explica el diferente tipo de respuesta reactiva entre la 1ª exposición o contacto con el Ag -respuesta lenta y débil- a las siguientes exposiciones -respuesta rápida e intensa-.

Los Acs también son macromoléculas proteicas y específicas en la unión y reacción con el Ag para su eliminación. Se distinguen diferentes formas de reacción:



-figura 2,5: Mediación de los linfocitos TH -cooperadores- en las 2 respuestas inmunitarias a través de las citocinas -señaladoras linfocitarias-. TK -linfocitos citotóxicos-, TS -linfocitos supresores-, IFN: Interferon, IL: Interleucina, TNF: Factor necrosis tumoral, Ig: Inmunoglobulinas. Se produce un refuerzo en ambas vías inmunitarias, especialmente en la humoral para las gingivitis y periodontitis-

1. Directa:

- a. Precipitación -insolubilidad-.
- b. Aglutinación -unión-.
- c. Neutralización -inactivación-.
- d. Lisis -disolución-.

2. Indirecta:

- a. Activación del complemento. Se producen las reacciones anteriores a través de la cadena enzimática del complemento; hay que añadir la opsonización.

- b. Activación de la reacción de anafilaxia. La reacción Ag-Ac provoca la balonización y destrucción de la célula efectora con liberación de histamina, y otras sustancias quimiotácticas.

La inmunidad humoral se produce en casos de infecciones bacterianas agudas y aparecen en períodos cortos: días/semanas.

La secreción de Ig establece unas diferencias según el subtipo predominante con respecto al pronóstico y a la susceptibilidad del proceso periodontal y se ha comprobado que IgM provocan más bacteriolisis que opsonización, frecuente en IgG. La subclase IgG₂ presenta más avidéz para la unión con carbohidratos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) a diferencia de las otras subclases de IgG cuya unión es con proteínas -Kinane y cols.2005-.

Inmunidad celular. Corresponde a los linfocitos T este tipo de defensa. Los que son sensibilizados crecen y proliferan para obtener más linfocitos sensibilizados para un Ag específico. Una subpoblación irá directa al foco de agresión y otra permanecerá en el tejido linfoide como linfocitos T memoria siendo una reserva a futuros ataques del Ag específico. Por este motivo las reacciones posteriores serán también más energías que la primera.

Los mecanismos de defensa son:

1. Directo. A través de linfocitos T citotóxicos o destructores (LTK). Se hincha el linfocito y libera linfotoxinas que lisan al agente agresor.
2. Indirecto:
 - a. Por amplificación. Por linfocitos T cooperadores (LTH). Son capaces de activar linfocitos B a través de factores quimiotácticos, de transferencia y citocinas que sensibilizan más linfocitos y atraen macrófagos -figura 2,5-.
 - b. Por regulación. Por linfocitos T supresores (LTS) que modulan la respuesta inmune por retroalimentación.

2.3-Características físico-químicas de los ecosistemas orales

Los ecosistemas orales primarios son nichos ecológicos en los que están establecidas colonias de microorganismos residentes -microbiota autóctona o propia- y microorganismos transitorios. Se consideran ecosistemas primarios la mucosa oral, la lengua, las superficies dentales y el surco gingival -Valle y cols.1995-.

Los microorganismos que ocupan estos ecosistemas se encuentran en unas condiciones óptimas o como mínimo tolerantes para su supervivencia y desarrollo incluso en relación con otras especies microbianas distintas con las que están en equilibrio. Estos factores a tener en cuenta son:

-Humedad. Necesaria por su alto contenido acuoso. A través de ella se producen los intercambios de nutrientes y productos de desecho. La disponibilidad es elevada por la saliva que fluye y cubre la mayoría de las superficies.

-pH. El valor habitual está alrededor de 7, aunque se producen variaciones según los productos disueltos en la saliva que por el sistema de amortiguación del bicarbonato se compensan.

-Potencial de óxido-reducción. Este potencial condiciona el grado de aerobiosis de los distintos microorganismos: desde un ambiente estricto y exclusivo en relación con el oxígeno -aerobios y anaerobios estrictos- a una situación tolerante -facultativos-. En zonas muy aerobias, expuestas o superficiales, los potenciales REDOX son muy altos, lo contrario en nichos ecológicos profundos como una bolsa periodontal donde los potenciales son muy reducidos.

-Temperatura. Los microorganismos autóctonos han de ser capaces de resistir un margen de temperatura muy amplio en pocos segundos desde los 37 °C habituales, debido a la fluctuación importante que se produce con los alimentos -Liébana y cols.1995-.

2.4-Flora habitual autóctona

La microbiota residente aporta en general beneficios al hospedador, como una simbiosis, en los aspectos nutricionales pero también proporciona una protección frente a una posible infección. Esta se establece en cuanto hay un desequilibrio microbiológico entre colonias con un resultado de aparición de factores virulentos para el hospedador. Esta alteración puede producirse también por factores externos relacionados con la dieta, hábitos tóxicos del paciente, quimioterápicos administrados que alteran la flora intestinal, enfermedades sistémicas -inmunodeficiencias- o susceptibilidades genéticas marcadas por polimorfismos génicos.

Las bacteriocinas que sintetiza la flora habitual, y los productos finales del metabolismo actúan como toxinas frente a los patógenos, alterando las condiciones ambientales y creando barreras a nivel local y en colaboración con los mediadores de la defensa del hospedador: aumento de la fagocitosis, incremento en la síntesis de Ig, IFN... En ocasiones se sospecha de una competencia en los receptores celulares o por inducción cruzada de Acs, o bien existen productos de secreción interbacterianos antagónicos: competencia por sustratos nutricionales, H₂O₂, producción de ácidos -butírico, propionico-, relación con el oxígeno y metabolitos terminales -NH₃, HS- -tabla VII--Liébana y cols.1995-.

Existen mecanismos de adhesión, y agregación entre las superficies bacterianas y las del hospedador para la colonización y el establecimiento de poblaciones bacterianas como determinantes ecológicos en ecosistemas orales previos a la formación de las placas bacterianas. Estas uniones por adhesión y agregación -coagregación- se producen por residuos de macromoléculas proteicas y de carbohidratos. Las uniones se establecen en las superficies epiteliales del hospedador, en las aportaciones del desarrollo de la placa bacteriana, en el cálculo y en materiales de restauración odontológicos -Liébana y cols.1995-.

La placa supragingival madura es la fuente principal de la flora del surco gingival. En su composición se encuentran microorganismos residentes y transeúntes con una proporción de un 50% de formas cocoides y un 48% de bacilos. Les siguen en cantidad decreciente las espiroquetas -1%- y otros microorganismos -0,05%-Mycoplasmas, Cándidas,...-tabla VII-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

La placa subgingival procede de los microorganismos contiguos de la placa supragingival pero con unas características distintas debido a la profundidad del surco gingival que puede conferir un microambiente anaerobio, pH más alcalino que el de la saliva -8,2-, un potencial REDOX muy reducido, flujo gingival crevicular rico en nutrientes y grado de afectación del periodonto -Liébana y Baca 1995-.

Cocos ~ 50%	Bacilos ~ 48%
Gram + anaerobios facultativos ~ 36%	Gram + anaerobios facultativos ~ 41%
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Actinomyces</i> spp
<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp
	<i>Propionibacterium</i> spp
Gram - anaerobios ~ 12%	<i>Corinebacterium matruchotii</i>
<i>Veillonella</i> spp	
Gram - aerobios ~ 1,8%	Gram - anaerobios facultativos ~ 3%
<i>Neisseria</i> spp	<i>Haemophilus</i> spp
	<i>Campylobacter</i> spp
Gram + anaerobios estrictos ~ 0,1%	<i>Capnocytophaga</i> spp
<i>Peptostreptococcus</i> spp	<i>Actinobacillus</i>
<i>Peptococcus niger</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>
	<i>Eikenella corrodens</i>
	Gram - anaerobios estrictos ~ 3%
	<i>Porphyromonas</i> spp
	<i>Prevotella</i> spp
	<i>Fusobacterium</i> spp
	<i>Bacteroides</i> spp
	<i>Selenomonas</i> spp
	Gram + anaerobios ~ 0,9%
	<i>Eubacterium</i> spp
	<i>Bifidobacterium</i> spp
	Gram + aerobios ~ 0,1%
	<i>Rothia dentocariosa</i>

-tabla VII: Lista parcial de microorganismos de la placa supragingival madura -
Liébana y cols.1995-

2.5-Factores virulentos bacterianos

La microbiota habitual aunque protege al hospedador en su colaboración frente a la prevención de posibles patógenos, puede ser reservorio de los mismos. Si se produce un desequilibrio en las relaciones con el hospedador, podrían prevalecer colonias de microorganismos resistentes capaces de promover patogenicidad -infección- según la virulencia e inducir una respuesta inflamatoria -resistencia del hospedador-.

Los factores de virulencia a tener en cuenta son: puerta de entrada, adherencia -entre la bacteria y las células a invadir- y agregación entre bacterias para una adherencia específica, proliferación local tisular mediante moléculas que permiten una dificultad para la fagocitosis: -coagulasa, leucocidinas, necrotoxinas y hemolisinas. Ya se han mencionado enzimas capaces de contribuir en la agresión: proteinasa e inhibidores, colagenasa, fibrinolisisina y hialuronidasa -García y cols.1995-.

Las toxinas son moléculas complejas compuestas por los tres Principios Inmediatos con capacidad de lesionar las células sobre las que actúan. Se distinguen:

- -exotoxinas, producidas por bacterias Gram + y Gram -. Se pueden liberar al exterior -las más comunes- o permanecer en asociación a la membrana o al citoplasma y sólo se liberan después de la lisis. Son de naturaleza proteica por lo que muestran labilidad con los enzimas proteolíticos y con el calor sin perder su capacidad antigénica. Presentan diversidad en su mecanismo de acción.
- -endotoxinas, estructurales en la pared de las bacterias Gram - de naturaleza lipopolisacárida. Sus manifestaciones clínicas en los pacientes se centran en fiebre, hipotensión y neutropenia. Son estables al calor y al formol con bajo poder inmunógeno pero se destruyen por la opsonización de anticuerpos.

2.6-Secuencia de la lesión gingival inflamatoria

El proceso de inflamación gingival puede ser evolutivo si la acumulación de placa bacteriana es progresiva por una falta de hábito higiénico. El límite de reversibilidad de la lesión está en la afectación de la inserción conectiva. La inflamación gingival ya se inicia a un nivel molecular en cuanto hay una acumulación de placa bacteriana en las primeras 24 horas. Esta sería la lesión gingival inicial, ya instaurada a los 4 días a veces con poca manifestación clínica sin ser patológica. Aumenta el flujo gingival crevicular en el surco donde hay mayor presencia de microorganismos, sustancias derivadas que pueden ser todavía fácilmente eliminadas desde el surco gingival y leucocitos PMN que han atravesado el epitelio de unión. En cambio los linfocitos permanecen en el interior del tejido con su función de relación con antígenos, citocinas y moléculas de adhesión. La lesión está limitada en el surco -Kinane y cols.2005- -tabla VIII-.

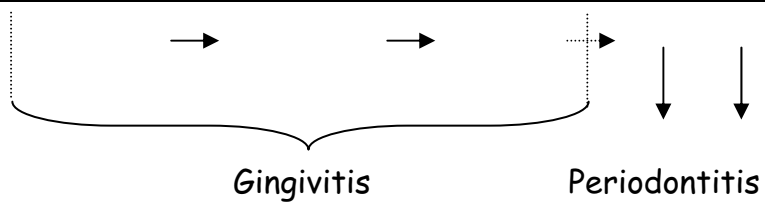
A los 7 días aproximadamente de la presencia continuada de placa bacteriana aparece la lesión gingival temprana. Sus características histológicas son más acentuadas que en la lesión inicial con mayor presencia de linfocitos y PMN neutrófilos, pero hay pocas células plasmáticas. Disminuyen los fibroblastos por la infiltración leucocitaria así como las fibras colágenas. Hacia los 15 días empiezan a producirse depósitos subgingivales. Ya hay manifestación clínica de la inflamación. El paso hacia la lesión establecida es muy variable y depende de la susceptibilidad del paciente para que se produzca con mayor o menor rapidez.

En la lesión gingival establecida se observan mayor número de células plasmáticas -aunque no es el tipo celular predominante en humanos a diferencia de lo que se ha observado en animales- y se produce a las 3-4 semanas de acumulación de placa bacteriana. Sus características moleculares e histológicas están más afectadas. Se definen por su evolución 2 tipos: uno estable sin progresar en meses o años y el otro activo. Se ha comprobado que zonas periodontales agresivas -activas- presentan mayor población de células plasmáticas.

Finalmente, si la placa continúa acumulándose se produciría una pérdida de hueso alveolar, según la susceptibilidad del paciente; detalle que

ESTADO DE LA CUESTIÓN

<i>Categorías</i>	Encía sana prístina	Lesión inicial	Lesión temprana	Lesión establecida	L avanzada periodontitis
<i>Tiempo</i>	--	24 h	7 d	variable	variable
<i>Clínica</i>	--	--	+	++	+++
<i>Histología</i>	--	PMN	+PMN macrófagos	++PMN macrófagos	PMN
		+ bacterias	++ bacterias	++bacterias	+bacterias
		linfosT	+linfosT	++linfosT plasmocitos	+linfosT ++plasmocitos
	colágeno	↓col	↓↓ col	↓↓↓ col	↓↓↓ col
	fibroblastos	↓fib	↓↓ fib	↓↓ fib	↓↓ fib
	inserción estable	inserción estable	inserción estable	inserción estable	inserción apical
	h alveolar íntegro	h alveolar íntegro	h alveolar íntegro	h alveolar íntegro	h alveolar reabsorbido



-tabla VIII: Características de las lesiones periodontales y su evolución, según la clasificación de Page y Schroeder 1976 -Lindhe y cols.2005-

diferenciaría este nivel de lesión gingival -gingival/periodontal avanzado- con respecto al anterior -establecido-. El epitelio de unión ha migrado apicalmente al destruirse el nivel de inserción conectiva al cemento. El hueso alveolar también se reabsorbe. La población celular infiltrante que predomina es de células plasmáticas -Kinane y cols.2005-.



-figura 2,6: Aspecto clínico de una inflamación gingival -gingivitis crónica- con alteración del margen gingival y signos típicos. Se aprecian depósitos de placa bacteriana-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Estos cambios pueden aumentar la invasión de otras especies bacterianas más patógenas con supervivencia de las más resistentes. El resultado es una inflamación instaurada de la encía marginal y adherida con diferente grado de severidad, afectando también la papila interdientaria.

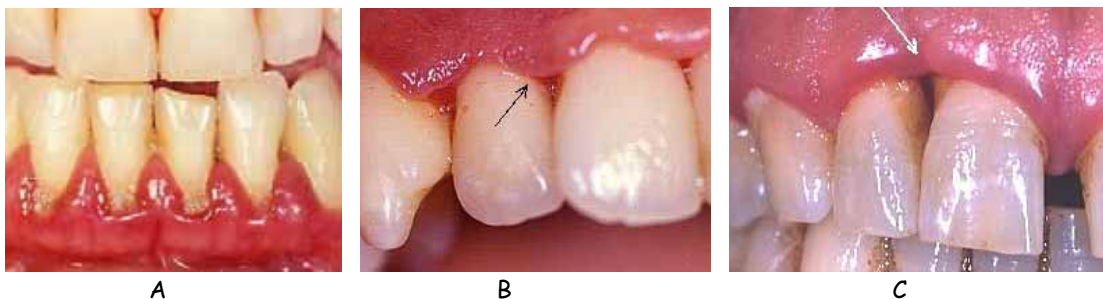
Estos mecanismos patogénicos provocan los signos y síntomas típicos de la inflamación con alteración de la función y del aspecto clínico -ver 4.6-Clinica-- figura 2,6-.

3-EL AGRANDAMIENTO GINGIVAL

La papila gingival está sometida a la acción continua de la placa bacteriana por ocupar el espacio que produce mayor depósito: la tronera interdental. Además esta banda anatómica es una zona crítica de difícil autoclisis con un acceso a la higiene comprometido. Por sus características morfológicas es la parte de la encía que presenta más alteraciones estructurales según la patología existente y sus repercusiones -en la salud periodontal, estética y funcional- integran la patología de la papila gingival.

Si la inflamación afecta la papila se altera su morfología con un aumento de volumen sin variar su forma triangular pero con cambio en su consistencia ya que se torna más edematosa e hiperémica -figura 3,1 A-. Puede haber a través del surco sangrado, trasudado o exudado y a veces supuración purulenta.

Si existe pérdida del nivel de inserción conectivo con reabsorción ósea puede ocurrir que la papila no ocupe toda la tronera en su porción más coronal y quede un "agujero negro" por el aspecto estético. Si la pérdida ósea es más avanzada como consecuencia de una periodontitis severa, el perfil del hueso interdentario puede estar aplanado y provocar una silueta de encía marginal poco festoneada con papila muy baja -figura 3,1 B- y a veces inexistente -figura 3,1 C-.



-figura 3,1: La papila gingival adquiere distintas conformaciones según la patología. A- No pierde extensión pero aumenta su volumen por la inflamación. B- El vértice se pierde y queda aplanada la papila. C- Pérdida total de la papila -

En situaciones determinadas, provocadas por infecciones gingivales específicas, se produce una inflamación papilar con necrosis de la punta. Esta afectación altera también su morfología y queda el vértice del

triángulo papilar decapitado; en este caso el resultado es de un perfil gingival irregular y asimétrico -figura 3,2-.



-figura 3,2: Imágenes clínicas de perfiles papilares asimétricos con inflamación, necrosis y aspecto aplanado-

Si la causa de la afectación está en un crecimiento desmesurado de uno de los componentes tisulares de la papila gingival, suele asociarse un grado variable de inflamación con la aparición clínica de una encía marginal irregular con papilas gingivales exuberantes que llegan a ocultar parcialmente las coronas de los dientes -figura 3,3-.



-figura 3,3: Sobrecrecimiento de la papila gingival compatible con Agrandamiento gingival. Recidivó a los 3-4 meses con un control de placa bacteriana irregular. En la zona más superior y apical se observan unas zonas más hiperémicas-

3.1-Concepto y sinonimia

En este momento se puede definir la patología del Agrandamiento gingival (AG) como un dismorfismo gingival caracterizado por un sobrecrecimiento de la encía manifestado en su aspecto clínico por un mayor volumen con alteración de la morfología del perfil gingival libre.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las características histopatológicas han permitido substituir nominaciones inexactas o erróneas -hiperplasia o hipertrofia que todavía aparecen en algunas revisiones científicas- y aceptar los nombres clínicos de agrandamiento o sobrecrecimiento gingival por su aumento en volumen, y de dismorfismo en cuanto a la alteración morfológica que presenta la encía.

Sus causas son múltiples y las de mayor frecuencia se describen en la clasificación etiológica.

3.2-Clasificación del Agrandamiento gingival

El AG como entidad clínica es consecuencia de múltiples factores etiológicos que en la mayoría de casos están asociados entre ellos y además con distinta relevancia en la patogénesis -Zerón 2001- -tabla IX-.

AG INFLAMATORIO
AG NO INFLAMATORIO
 idiopático
 farmacológico
AG COMBINADO
AG CONDICIONADO
 hormonal
 leucémico
 malnutrición (déficit de vitamina C)
 inespecífico
AG NEOPLASICO
 fibromas
 granulomas
 quistes
 papilomas
 carcinomas
 melanomas
 metástasis
AG ASOCIADO A ERUPCION DENTARIA

-tabla IX: Clasificación del AG. Tomado de Miranda 1997-

3.2.1-Agrandamiento gingival inflamatorio.

Esta clasificación considera la categoría "inflamatoria" consecuencia o asociada a placa bacteriana. En este supuesto, el AG inflamatorio puede ser agudo o crónico. Cuando la causa es la inflamación prolongada -AG inflamatorio crónico- la manifestación clínica es más lenta y los signos en color, textura y volumen de la papila interdental no son tan severos. La encía marginal también puede estar agrandada en una zona localizada o generalizada en toda la boca. No hay dolor, a diferencia del AG inflamatorio agudo y en este caso la causa es más puntual y suele relacionarse con algún traumatismo o infección aguda en forma de absceso gingival -figura 3,4-.



A



B

-figura 3,4: A- AG inflamatorio agudo por placa bacteriana..B- Absceso en encía posterior por bucal, manifestación de inflamación aguda. Obsérvese su aparición dentro de la banda de encía queratinizada lo que hace sospechar una implicación periodontal-

La lesión aguda en su evolución podría afectar la inserción conectiva y el hueso alveolar con reabsorción y formación de algún defecto infraóseo. El AG crónico puede formar tumores sesiles o pediculados en zonas de encía queratinizada -figura 3,5-.



A



B

-figura 3,5: Imágenes de AG inflamatorio crónico. A- Paciente fumador. B- Gingivitis crónica agudizada. Se aprecia la asimetría del margen gingival con un componente eritematoso típico de inflamación-

3.2.2-Agrandamiento gingival no inflamatorio.

El AG no inflamatorio distingue la fibromatosis gingival hereditaria o idiopática. En el Workshop de 1999 está considerado como una enfermedad gingival inflamatoria no asociada a placa bacteriana de causa genética -ver figura 3,17B-. Su afectación incluye toda la encía queratinizada. El aspecto es duro y grueso, de color rosado con un crecimiento lento pero exuberante en su aspecto clínico. Se han descrito casos en familias relacionados con retraso psíquico. La presentación clínica puede ser un descubrimiento aislado o bien formando parte de un síndrome. Huang y cols.1986 aportan dos casos de pacientes con fibromatosis e hipertrichosis, sin historia familiar referida, con analíticas y pruebas complementarias normales y sin retraso mental. Se concluyó que estos desórdenes se localizaban en el periodonto -figura 3,6-.



-figura 3,6: Fibromatosis gingival hereditaria.
Obsérvese el crecimiento de la encía queratinizada que
llega a cubrir totalmente las coronas posteriores.
Imagen tomada de Laskaris 2005 -

En la histopatología se observa un tejido conectivo fibroso denso con inflamación que a veces presenta inclusiones cálcicas, islas de epitelio odontogénico y depósito amiloide -Günham y cols.1995-.

En este grupo también se clasificarían el AG farmacológico, las amiloidosis primarias, las xantomatosis y las sarcoidosis -Sloan y cols.1983-.

3.2.2.1-Agrandamiento gingival farmacológico.

El AG inducido por fármacos se considera como un efecto adverso del fármaco en su acción. Según la clasificación del Workshop de 1999 está considerado como lesión gingival asociada a placa bacteriana -ver figura 3,17 A- Se citan los fármacos inductores conocidos de este dismorfismo gingival:

-antiepilépticos, entre ellos el más prevalente es el producido por la fenitoína pero también se ha descrito algún caso con la administración de vigabatrina y valproato -Katz y cols.1997, Marshall y Bartold 1998-.

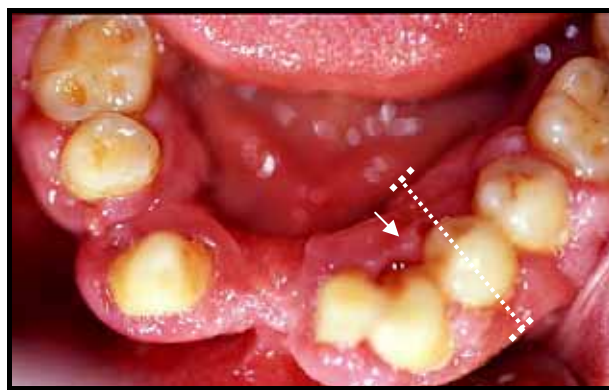
-ciclosporina A, Inmunosupresor para aloinjertos -Wysocki y cols.1983-figura 3,7-.

-antagonistas del calcio, con las dihidropiridinas -nifedipina, nitrendipina, nicardipina, felodipina, amlodipina-, verapamil, y diltiazem -Lucas y cols.1985, Seymour 1991, Seymour y cols.1994, Nery y cols.1995-.

-anfetaminas -Hasan y Ciancio 2004-.

-anticonceptivos orales. Las mujeres que recibían este tratamiento durante unos meses manifestaban la clínica del AG que remitía con la retirada de la terapia -Kaufman 1969-.

-eritromicina. Se ha descrito el caso de un niño que en una semana de tratamiento -1500mg/día- tuvo un AG farmacológico que desapareció al retirarse el antibiótico -Valsecchi y Cainelli 1992-.



-figura 3,7: AG por ciclosporina A en un paciente transplantado renal. Obsérvese la anchura vestibulo-lingual del reborde gingival y el margen gingival lingual poco adherido a los dientes (flecha) dejando abierta la pseudobolsa-

3.2.3-Agrandamiento gingival combinado.

El AG combinado se explica en su proceso de formación como un AG no inflamatorio que en una segunda fase se inflama por las condiciones morfológicas de las bolsas gingivales que contornean a los dientes. La encía sobrecrecida no está bien adaptada a la superficie dentaria y permite con facilidad la entrada de microorganismos y la respuesta de defensa inflamatoria. La eliminación de la inflamación facilita la reducción de volumen del AG pero persiste el AG no inflamatorio.

Un gran número de casos de AG farmacológico son combinados por la afectación inflamatoria secundaria a la inducción del fármaco. Otro ejemplo es el producido por iatrogenia en el tratamiento odontológico -figura 3,8-



-figura 3,8: AG de paciente sometido a tratamiento con nifedipina, presentaba unas coronas protésicas que invadían el espacio biológico con un proceso inflamatorio asociado-

3.2.4-Agrandamiento gingival condicionado.

El AG condicionado indica una influencia de patología sistémica en el periodonto actuando como una situación predisponente para que un irritante local en la encía -desencadenante- provoque una respuesta severa. Se distinguen diversas entidades sistémicas que facilitan este dismorfismo gingival: hormonal, leucémico, granuloma piógeno y déficit de vitamina C - figura 3,9-. Según la última clasificación de 1999 formaría parte de una patología gingival modificada por factores sistémicos -ver figura 3,17 A-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

En el AG hormonal se distinguen el que aparece en la etapa puberal y el de la gestación. El primero aparece sin preferencia de género y no manifiesta ninguna diferencia clínica con el AG inflamatorio crónico; la diferencia se establece en la dependencia con el cambio de los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales y la sensibilidad más acusada a los irritantes locales en la encía marginal. Es reversible después del período de la pubertad.

El AG gestacional puede ser localizado o generalizado en la encía de ambas arcadas. En casos severos se puede manifestar como una lesión más exuberante -tumor del embarazo- -figura 3,9-. Su aspecto es circunscrito, de base sesil o pediculada en la encía marginal sin depender del hueso alveolar.



-figura 3,9: "tumor del embarazo".
Imagen cedida por Mendieta 1995-



A

B

-figura 3,10: Granuloma piógeno. Obsérvese el aspecto aframbuesado e hiperémico. A: Aspecto vestibular. B: Por oclusal se observa la afectación hasta el vértice de la papila-

Al finalizar el embarazo se produce una remisión importante del AG aunque es necesario eliminar cualquier irritante en la encía libre para conseguir la desaparición de las lesiones inflamatorias. Se considera similar a un granuloma piógeno -figura 3,10-.

Se reconoce el AG hormonal por un exceso de secreción de la hormona de crecimiento, en casos referidos de acromegalia. En un estudio clínico realizado en once pacientes con acromegalia por adenomas en la hipófisis, se observó que ocho presentaban AG -Capoglu y cols.2002-.

En este apartado se distingue el AG leucémico que presenta una infiltración densa de leucocitos inmaduros con capacidad de replicación aumentada o bien una lesión típica neoplásica. El aspecto es de una encía agrandada, friable con tendencia al sangrado espontáneo que oculta parcialmente las coronas dentarias.

El granuloma piógeno se caracteriza por un aspecto variable de sobrecrecimiento gingival con base pediculada o sesil. La causa subyacente puede estar en un microtraumatismo o la permanencia de un cuerpo extraño -figura 3,10-.

El escorbuto aparece con el déficit de vitamina C y es una respuesta condicionada a la irritación local. Se produce una hemorragia gingival con degeneración del colágeno y edema del tejido conectivo. Estos cambios inhiben la reacción de defensa aunque hay una inflamación alterada en su extensión. El AG dependería de la combinación de los 2 factores.

3.2.5-Agrandamiento gingival neoplásico.

El AG neoplásico agrupa lesiones neoforativas puras y otras cuya base es inflamatoria. El término épolis no describe la naturaleza de una lesión proliferativa y simplemente es sinónimo de masa tumoral gingival. Dentro de esta tipo de AG se menciona:

- El fibroma que en su constitución presenta un exceso de tejido fibroso con inclusión de otros tejidos o estructuras: cemento, hueso, músculo,.... Procedencia del ligamento periodontal.
- Granuloma de células plasmáticas.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- Granuloma reparativo de células gigantes. Se considera una respuesta celular inflamatoria a un irritante local con células fusionadas inflamatorias. Se distingue el periférico si su origen es en el espacio interdental y en la encía marginal y central si la lesión se produce en los maxilares. En este caso se produce una cavitación intraósea con crecimiento hacia el exterior. La presentación clínica es variable: tumor liso exuberante y redondeado, o masa de superficie irregular -figura 3,11-.



-figura 3,11: Tumor sesil compatible con granuloma piógeno y granuloma reparador periférico de células gigantes-

- Quistes gingivales -figura 3,12 A-.
- Papiloma. Consistencia dura, y a veces verrucosa -figura 3,12 B-.



-figura 3,12: A- Quiste gingival, B- Papiloma vírico. Tomado de Lindhe y cols.2005-

- Hemangioma. Derivado de la trama vascular, localizado con frecuencia en la papila interdental. Es plano, irregular con extensión a la encía marginal vecina -figura 3,13-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 3,13: Hemangioma en encía marginal y afectación de la papila.
Tomado de Laskaris 2005-



-figura 3,14: Sarcoma de Kaposi.
Tomado de Lindhe y cols.2005-

- **Nevus.** Puede aparecer en la encía pero es más frecuente en la piel. A veces es pigmentado y se presenta como un nódulo o es sesil.

El diagnóstico diferencial de la mayoría de estas lesiones se realizará por anamnesis y aspecto clínico. Su pronóstico es benigno.

Entre los malignos se citan:

- **Carcinoma.** Es característico el de células escamosas por su mayor frecuencia. La clínica es exofítica-verrucosa o bien erosiva. Su extensión es por invasión a estructuras vecinas o por metástasis a corta distancia en la zona ganglionar supraclavicular aunque se pueden afectar hígado, pulmón y hueso. En principio pasa desapercibido por ser asintomático pero enmascarado por la reacción inflamatoria adyacente. Su localización más habitual es en la zona de molares inferiores.
- **Melanoma maligno.** No es muy frecuente y se localiza en la encía de la parte anterior del maxilar superior. De crecimiento muy rápido e infiltración del hueso subyacente, con metástasis a los ganglios linfáticos cervicales y axilares.
- **Sarcoma.** No son muy frecuentes -figura 3,14-.
- **Metástasis gingivales de neoplasias primarias.** Son poco frecuentes pero se han descrito: adenocarcinoma de colon, carcinoma hepatocelular, hipernefroma, tumor testicular, carcinoma de células renales.

3.2.6-Agrandamiento gingival asociado a erupción dentaria.

El AG asociado a la erupción dentaria se caracteriza por un sobrecrecimiento de la encía queratinizada que rodea al diente en erupción, debido a un cubrimiento de la encía en el ecuador de la corona anatómica. - figura 3,15-. Cuando se produce el desplazamiento apical de la encía con respecto al diente, migra también el epitelio de unión y se adelgaza la encía. Influye también un grado de inflamación consecuente con manifestación clínica en ocasiones exagerada. Se ha visto que es un proceso crítico para el desencadenamiento del AG en la fibromatosis gingival hereditaria -Günham y cols.1995-.



-figura 3,15: La erupción dentaria del incisivo lateral provoca un AG en la encía perimetral-



-figura 3,16: Exploración periodontal en el surco gingival del incisivo central

La afectación periodontal en su inserción conectiva se explora con la sonda periodontal para determinar si hay pérdida en el nivel de inserción -figura 3,16-.

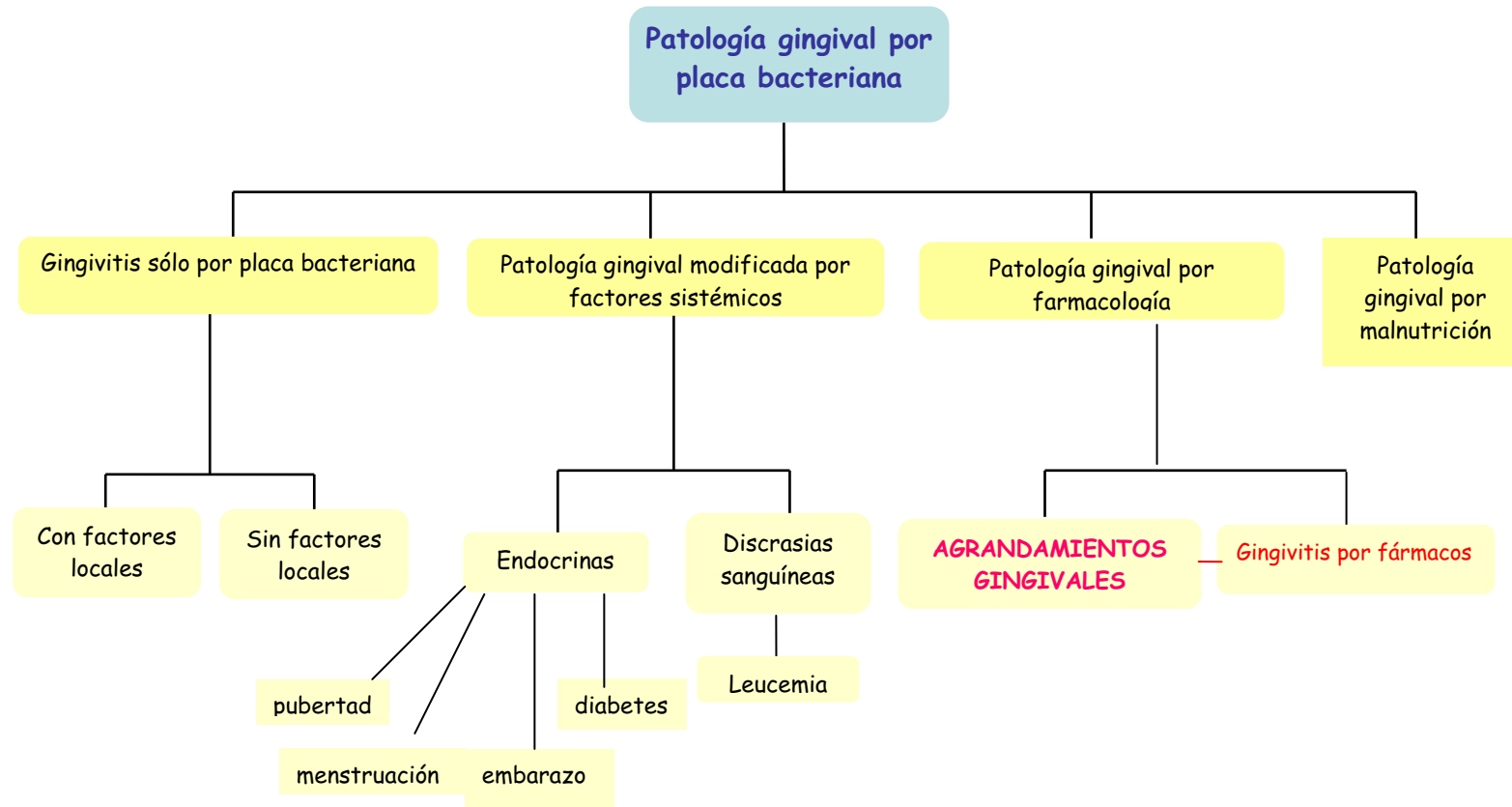
Para todos los casos de AG es conveniente clasificar correctamente la lesión exuberante mediante el diagnóstico, sugerir un pronóstico y establecer un tratamiento. El diagnóstico preciso se obtiene por el estudio de la histopatología de la lesión y la consideración del diagnóstico diferencial.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

El pronóstico dependerá de la naturaleza del AG. Si es una neoformación maligna dependerá de su severidad y capacidad de invasión. El tratamiento será quirúrgico si los límites en la extensión están definidos o bien radio y quimioterapia.

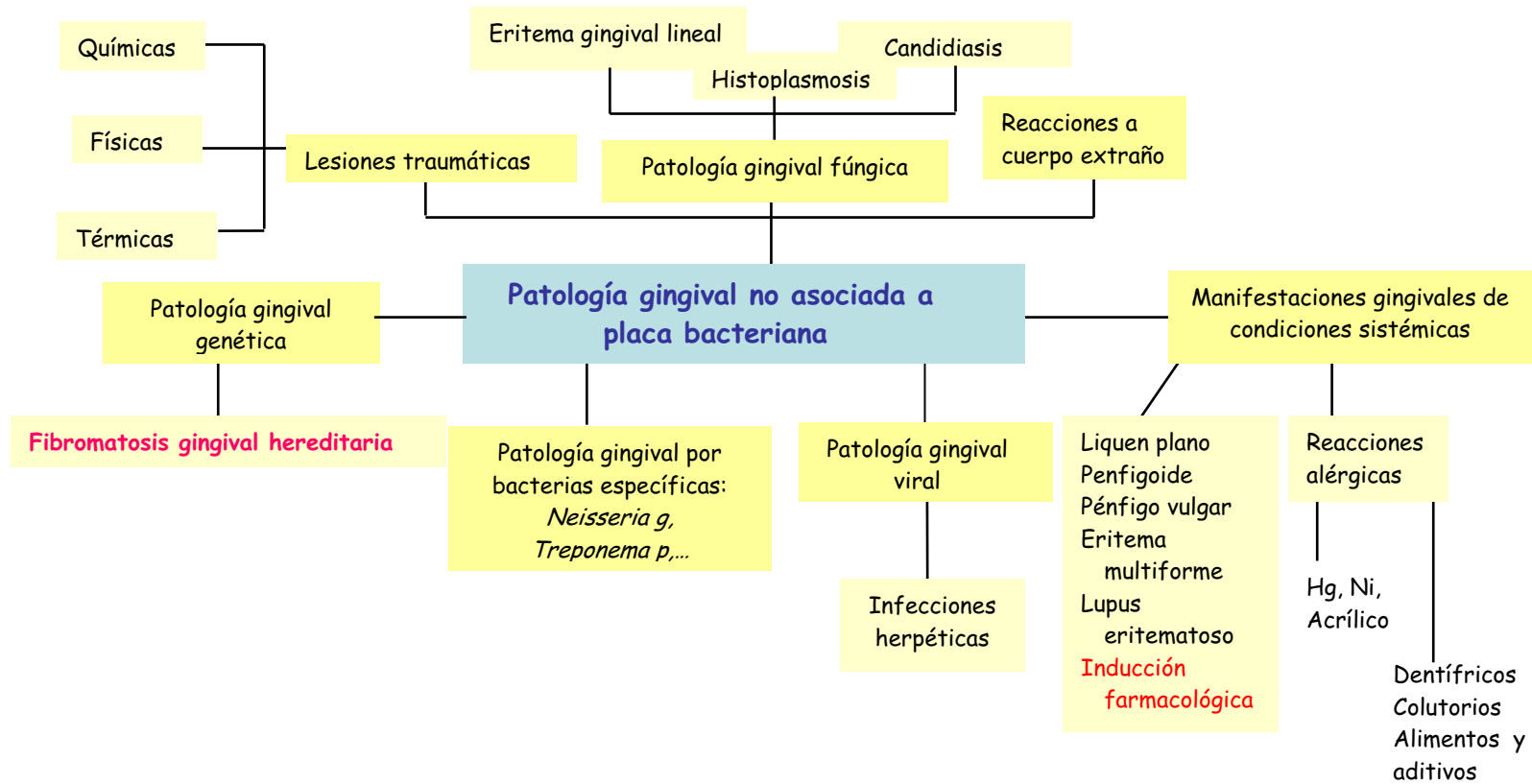
Las distintas categorías de AG que se han descrito -tabla IX- se consideran como diferentes tipos etiológicos de sobrecrecimiento gingival, incluidos en la patología gingival de la reunión de la Academia Americana de Periodoncia (AAP) de 1999 -figuras 3,17 A y B-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 3,17A: Clasificación de la patología gingival relacionada con la placa bacteriana. Aparece el AG inducido por fármacos (AGIF). (International Workshop for a classification of Periodontal disease and conditions 1999 of the American Academy of Periodontology)-

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 3,17B: Clasificación de la patología gingival no relacionada con la placa bacteriana. Se distingue un AG genético familiar hereditario. (International Workshop for a classification of Periodontal disease and conditions 1999 of the American Academy of Periodontology)-

4- EL AGRANDAMIENTO GINGIVAL FARMACOLÓGICO

Esta nominación corresponde al agrandamiento gingival provocado por la administración de fármacos inductores de sobrecrecimiento gingival (AGIF) como efecto adverso. En el apartado 3.2.2.1 se indican, por grupos terapéuticos, algunos de los compuestos que hasta el momento han tenido mayor incidencia y prevalencia de AGIF. A continuación se procede al estudio de sus características.

4.1- Historia del Agrandamiento gingival farmacológico

El AGIF está documentado desde 1939 cuando Kimball observó cambios gingivales en pacientes epilépticos sometidos a terapia con 5.5 difenilhidantoína sódica -fenitoína-. Desde entonces se han iniciado estudios de AG por administración de fenitoína y se han comunicado más casos incluso con otros fármacos antiepilépticos: -fenobarbital -Panuska y cols.1960, 1961-, primidona -Gizgis y cols.1980-, vigabatrín -Katz y cols.1997-.

Otros clínicos e investigadores observaron el mismo efecto en las papilas gingivales con la administración terapéutica de otros fármacos: Rateitschak-Plüss y Wysocki en 1983 con ciclosporina-A -fármaco inmunosupresor descubierto por Borel en 1972- -Wysocki y cols.1983, Rostock y cols.1986-.

Lederman y Ramon de forma independiente en 1984 observaron en pacientes tratados con un fármaco antianginoso e hipotensor -nifedipina- un aumento de volumen de la encía con inflamación y mayor tendencia al sangrado. Los primeros estudios histopatológicos de los casos los presentaron Lucas y cols. en 1985 y Barak y cols. en 1987 con amplia descripción ante la profusión de pacientes sometidos a esta terapia cardiovascular -Fujii y cols. 1994, Seymour y cols. 1996-.

Se han implicado con el AG otros fármacos antagonistas del calcio en menor incidencia y prevalencia que nifedipina:

- diltiazem -Las primeras aportaciones de afectación por este fármaco aparecen en 1986-1987 con Colvard y Giustiniani. Este describe el caso de un paciente que recibió verapamil y a los 15 días

desarrolló AG. Se substituyó por diltiazem y se produjo una remisión, pero el AG reapareció a las 3 semanas -Miranda 1997-. Bowman y cols.1988 refieren un caso de un paciente de 72 años bajo terapia con este fármaco que fue tratado con excisión quirúrgica del tejido agrandado en un par de ocasiones y con recidiva a los meses. El estudio histológico fue característico de AG.

- nitrendipina -Heiji y Sundin en 1988 experimentaron su acción en perros y observaron un AG a las 10 semanas de recibir una dosis alta y mantenerse el sobrecrecimiento después de prolongar la administración del fármaco 2-3 meses más. Brown en 1990 describió el primer caso como fármaco experimental en un paciente adulto diabético con hipertensión arterial (HTA). A las 2 semanas de tratamiento se le indicó una gingivectomía por AGIF al comprobar que con un control de placa bacteriana y raspados no se reducía el AG.
- verapamil -Las primeras referencias de AG por este fármaco corresponden a Cucchi y cols. y a Smith y Glenert hacia el año 1985 - Marshall y Bartold 1998-. Pernu y cols. en 1989 realizaron un estudio exhaustivo sobre un caso aportado. En 1992 Miller y Damm estudiaron la incidencia del AG provocado en una población de 5000 pacientes dentales visitados en 3 años, de los que 24 recibían este fármaco por indicación médica. De ellos sólo 1 manifestó AG clínico - ver 4.3-Epidemiología-.
- felodipina -En 1991 Lombardi y cols. presentaron un caso clínico de un adulto joven con HTA controlada con este fármaco. Después de unas semanas de tratamiento refirió dolor gingival y sangrado. Se realizaron unas sesiones de higiene oral y excisión del tejido exuberante del que se analizaron sus características histopatológicas.
- amlodipina -El grupo de Seymour en 1994 estudiaron 3 casos de pacientes adultos sometidos a este fármaco con afectación de AG a los 3 meses del inicio del tratamiento. Se describe un caso de AG por este fármaco -10mg/día- a los 11 meses de terapia combinada con captopril. Al cesar la administración disminuyó la severidad de la clínica sin necesidad de intervención quirúrgica y con instrucciones de higiene oral -Juncadella y cols.1994-.
- nicardipina -Se describe un caso de un niño de 8 años con una afectación vascular cerebral tratada con este fármaco durante 5 años sin efectos secundarios. Al aumentar la dosis -de 40 a

50mg/día- se produjo la manifestación de AG -Pascual-Castroviejo y Pascual 1997-.

- oxodipina -Su efecto de AG se experimentó con perros a las 7 semanas de tratamiento a unas dosis mucho más altas que las humanas, aunque nunca se relacionó el AG claramente con las dosis del fármaco. En la analítica se observó un incremento de los niveles de fosfatasa alcalina y un descenso de la alanin aminotransferasa. También el mismo grupo de investigación comprobó en ratas el sobrecrecimiento gingival por este fármaco sin el uso de ligaduras. La imagen histológica presentaba el patrón típico de AG sin infiltrado inflamatorio -Waner y cols.1988, Nyska y cols.1990-.

4.2-Estudio de los fármacos inductores de Agrandamiento gingival

El conocimiento de los mecanismos de acción de los fármacos inductores permite determinar su actividad terapéutica así como los efectos secundarios de su uso. En la literatura se encuentran los avances técnicos que han permitido estudiar con exactitud el mecanismo de su acción molecular.

4.2.1-Fenitoína.

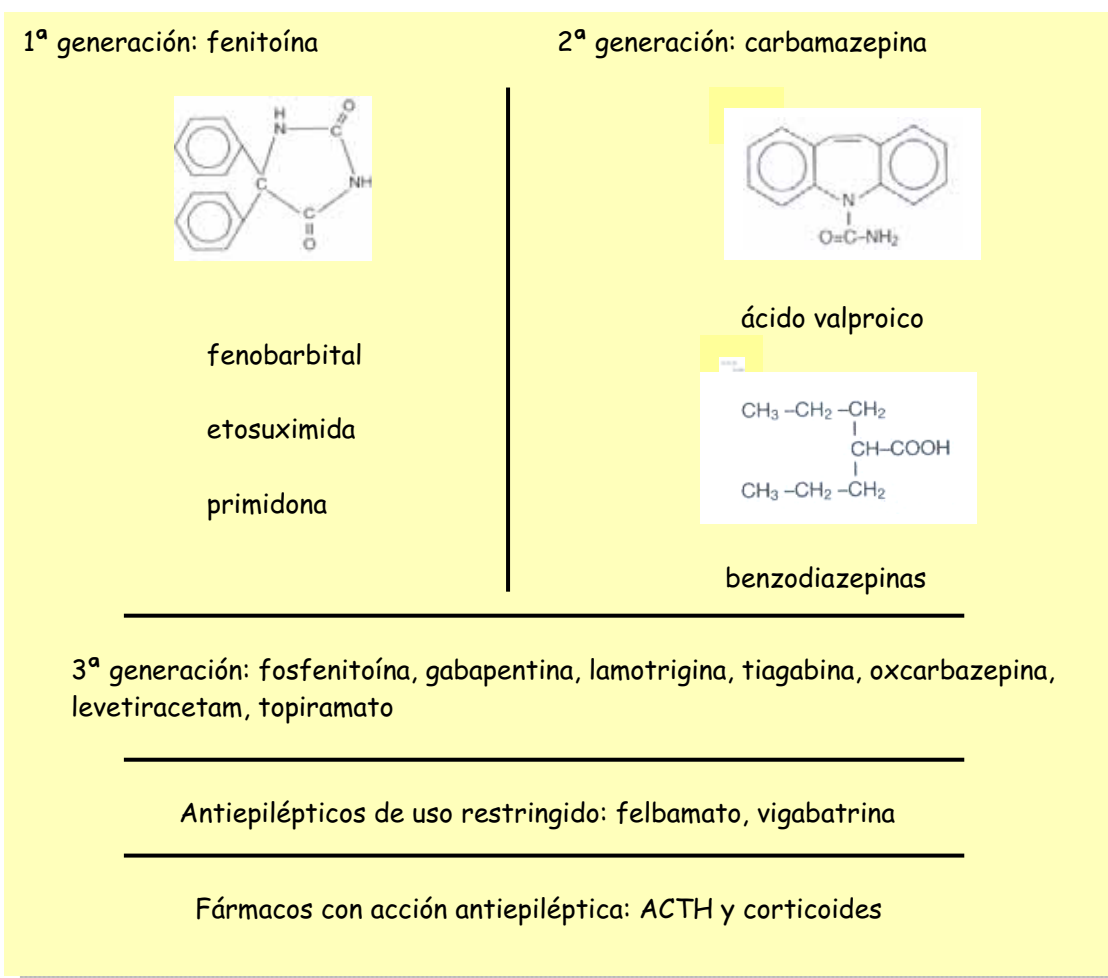
Es un agente antiepiléptico -5,5-difenilhidantoína- de la 1ª generación. Sus características farmacológicas en cuanto a tolerabilidad y con un margen terapéutico limitado facilitaron el estudio de otros compuestos de eficacia similar, con una farmacocinética más cómoda y efectos adversos menores -antiepilépticos de 2ª generación -figura 4,1-.

El mecanismo de acción está en un efecto estabilizador de la membrana por inhibición de los canales de sodio -excitadores- y efecto regulador de la actividad de la bomba Na^+/K^+ , de este modo consigue compensar el desequilibrio iónico que se produce por un exceso de despolarización de la membrana neuronal. En concentraciones altas inhibe la entrada de calcio en la despolarización a través de los canales dependientes de voltaje por lo que se inhibe la liberación de los neurotransmisores inhibidores y excitadores en la terminal presináptica. También se bloquea la entrada de calcio y su movilización intracelular en la neurona postsináptica por lo que interfiere

ESTADO DE LA CUESTIÓN

con la calmodulina y los sistemas dependientes -Guyton y Hall 1996, Armijo y Herranz 2003-. La carbamazepina actuaría de forma similar.

El ácido valproico tiene una acción específica en la estimulación de la síntesis de ácido γ -amino butírico (GABA) y en la reducción de su degradación a nivel de la terminal presináptica. Esta molécula es un neurotransmisor inhibitor en la sinapsis neuronal. Otros antiepilépticos - lamotrigina, topiramato- que también inhiben los canales del sodio y bloquean en la presinapsis la entrada de calcio, reducen la liberación de glutamato -excitador-, óxido nítrico y recaptación de serotonina todos ellos neurotransmisores. La oxcarbazepina tiene una acción similar y también activaría los canales de potasio dependientes de voltaje que son inhibidores de la despolarización.



-figura 4,1: Clasificación de los antiepilépticos y estructura molecular, adaptada de Armijo y Herranz 2003. Sobre el mecanismo de ACTH -hormona adrenocorticotropa- en su posible implicación en el AG ver 4.4-Patogenia-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las indicaciones están en el control de las epilepsias generalizadas tónico-clónicas, epilepsias focales, ausencias y convulsiones clónicas atónicas. También se administran para la prevención de las depresiones en la afectación bipolar, en las convulsiones febriles de la infancia y como analgésico de dolor neuropático -carbamazepina- -tabla X-. El tratamiento de los pacientes a veces es combinado entre distintos antiepilépticos y se individualiza según el cuadro clínico y la respuesta que se produce. Para fenitoína hay que modificar y ajustar las dosis y la pauta de administración por su importante variación interindividual y su margen estrecho de tolerabilidad.

En ocasiones se asocian a fármacos de otros grupos terapéuticos para tratamientos complejos en

- psiquiatría -benzodiazepinas y antipsicóticos-.
- enfermedades neurológicas -como demencias: Valproato, carbamazepina, benzodiazepinas asociados a antipsicóticos, neuralgias postherpéticas: Carbamazepina, gabapentina y en profilaxis de crisis migrañosas: Valproato en combinación con antagonistas del calcio, β -bloqueantes adrenérgicos, y antagonistas de la serotonina-.
- oncología -para el dolor: Carbamazepina asociada a opiáceos-.

En la mayoría de casos asociados también con antidepresivos -Acadèmia Ciències Mèdiques (ACM) 2000-.

	PHT	Cbz	V
convulsiones tónico-clónicas generalizadas	+	+	+
crisis parciales	+	+	+
analgesia	-	+	+
manía	-	+	+
convulsiones febriles	-	-	+
mioclonías	-	-	+
ausencias	-	-	+

-tabla X: Indicaciones de los antiepilépticos más representativos de 1ª y 2ª generación. En las convulsiones tónico-clónicas también están indicados el fenobarbital, la primidona y clonazepam. Si son ausencias también está indicada la etosuximida. PHT:Fenitoína, Cbz: Carbamazepina, V:Valproato. Tomado de Armijo y Herranz 2003-

La farmacocinética se caracteriza de forma específica para cada fármaco representativo. Fenitoína es absorbida en el intestino de forma completa como valproato pero lenta, y aumentada por la presencia de alimentos. Se une a la albúmina en un 90%, el resto en forma libre y su concentración cerebral es entre 5 y 10 veces mayor -Marshall y Bartold 1998-. Una reducción en el porcentaje de unión proteica favorece su distribución a los tejidos diana con mejoría de su eficacia pero con riesgo de mayor toxicidad -Majola y cols.2000, Baños y Farré 2002-. Metabolismo por hidroxilación en el microsoma del hepatocito con reacciones que se saturan a partir de concentraciones séricas determinadas -cinética dependiente de la dosis de tipo creciente-. Presenta un metabolito activo -5-parahidroxifenil-5-fenilhidantoína (P-HPPH)- y autoinducción enzimática. La hemodiálisis no aumenta su eliminación al igual que ocurre con valproato. Junto con carbamazepina, fenobarbital y primidona se comporta como inductor enzimático de otras isoformas del citocromo p-450 para el metabolismo de otros fármacos. Los nitroimidazoles inhiben su metabolismo y aumenta su nivel sérico -tabla XI-.

Carbamazepina tiene una absorción oral lenta e incompleta -a diferencia de valproato- por lo que para evitar dosis altas y repetidas se han buscado formulaciones de liberación sostenida. La unión a albúmina es de un 75% con una concentración cerebral similar a la plasmática e inferior en saliva -20-30%- como ocurre con fenitoína. Su asociación con otros antiepilépticos inductores permite una concentración eficaz más elevada, si se produce la combinación con litio hay que disminuir las dosis de carbamazepina porque aumenta la eficacia y la toxicidad.

Valproato presenta una unión a albúmina del 95% y saturable -cinética dependiente de la dosis y decreciente-. Su concentración plasmática es mayor que la cerebral. Eliminación rápida por metabolismo hepático con glucuronización, β -oxidación -tabla XI-.

Entre los efectos indeseables de fenitoína, aparte del dismorfismo gingival, podría aparecer toxicidad por la variabilidad en la absorción y en el metabolismo. Se citan efectos derivados del sistema nervioso central -ataxia, nistagmos, temblores, diplopía y síntomas psiquiátricos-; alteraciones gastrointestinales -nauseas, vómitos, constipación, dolor abdominal-; problemas dermatológicos -hirsutismo- y complicaciones hematopoyéticas -Marshall y Bartold 1998-.

Se han descrito hasta el momento pocos casos de AG por valproato a pesar de no estar reconocida por otros autores ninguna aportación de dismorfismo gingival, podría tratarse de casos de hipersensibilidad individual o idiosincrasia -Seymour y cols.1985, Marshall y Bartold 1998-. Se considera una terapia alternativa a fenitoína en la prevención del AG así como también la carbamazepina.

Las benzodiazepinas presentan la limitación de la tolerancia si la prescripción es de forma crónica, con efectos adversos del tipo de letargia, somnolencia, incoordinación muscular, hipotonía, ataxia y disartria. En niños aparecen alteraciones cognitivas que dificultan su desarrollo psicomotor y su aprendizaje -Armijo y Herranz 2003-. La interrupción del tratamiento puede provocar un fenómeno de rebote en las benzodiazepinas de acción corta con sintomatología parecida a la del inicio del cuadro. La dependencia física que se crea es consecuencia de un síndrome de abstinencia con síntomas distintos a los anteriores y su intensidad se relaciona con los parámetros farmacocinéticos. Para reducir estos efectos, la interrupción de la dosis ha de ser suave y progresiva -ACM 2000-.

	Dosis	Tiempo niveles plasmáticos estables.
PHT	100-700mg/12h	1 sem
V	400-3000mg/12-24h	12-15 días
Cbz	400-2000mg/8h	3-6 días

-tabla XI: Posología de los fármacos neurológicos
PHT:Fenitoína, V:Valproato, Cbz:Carbamazepina. ACM 2000-

4.2.2- Antagonistas del calcio.

Los bloqueadores de los canales del calcio comprenden un grupo muy amplio de fármacos de diferentes características farmacológicas pero con una acción similar en el manejo y control de los trastornos cardiovasculares, especialmente indicados en la insuficiencia coronaria aguda y crónica -por espasmos o por arteriosclerosis-, la HTA y las arritmias cardíacas. Su denominación obedece al bloqueo molecular de los canales del calcio (Ca) en las membranas celulares de las células miocárdicas y en la células del músculo liso arterial -coronaria, cerebral y periférica-. A nivel cardíaco se

consigue una acción terapéutica de reducción del consumo de oxígeno con un efecto espasmolítico en la arteria coronaria.

4.2.2.1- Canales del calcio.

El calcio iónico $-Ca^{++}$ - es un mensajero fundamental en numerosas funciones celulares. Su concentración está más elevada en el espacio extracelular a razón de unas diez mil veces más con respecto al citosol intracelular. Este gradiente químico unido a una atracción eléctrica hacia el interior celular - que es electronegativo- permitiría el paso masivo de Ca^{++} en un sentido intracelular si no fuera por la membrana bilipídica que dificulta el paso a moléculas e iones eléctricamente cargados -difusión pasiva eléctrica-. El traspaso eficaz de iones a través de la membrana celular se produce por los canales dependientes de voltaje, que son vías proteicas en la misma membrana que en un momento de excitación eléctrica -milisegundos-, se produce un flujo intenso de Ca^{++} hacia el citosol intracelular donde es secuestrado por proteínas y orgánulos citoplasmáticos para la participación en distintos sistemas y reacciones celulares.

Hasta el momento presente se conocen 6 subtipos de canales de Ca^{++} : N, P, T, R, Q y L. Sus diferencias se manifiestan en el umbral de despolarización, la cinética de inactivación, su distinta sensibilidad a los fármacos y toxinas - los T se bloquean por flunarizina, mibefradilo y amilorida; los L por los calcio-antagonistas que constituyen su sitio diana- y por su localización: el N y el P sólo aparecen en las neuronas, el T y el L aparecen además en las células cardíacas, endocrinas, musculares lisas vasculares y no vasculares.

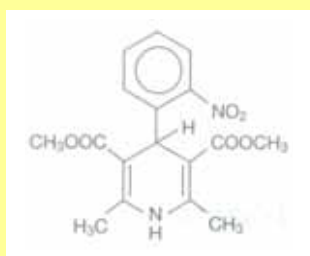
Las proteínas de los canales L están formadas por distintas subunidades $-a_1, a_2, \beta, \gamma, \delta-$. Los antagonistas del Ca se unirían en sitios de la subunidad a_1 . El bloqueo que realizan en los canales presenta una dependencia de uso - verapamil y diltiazem aumentan el bloqueo a frecuencias más rápidas y en cuanto más se abren los canales- y una dependencia de voltaje -estos fármacos tienen más afinidad para bloquear los canales L a potenciales más despolarizados: células nodales de los sinus auricular y auriculoventricular, miocardio isquémico y músculo liso vascular normal-. Esta característica explica que a concentraciones terapéuticas se produce vasodilatación sin modificarse apenas la contractilidad miocárdica, la frecuencia sinusal o la conducción auriculoventricular -García y cols.2003-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

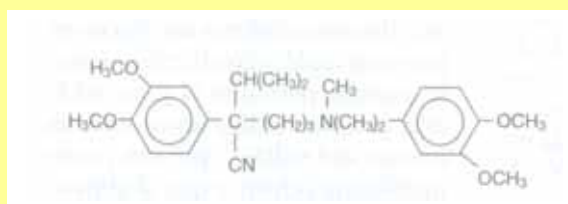
El mecanismo de acción de este grupo terapéutico se produce por la unión a receptores de los canales L. Esta unión provoca el cierre de los canales y la disminución del Ca^{++} citosólico con relajación de la musculatura lisa. Aunque es común para todos los de la familia, la potencia es distinta. En la vasodilatación vascular la nifedipina es el más potente y para evitar los cambios hemodinámicos bruscos se han estudiado formulaciones que permiten una modulación de estas acciones con liberación más lenta del principio activo. Todos los fármacos son antihipertensivos y aumentan el flujo coronario. Su efecto natriurético, aunque leve, evita la retención de fluidos asociada al uso de medicaciones vasodilatadores. En la trama venosa la vasodilatación es mínima.

Por su naturaleza química se clasifican como -figura 4,2-:

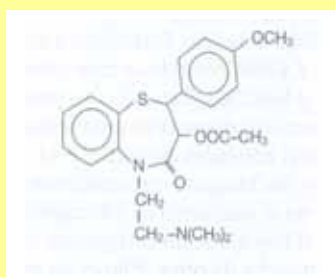
--Dihidropiridinas. Nifedipina, nicardipina, isradipina, amlodipina, nitrendipina, felodipina, nimodipina, lacidipina, nisoldipina.



nifedipina



verapamil



diltiazem

-figura 4,2: Estructura química de los antagonistas del calcio más representativos. Tomado de García y cols.2003-

--Derivados de la fenilalquilamina. Verapamil.

--Derivados de las benzodiazepinas. Diltiazem.

Por sus efectos farmacológicos se clasifican en:

- I. Efecto inotrópico negativo con depresión de la conducción nodal y el ritmo cardíaco. Acción periférica menor. Verapamil.
- II. Se deprime poco la contractilidad y la conductividad. Vasodilatación periférica intensa y menor acción cardíaca. Dihidropiridinas.
- III. Efecto inotrópico negativo suave sobre el músculo cardíaco. Diltiazem. Sus propiedades son intermedias entre los grupos anteriores -Seymour 1991, Consejo General Farmaceuticos (CGF)1994-.

Puede haber diferente afinidad en la red vascular periférica, aunque a efectos prácticos no son muy evidentes salvo la acción de nimodipina en la circulación cerebral en la que su efecto vasodilatador es más potente que el resto de dihidropiridinas -aumenta el flujo cerebral y disminuye la tensión arterial sistémica por consiguiente minimiza las secuelas neurológicas secundarias a un ictus hemorrágico- -CGF 1994, García y cols.2003-.

Los fármacos citados presentan una inhibición alta de la entrada del Ca en las células -alrededor de 90-100%- y su acción es exclusiva sobre el canal L del Ca. Existen otros antagonistas del calcio cuyo bloqueo es menor -50-70%- con la característica de no tener ninguna acción sobre la conducción cardíaca ni *in vivo* ni *in vitro*. Se citan cinarizina, flunarizina, bepridilo y prenilamina -CGF 1994-.

Por su mecanismo de acción se deduce un efecto a nivel central -cardíaco- y y otro a nivel periférico. Por eso en la práctica el criterio más importante en la selección del fármaco estará en distinguir la indicación en la acción periférica o sobre la conducción cardíaca y condicionado a una afectación existente del ritmo cardíaco, a los efectos secundarios y a una terapia combinada con β -bloqueantes -CGF 1994-.

Las dihidropiridinas al ser vasodilatadores más potentes y con menos acciones cardíacas provocan más reflejo vasoregulador que las fenil-bencilalquilaminas. La nifedipina provoca una discreta taquicardia con un ligero

incremento de la contractilidad miocárdica, si hay una disminución de la postcarga se producirá un aumento del gasto cardíaco y de la demanda de oxígeno que podrá conducir a un cuadro de angina en pacientes con riesgo coronario.

En general las indicaciones serían: la HTA, angina de pecho, arritmias supraventriculares -verapamil y diltiazem-, hemorragia cerebral, migrañas, enfermedad de Raynaud y aterosclerosis.

Entre las reacciones adversas se citan como consecuencia de la vasodilatación en un 10% de pacientes cefalea, rubor facial, mareo, edemas periféricos, taquicardia refleja -por nifedipina-. Puede haber a nivel digestivo reflujos gastroesofágicos, estreñimiento -especialmente por verapamil-. Relacionado con la actividad cardíaca se menciona una bradicardia de verapamil y diltiazem por su acción en el nodo sinusal; si se da una asociación con β -bloqueantes podría instaurarse una parada del nodo. También pueden aparecer otros efectos: infarto de miocardio, palpitaciones, alteraciones del sueño, depresión -García y cols.2003- y AG. La incidencia de éste varía según el fármaco siendo más prevalente con la administración de nifedipina -ver 4.3-Epidemiología-.

Las características de los parámetros farmacocinéticos se reflejan en la tabla XII:

Los 3 fármacos son metabolizados por isoformas del citocromo P-450 y son capaces de inhibición enzimática de otras con interacción en el metabolismo de otros fármacos:

- La administración de verapamil puede aumentar los niveles de digoxina hasta un 70%. Por consiguiente en ancianos se reducirá la dosis digitalica a la mitad al igual que en pacientes con insuficiencia renal. Verapamil también incrementa los niveles séricos de teofilina, carbamazepina, atropina y ciclosporina. Presenta otras interacciones: su toxicidad puede ser potenciada por cimetidina, sales de litio y reducida su eficacia terapéutica por rifampicina, diclofenaco, sales de calcio.
- Verapamil y diltiazem producen interacción al combinar con propranolol: reducción de su paso hepático y competencia entre ellos al unirse con las proteínas plasmáticas. Ambos antagonistas

ESTADO DE LA CUESTIÓN

del calcio potencian el inotropismo negativo de los β -bloqueantes y quinidina y la depresión de la conducción atrio-ventricular de los β -bloqueantes y digitálicos. En cambio las dihidropiridinas más vasoselectivas no precipitan el riesgo cardíaco.

- Nifedipina es capaz de incrementar los niveles de quinidina y fenitoína.

fármacos propiedades	Nf	Vrl	Dtz
biodisponibilidad	Oral: 50%	Oral: 20% Lingual: 35%	Oral: 44%
unión proteínas plasmáticas.	96%	90%	80%
semivida	3h	4-9h	4-7h
metabolismo	hepático	hepático	hepático 35% renal
excreción	renal	renal: 80% heces: 20%	renal: 35% heces: 65%
intervalo dosificación	6-8h	8h	6-8h
dosis	10mg/8h 20mg/8h	80m/8h 160mg/8h	60mg/8h 120mg/8h

-tabla XII: Constantes cinéticas de los fármacos representativos de los antagonistas del calcio. Nf: nifedipina, Vrl: verapamil Dtz: diltiazem. La amlodipina se distingue de las otras dihidropiridinas por su vida media más larga -entre 35 y 50h-. Tomado de Marshall y Bartold 1998, García y cols.2003, CGF 1994 y adaptado-

4.2.3-Ciclosporina A

Este fármaco es un polipéptido cíclico hidrofóbico obtenido de la fermentación de *Trichoderma polysporum* y *Cylindrocarpon lucidum* con una actividad inmunosupresiva potente, sin ser mielotóxico, y clasificado como no esteroideo con diferentes acciones selectivas centradas en la respuesta de la población linfocitaria T -inhibe su proliferación en la fase de ciclo celular G_0 a G_1 - con nula o mínima acción sobre los linfocitos B:

Su mecanismo de acción se produce por la unión a una proteína citosólica ubícua -ciclofilina, receptor intracelular- que es una inmunofilina -Colombani y cols.1985-. Este complejo se fija a calcineurina -activada por calcio/calmodulina- y

- *Inhibe su actividad enzimática -fosfatasa- para la translocación de un factor de transcripción NF-AT⁴ necesario para la expresión de citocinas -IL2, IL4, TNF...- y se bloquea el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos T por inhibición de las señales calcio-dependientes que intervienen en su activación -Abbas y Lichtman 2004-*
- *Bloquea la disociación de NF-kB⁵+IκB en el citoplasma del linfocito T en reposo, por inhibición de las cinasas que activan la disociación. Cuando el linfocito T se activa NF-kB se fosforila y se disocia de su inhibidor lo que permite la translocación hacia el núcleo y activar la transcripción de citocinas: IL2, IL3, IL4, IL5, INFγ, TNFα, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos.*
- *Aumenta la síntesis de TGFβ en linfocitos T y en células renales y endoteliales.*
- *Inhibe la activación de los macrófagos*

En consecuencia, su acción es directa a los componentes citoplasmáticos con independencia de los niveles de concentración de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) -Metzler y cols.1989-.

La ciclosporina se indica en la prevención del rechazo de injertos en procedimientos de trasplantes de órganos y en la prevención de la enfermedad *injerto versus hospedador* que se acompaña en el trasplante de médula ósea. También se emplea en el tratamiento de enfermedades autoinmunes -*diabetes mellitus* insulino dependiente, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoidea, colitis ulcerosa, enfermedad de Cröhn, líquen plano rojo-.

Su vía de administración es oral, intramuscular o endovenosa. La absorción intestinal es irregular por su marcada variabilidad interindividual. La máxima concentración plasmática se alcanza a las 3-4 horas de la administración con

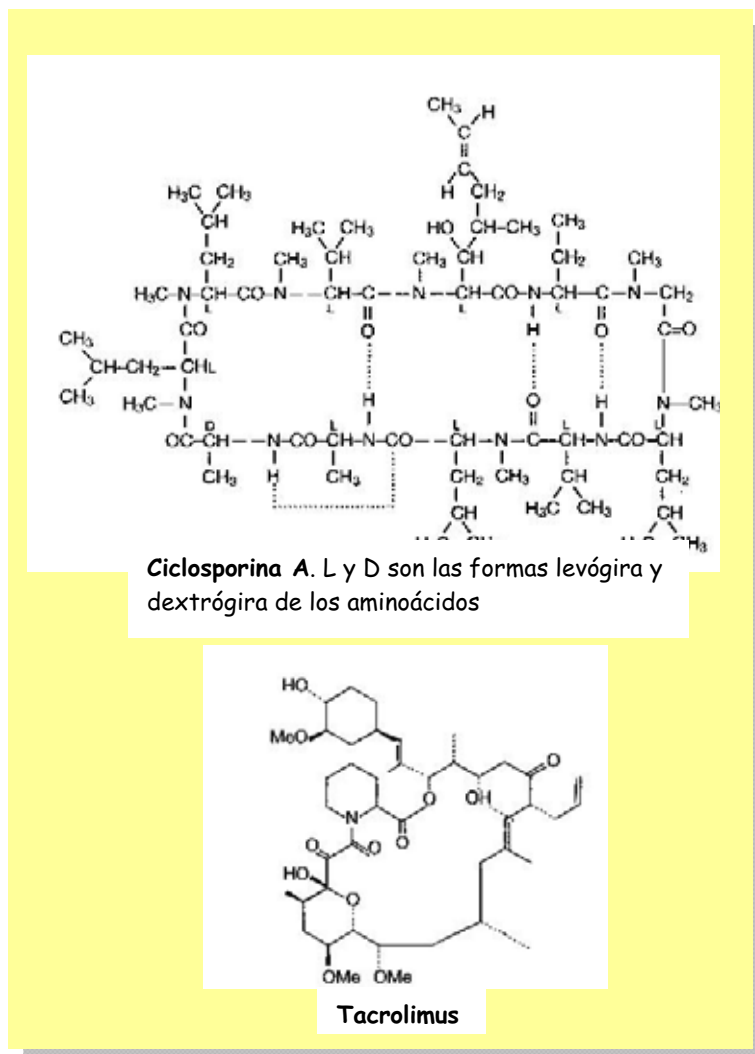
⁴ NF-AT: Factor de transcripción nuclear de los linfocitos T activados.

⁵ NF-kB: Factor de transcripción nuclear que se activa en respuesta a señales transmitidas por receptores. Unido a IκB en el linfocito en reposo.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

una semivida sérica de entre 17 y 40 horas. Se une en un alto porcentaje a eritrocitos y lipoproteínas y, en cambio sólo un 5% circula libre en plasma. Es metabolizada especialmente en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P450 -isoenzima CYP3A4- mediante las reacciones de hidroxilación, ciclización y demetilación, aunque también se produce biotransformación en intestino delgado y riñón. La mayoría de los metabolitos son excretados por la bilis a las 6h a través de las heces y sólo un 10% por el riñón -Baños y Farré 2002-figura 4,3-.

El rango terapéutico de dosificación para la inmunosupresión oscila entre 10-20 mg/kg/día para obtener unos niveles séricos de 100-400 ng/ml. Se inicia unas horas antes del trasplante hasta unas semanas después.



-figura 4,3: Estructura molecular de ciclosporina y de tacrolimus-

A partir de entonces se va reduciendo la dosis mensualmente hasta conseguir unas dosis de mantenimiento de 6-8 mg/kg/día. La presentación por vía oral es en cápsulas de 25 mg, 50 mg y 100 mg, y en solución (100 mg/ml). Conviene tomarla antes de las comidas -30 mi-. En muchas ocasiones su administración se asocia a prednisona que también previene y controla los problemas de rechazo.

Entre los efectos adversos de ésta se citan la retención de líquidos y de iones, diabetes, debilidad muscular, descalcificaciones, hepatotoxicidad, afectación neurológica -temblor, insomnio-, cefaleas, HTA. Para controlar la HTA secundaria a su administración se asocia nifedipina que también reduce su nefrotoxicidad. Será importante controlar con periodicidad la tensión arterial y los niveles séricos de creatinina -no deben superar 2 mg/100ml-, ácido úrico y potasio. Otros efectos secundarios que se han observado son: predisposición a linfomas e hirsutismo -CGF 1994-. Según un estudio con transplantados renales que recibían ciclosporina un porcentaje muy alto presentaban candidiasis detectada en la saliva y algunos casos de herpes simple y carcinoma oral escamoso. En comparación, los pacientes sometidos a tacrolimus sólo presentaban una menor prevalencia de candidiasis salival -Spolidorio y cols.2006-.

Tacrolimus -también inmunosupresor micótico- actúa de forma similar con unión a otra proteína distinta a la ciclofilina -figura 4,3-. Se administra en pacientes receptores de trasplantes hepáticos y como segunda elección en casos tratados con ciclosporina no bien controlados -Abbas y Litchman 2004-. Se presenta en cápsulas de 0,5 mg, 1 mg y de 5 mg con un intervalo de 12h y se ingiere 1 hora antes de las comidas. Entre sus efectos adversos conviene citar caída del cabello, diabetes, insomnio, diarreas y temblor.

Al presentar ciclosporina un índice terapéutico estrecho puede ser objeto de una interacción farmacológica:

- Reducen sus niveles séricos: Fenitoína, fenobarbital, isoniazida, rifampicina.
- Aumentan sus niveles séricos: Anfotericina B, eritromicina, cimetidina, ketoconazol, metilprednisolona.
- Se potencia su nefrotoxicidad al asociarse con fármacos que son nefrotóxicos: aminoglucósidos, sulfamidas, tetraciclinas, antiinflamatorios no esteroideos. Actualmente se tiende a substituir por otros inmunosupresores con menos efectos adversos -tacrolimus, rapamune-.

4.3-Epidemiología: Incidencia y Prevalencia del Agrandamiento gingival farmacológico. Factores de riesgo

Los datos en la incidencia y prevalencia del AGIF son muy variables según el fármaco a considerar y los estudios presentados por distintos autores. Es posible que las diferencias en los valores obtenidos sean atribuidas al índice de agrandamiento gingival utilizado, tipo de estudio y características de la muestra -variabilidad en el tamaño, edad de los pacientes estudiados, enfermedad que se trata y medicamentos adicionales-, posología en la administración -dosis de los fármacos, tiempo de exposición al producto activo- y a la ausencia de criterios objetivos para consensuar y cuantificar el grado de sobrecrecimiento gingival.

Se presentan las características de algunos estudios y los resultados observados en la prevalencia de AG de los tres fármacos.

- **Fenitoína.** Las muestras de los pacientes estudiados se caracterizan por ser la mayoría adultos con distinción entre los que son controlados de forma ambulatoria y los ingresados en centros hospitalarios. La prevalencia de AG varía también con un amplio margen: entre un 10% hasta un 84% entre los autores consultados. Fenitoína es el fármaco neurológico que reporta mayor AG -Brunet y cols.2001- -tabla XIII-.
- **Antagonistas del Calcio.** Los valores de prevalencia del AG aportados por los diferentes estudios revisados varían según los diversos fármacos de este grupo terapéutico: para nifedipina oscilaría desde un 7% hasta un 43.6%, isradipine no se asociaba con sobrecrecimiento y se prescribía como terapia substitutiva. Verapamil y diltiazem presentaban menor prevalencia de AG -Pernu y cols.1989, Cebeci y cols.1996ab- -tabla XIV-.
- **Ciclosporina A.** Sus aplicaciones terapéuticas están en transplantes de distintos órganos en los que predominan los renales, hepáticos, cardíacos y pulmonares en muestras de pacientes en edad infantil y enfermedades autoinmunes -diabetes mellitus, lupus eritematoso, esclerosis múltiple-. El margen de variabilidad observado de AG oscila entre un 8% hasta un 85%. Si se produce la asociación con antagonistas del calcio la prevalencia aumenta -Slavin y Taylor 1987, Pernu y cols.1993b-. Con otros inmunosupresores no se obtienen datos de incidencia en la aparición de AGIF -tabla XV-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

autor	fármaco	muestra	prevalencia	patología
Angelopoulos-Goaz 1972	PHT	173 hospitalizados	53%	epilepsia esquizofrenia
Peñarrocha -cols.1989a	PHT PHT+PHB . . PHT+Cbz PHT+fármacos	. 104 epilépticos 1 espasmofacial . .1 neuralgia de trigémimo	42,2 %	epilepsia neuralgia de trigémimo
Peñarrocha-cols.1990	PHT	60 epilépticos	50%	epilepsia
Thomason-cols.1992	PHT	ambulatorios 23 con 23 cas	13%	epilepsia
Ball-cols.1996	PHT PHT+Cbz PHT+V PHT+fármacos	36 adultos: 17 PHT 8 PHT+Cbz 7 PHT+V 4PHT+fármacos	47.2%	epilepsia
Majola-cols2000	PHT	134 pacientes	62%	epilepsia
Brunet-cols.2001	PHT #anticonvulsivantes	37 cas 22 cas 98 con	73% 31.8%	epilepsia

-tabla-XIII: Estudios de prevalencia de AG por PHT -fenitoína-. PHB:Fenobarbital
Cbz:Carbamazepina, V:Valproato, #:otros anticonvulsivantes, cas: Caso, con: Control-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

autor	fármaco	muestra	prevalencia	patología
Barclay-cols.1992	Nf	19 Nf 9 atenolol 19 con	22%	cardiovascular- HTA
Miller-Damm 1992	Vrl	24 total 1 cas	4.1%	cardiovascular- HTA
Pernu-cols.1993b	Cs+Dhp Dhp	14 Dhp+Cs 14 Dhp	35% 21%	transplante renal uremia
Lowry - cols.1995	Nf+Cs	19 niños	52%	transplante cardíaco
Nery-cols.1995	Nf	181 cas 71 con	43.6%	cardiovascular HTA
Westbrook-cols.1997	Nf isradipina	14 adultos	66%	HTA
Miranda 1997	Dhp Dtz Vrl	118 cas 147 con	33.3% 31.3% 21.4%	cardiovascular
Jorgensen 1997	Aml	150	3.3% ns	cardíaca
Ellis - cols.1999	Nf Aml Dtz	442 181 186 102 con	6.3% ns ns	cardio-vascular
James-cols.2000a	Nf+Cs Aml+Cs	89 Nf+Cs 46 Aml+Cs	53% 72%	transplante renal
Miranda-cols.2001	Nf	65 cas 147 con	33.8% 4.1%	cardiovascular
Miranda-cols.2005	Dtz Vrl	46 cas 49 con	31% 21%	cardiovascular

-tabla-XIV: Estudios de prevalencia de AG por antagonistas del Ca. Nf:Nifedipina, Cs:Ciclosporina, Dhp:Dihidropiridinas, Vrl:Verapamil, Dtz:Diltiazem, Aml:Amlodipina, HTA:Hipertensión arterial, cas: Caso, con: Control, ns: No significativo-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

autor	fármaco	muestra	prevalencia	patología
Daley - cols.1986	Cs	100 adultos	>70%	DM, LE, EM transplantado
Slavin - Taylor 1987	Cs+Nf Cs	55 Cs+Nf 40 Cs	51% 8%	transplantado
Stone - cols.1989	Cs	40 cas 50 con	58% 36%	EM
Seibel - cols.1989b	Cs	12 perros beagle	42%	experimental
Pernu - cols.1993b	Cs Cs+Dhp Dhp	21 Cs 14 Cs+Dhp 14 Dhp 14 con	24% 35% 21%	renal renal uremia
Thomason- cols.1993	Cs+Nf Cs	23 Cs+Nf 32 Cs	47.8% 37.5%	renal
Wondimu-cols.1993	Cs	32 niños	13%	renal
Allman - cols.1994	Cs	26 niños	84.6%	renal, hepático
Hefti - cols.1994	Cs	40 cas 50 con	35% 14%	EM
Somacarrera 1994b	Cs	100 adultos	43%	cardíaco,renal, hepático
Cebeci - cols.1996b	Cs Cs +Vrl	22 cas 29 cas	40.91% 51.72% ns	renal
Karpinia - cols.1996	Cs	49 niños	77.5%	renal
Margiotta- cols.1996	Cs Cs+Nf Azt	61 Cs 28 Cs+Nf 24 Azt con	33.7%	renal
Kilpatric - cols.1997	Cs	31 niños		
Wondimu - cols.1997	Cs + Nf	68 niños	19%	renal
Wilson - cols.1998	Cs en politerapia	145 adultos 60 jóvenes	48% 30%	renal
Spratt - cols.1999	Cs	84 cas 36 con	49%	renal
Montebugnoli-2000	Cs	21 adultos	33%	cardíaco
Sheehy - cols.2000	Cs +- Nf	niños 27 cas 27 con	41% monoterapia y combinación	hepático
Thomas - cols.2001	Cs Cs + Nf	45 191	48%	renal
Khoori- cols.2003	Cs Cs+Nf	98 Cs 21 Cs+Nf	6% 52%	renal

-tabla-XV: Estudios sobre la prevalencia de AG por Cs -ciclosporina A-. Nf: Nifedipina, DM: Diabetes Mellitus, LE: Lupus eritematoso, EM: Esclerosis múltiple, Dhp: Dihidropiridina, Vrl: Verapamil, Azt: Azatioprina, cas: Caso, con: Control, ns: No significativo-

4.3.1-Factores de riesgo del Agrandamiento gingival farmacológico.

Se observan unos indicadores epidemiológicos que influyen en la prevalencia y en la severidad del AG y su acción se interrelaciona potenciando este efecto o favoreciendo su permanencia. Se citan: posología -dosis y tiempo de exposición al fármaco-, concentración de los fármacos -sérica, en saliva y en flujo gingival-, politerapia, edad, sexo, higiene oral y grado de inflamación gingival.

4.3.1.1-Presentación del fármaco y dosificación. Presencia en los fluidos.

La dispensación del fármaco -ciclosporina- en solución aumenta la prevalencia y la severidad del AG en comparación con la presentación en cápsulas por la exposición directa del principio activo en encías y mucosas -Wondimu y cols.1996- En la saliva se observaron diferencias altamente significativas en la presencia del fármaco según la dispensación en cápsulas o en líquido: 5,4//2867 ng/ml respectivamente -Modéer y cols.1992a-. También la presencia de ciclosporina en saliva está significativamente relacionada con el grado de AG y con el índice de placa bacteriana -McGaw y cols.1987-.

Son muchas las aportaciones en la literatura referentes a la posible relación que puede existir entre las dosis terapéuticas de los fármacos inductores y la aparición de AG así como de sus niveles plasmáticos o el de sus metabolitos y su presencia en los fluidos de la cavidad oral; las conclusiones son variadas y contradictorias.

Algunos autores han observado una relación directa proporcional entre dosis de administración del fármaco y AG, con implicación de la farmacocinética en algunos estudios y de la relación de la concentración plasmática del fármaco con el AG. Hay acuerdo en que existe un umbral de concentración sérica por encima del cual se produce el AG sin incrementarse la severidad que dependería de otros factores -Daley y cols.1986, Brown y cols.1991a-:

- Little y cols.1975 observaron cambios en el aspecto clínico del AG provocado por fenitoína según un margen de variabilidad de dosis de administración del fármaco y de sus niveles séricos.

- Addy y cols.1983 confirmaron una correlación positiva entre dosis diaria de fenitoína y dosis fenitoína/peso con severidad del AG. Del mismo modo un incremento de los niveles séricos aumentaba la gravedad del AG. Los niveles de folatos fueron bajos en el margen de normalidad y no tuvieron ninguna relación con el AG.
- Seymour y cols.1987 observaron que en 24 adultos transplantados renales, hubo correlación significativa entre las concentraciones séricas de ciclosporina y AG en 6 meses de investigación.
- Seibel y cols.1989b realizaron un estudio con 12 perros *beagle* y comprobaron un nivel plasmático más elevado a las 3, 6 y 10 semanas en perros con fibroblastos reactivos -*fibroblastos responder*-.
- Hefti y cols.1994 en una muestra de pacientes con esclerosis múltiple observaron que si los niveles séricos igualaban o superaban 400 ng/ml había una incidencia significativa de AG; de un 17% de prevalencia de AG por ciclosporina se obtenía un 59%.
- Somacarrera y cols.1994b en su estudio concluyeron que el nivel sérico de ciclosporina es un predictor importante del AG en su severidad.
- Thomason y cols.1997 observaron una relación directa entre la concentración sérica de nifedipina -factor de riesgo- y el grado de severidad de AG en pacientes transplantados y con independencia de la concentración en flujo crevicular.
- Wondimu y cols.1997 comprobaron que la presentación de AG por ciclosporina en un grupo de 68 niños transplantados renales tenía una relación positiva con la dosis oral diaria, con la concentración media plasmática de ciclosporina y con la administración concomitante con nifedipina. También se observó que los niños con AG presentaban mayor fracción de filtración renal que los niños sin AG mientras que el flujo plasmático renal era similar en ambos grupos.
- Thomas y cols.2001 en una muestra de 236 pacientes sometidos a trasplante renal y que recibieron ciclosporina se observó una correlación significativa entre la dosificación y los niveles séricos a los 3, 6 y 12 meses post-trasplante con respecto a la extensión y severidad del AG ($p < 0.0001$). No se observó ninguna relación con la tasa de filtración glomerular.
- Yamada y cols.2001 observaron una relación estadísticamente significativa entre dosis altas de fenitoína y AG ($p < 0.05$) al comparar con las dosis de los pacientes sin AG. Además los niveles séricos de fenitoína eran también significativos ($p < 0.01$) en los pacientes con AG.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

- Thomason y cols.2005 en un estudio con 100 pacientes transplantados que recibían ciclosporina en régimen de monoterapia se observó que la dosificación era un factor de riesgo del AG.

Se han presentado estudios con ratas donde también se aporta una relación directa entre dosis y AG:

- Ishida y cols.1995 observaron una relación directa y positiva entre la cantidad de nifedipina en la dieta y su concentración sérica con el AG provocado, al administrar una dosis distinta para cada grupo de ratas. La duración del tratamiento también mantuvo una correlación positiva con el AG hasta el día 20 a partir del cual ya no hubo más sobrecrecimiento gingival.
- Nishikawa y cols.1996 comprobaron que a partir de un umbral plasmático por aumento progresivo de la dosis la incidencia es máxima y la severidad dependiente.

En cultivos de fibroblastos la dosis del fármaco afectaba de forma inversa su proliferación:

- Sobhani y cols.1989 en un estudio *in vitro*, 9 cepas de fibroblastos alteraron sus componentes: todas sufrieron inhibición de la proliferación con dependencia de la dosis de ciclosporina; 3 de ellas a 100 ng/ml elevaron la síntesis de proteínas de la matriz. A 400ng/ml se afectaron 5 y a 1000 ng/ml 8 se afectaron positivamente.

La dosificación del fármaco por sí mismo es un mal predictor de su concentración sérica porque influyen otras variables: el peso corporal, la absorción, la alteración del metabolismo y la excreción si hay disfunción renal -Chabria y cols.2003-. Parecería más lógica una relación del AG con la biodisponibilidad, grado de unión a proteínas, volumen de distribución y concentración del fármaco/tiempo -Seymour y cols.2000-.

Se presentan otros estudios que verifican una falta de correlación entre dosis del fármaco inductor, niveles séricos y desarrollo del AG, así se pueden citar:

- Angelopoulos y Goaz 1972, no observaron ninguna asociación en su estudio sobre la incidencia del AG por fenitoína en 173 pacientes epilépticos hospitalizados.
- Wysocki y cols.1983, en un estudio clínico e histopatológico de 6 casos en el que no apreciaron diferencias significativas en dosificación ni en niveles plasmáticos de ciclosporina entre pacientes con y sin AG.
- Hassell y cols.1984, en una población de 77 pacientes epilépticos y discapacitados hospitalizados, no se observaron correlaciones significativas entre el AG y dosificación diaria de fenitoína y sus niveles plasmáticos.
- Dahllöf y Modéer 1986, realizaron un control preventivo de placa bacteriana durante 2 años en un grupo de 16 niños epilépticos y no se observó ninguna relación entre dosis de fenitoína y sobrecrecimiento gingival.
- Daley y cols.1986, en la muestra de 100 pacientes no hubo ninguna correlación con el grado de AG en el rango de dosis ni en los niveles plasmáticos.
- McGaw y cols.1987 examinaron 30 pacientes transplantados renales y no observaron correlación entre el AG por ciclosporina y el nivel sérico del fármaco aunque sí hubo entre éste y concentración de ciclosporina en saliva parótida y mandibular. Al comparar entre pacientes con fibroblastos *responder* y *non responder* no se apreciaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos ni en saliva.
- Slavin y Taylor 1987 no apreciaron correlación de AG con los niveles séricos de fármaco en pacientes sometidos a monoterapia con ciclosporina y a politerapia de nifedipina-ciclosporina y en comparación con los que no presentaban AG.
- Peñarrocha y cols.1989a, 1990 en los 2 estudios con 106 y 60 pacientes epilépticos respectivamente, no se observó ninguna correlación clínica significativa de AG con niveles séricos ni con dosis diaria de fenitoína.
- Schulz y cols.1990 en su estudio clínico de 80 pacientes transplantados renales, no observaron correlación con la dosis ni con los niveles séricos de ciclosporina.
- Seymour y Smith 1991 estudiaron clínicamente a 27 pacientes sometidos a trasplante renal y no observaron relación a los 6 meses de fase higiénica entre los 2 grupos randomizados en cuanto a posología y concentración sérica de ciclosporina y parámetros periodontales.
- Barclay y cols.1992 no pudieron establecer una correlación entre el AG y la dosis diaria de nifedipina durante un período de 6 meses en una muestra de 19 pacientes con patología cardiovascular.

- Pernu y cols.1992 los pacientes transplantados renales *responder* no presentaban diferencias en las concentraciones hemáticas de ciclosporina con respecto a los *non responder*.
- Ellis y cols.1993b no observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes con fibroblastos *responder* y los *non responder* sometidos a terapia con nifedipina en los parámetros periodontales y las variables farmacocinéticas.
- King y cols.1993 comprobaron que en 66 pacientes transplantados renales el AG no se relacionó de forma significativa con la dosificación de ciclosporina ni con sus niveles séricos en el grupo de monoterapia ni en los otros dos de terapia combinada con calcio-antagonistas.
- Pernu y cols.1993b en monoterapia de nifedipina o combinación con ciclosporina no se observó relación de dosis con la aparición de AG.
- Thomason y cols.1993 no apreciaron en su estudio ninguna relación con las dosis de ciclosporina en el grupo que recibió monoterapia ni en el de terapia combinada con nifedipina.
- Wondimu y cols.1993 realizaron un seguimiento de un grupo de 32 niños transplantados renales con tratamiento inmunosupresor y observaron que ni las dosis diarias ni los niveles de ciclosporina séricos tuvieron diferencias significativas en los niños con AG al comparar con los que no lo presentaban, pero sí que se observó una correlación directa a los 6 meses post-transplante entre dosis total y AG y también entre dosis media diaria y AG.
- Allman y cols.1994 no observaron relación del AG con los niveles séricos de ciclosporina en un grupo de 26 niños transplantados.
- Hosey y cols.1995 en 55 niños con transplante hepático no se observó ninguna relación entre concentración sérica de Cs y severidad del AG.
- Lowry y cols.1995 en 19 niños transplantados cardíacos sometidos a terapia con ciclosporina y nifedipina no encontraron diferencias significativas en los parámetros de dosis de los fármacos y niveles séricos al comparar entre los grupos con AG significativo y moderado.
- Nery y cols.1995 en los 181 pacientes estudiados no se observó ninguna relación significativa entre dosis de nifedipina y AG.
- Ball y cols.1996 en un estudio de 36 pacientes epilépticos no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de fenitoína y su metabolito entre pacientes con AG y los que no presentaban sobrecrecimiento gingival.
- Cebeci y cols.1996ab no observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento -ciclosporina y ciclosporina con verapamil- y los controles en las variables periodontales y farmacológicas estudiadas.

- Karpinia y cols.1996 observaron que la posología de ciclosporina/día no fue diferente entre los niños que presentaban AG al comparar con los que no lo manifestaban.
- Margiotta y cols.1996 los pacientes *responder* no presentaban una correlación significativa entre el AG y las variables farmacológicas.
- Montebugnoli y cols.1996 estudiaron en 39 pacientes transplantados renales la relación entre parámetros periodontales y variables farmacológicas de ciclosporina y no encontraron ninguna relación entre ellas, ni con las dosis.
- Thomason y cols.1996a en una cohorte de 172 pacientes transplantados en la que se relacionaron diversos parámetros periodontales, farmacológicos y genéticos en el fenotipo HLA. No se observó en el análisis de regresión múltiple ninguna implicación de riesgo en las variables farmacocinéticas de ciclosporina con respecto al sobrecrecimiento gingival. Sí que hubo correlación con el nivel sérico de creatinina.
- Kilpatrick y cols.1997 comprobaron que la dosis diaria de ciclosporina ajustada al peso no se relacionaba con la severidad del AG.
- Nakou y cols.1998 comprobaron que las dosis de nifedipina no fueron predictores significativos del AG en un estudio de 35 pacientes con enfermedades cardiovasculares.
- Varga y cols.1998 comprobaron que los niveles séricos de ciclosporina no mostraban diferencias entre los grupos de pacientes clasificados según el grado de severidad del AG en el período post-transplante. Tenían más implicación los parámetros periodontales que los farmacológicos.
- Majola y cols.2000 no observaron ninguna relación entre niveles séricos totales de fenitoína y AG aunque sí había correlación entre concentración plasmática de fenitoína libre y AG en análisis multifactorial, tampoco con la concentración sérica de folato y AG ya que se ha comprobado que fenitoína interfiere la absorción de ácido fólico con decrecimiento de los niveles séricos de folatos.
- Montebugnoli y cols.2000 en un grupo de transplantados cardíacos no se encontraron diferencias significativas entre pacientes *responder* y *non responder* en los niveles séricos de ciclosporina y en el análisis estadístico tampoco se correlacionó el índice de placa con el valor de ciclosporina plasmática.
- Hosey y cols.2002 en una población de estudio de 34 niños transplantados hepáticos no se obtuvo correlación entre los niveles séricos de ciclosporina y la severidad del AG.

- Khoori y cols.2003 en su estudio no observaron diferencias significativas al comparar dosis de ciclosporina, de nifedipina, ni concentración sérica de ciclosporina entre el grupo que recibía terapia combinada -21 pacientes- y el que recibía sólo ciclosporina -98 pacientes-.
- Romito y cols.2003, 2004 en un grupo de pacientes transplantados cardíacos bajo terapia con ciclosporina no se encontraron diferencias significativas entre aquéllos que presentaban AG y los que no presentaban sobrecrecimiento gingival en cuanto a las dosis del fármaco y otros parámetros clínicos periodontales.

4.3.1.1.1-Relación del fármaco en el flujo gingival crevicular.

En pacientes con AG por nifedipina y por amlodipina sí que se observaron secuestros significativos en el flujo gingival crevicular con unas concentraciones locales más altas que con respecto a niveles de nifedipina y amlodipina plasmáticos -Ellis y cols.1992,1993b, Seymour y cols.1994, Thomason y cols.1995-. La presencia de nifedipina se observó incluso en pacientes *non responder* - Ellis y cols.1993a-. Al parecer las concentraciones locales de nifedipina aumentan en presencia de inflamación gingival y depósito de placa bacteriana sin depender de la profundidad de sondaje del AG ni de la concentración plasmática, aunque ésta ha sido considerada como un factor de riesgo para la severidad del AG -Ellis y cols.1995, Thomason y cols.1995,1997-. Estos niveles elevados de nifedipina en el flujo crevicular podrían explicar la predisposición al crecimiento de la papila.

Para fenitoína sí se observó una correlación entre los niveles en el flujo crevicular y la concentración plasmática de fenitoína, pero tampoco se podía relacionar la concentración de fenitoína en el flujo crevicular con el grado clínico del AG, ni la inflamación aumentaba la concentración local de fenitoína -Mc Laughlin y cols.1995-.

No se ha podido comprobar el secuestro de ciclosporina disuelta en el líquido crevicular pero sí que se han observado concentraciones de reserva en la placa bacteriana -McGaw y cols.1987- y también para fenitoína -Brown y cols.1991a-.

4.3.1.1.2-Relación del fármaco en la saliva.

Hay autores que creen que la concentración de ciclosporina en saliva tiene relación con el AG. En el estudio de Modéer y cols.1992a se observa un nivel alto de ciclosporina en saliva completa después de haber ingerido el fármaco, especialmente en forma de solución. En pacientes susceptibles a tener AG -por fibroblastos *responder*- habría una concentración de ciclosporina en saliva muy alta -Phillips y cols.1986, McGaw y cols.1987, King y cols.1993, Hefti y cols.1994- Se cree que pueda influir ciclosporina de forma directa en el conectivo gingival a través del epitelio por su naturaleza lipofílica.

Con referencia a la concentración de fenitoína en saliva también puede haber relación directa con AG según Conrad y cols.1974 -citado en Brown y cols.1991a-. Se ha comprobado que habría una correlación positiva directa entre diferentes parámetros farmacológicos y la concentración en saliva al comparar con dosis diaria de fenitoína y sus valores séricos, según un estudio realizado en 62 pacientes discapacitados en centro hospitalario y con régimen de politerapia asociada a fenitoína -Hassell y cols.1983-. Aunque hay autores que no lo consideran así y no observan ninguna correlación entre niveles de fenitoína y su metabolito en saliva con relación a la extensión del AG -Hassell y cols.1984-, Thomason y cols.1992, Ball y cols.1996-.

4.3.1.2-Tiempo de exposición al tratamiento.

La aparición del AG con la administración del fármaco inductor es presumible que dependa, como se ha expuesto, de la influencia de una concentración mínima hemática y de su presencia en la saliva y en el flujo gingival crevicular. La variable que se considera ahora en la posología -exposición temporal al fármaco-, al igual que para la dosificación en la que se han aportado opiniones contrarias por distintos autores, también permite unas conclusiones diversas según los estudios presentados.

Según Little 1975, sí hay relación entre AG por fenitoína y duración del tratamiento recibido aunque no parece haber una relación lineal -Majola y cols.2000-.

La misma relación positiva entre exposición a ciclosporina y AG -Daley y cols.1986, Thomason y cols.1995, 1996a, Sheehy y cols.2000-. También lo confirman Karpinia y cols.1996: Consideran en su estudio que la duración del tratamiento con ciclosporina fue un factor crítico para el desarrollo del AG al observar que los niños transplantados sin AG tuvieron un promedio de exposición al fármaco de 1.3 meses frente a los que manifestaron AG que fue de 3.5 años. Khoori y cols.2003 observan una clara relación entre el AG por terapia combinada ciclosporina-nifedipina y la duración en la administración de la terapia. Miranda 1997 observa que entre las 2 variables -dosis nifedipina/tiempo de tratamiento-, hay correlación positiva con AG pero no es estadísticamente significativa.

Esta correlación no se ha visto siempre directa según la premisa: "a mayor duración de la terapia, mayor AG" como han aportado en general los estudios citados, también se ha comprobado una correlación inversa: autolimitación del sobrecrecimiento gingival con el tiempo, en ocasiones con interacción de otros factores añadidos: Grado de dependencia total o parcial a la placa bacteriana, ajuste de las dosis -Daly 1992-, sensibilidad a los efectos de la ciclosporina, órgano transplantado, concomitancia con otros fármacos en régimen de politerapia y substitución por un fármaco del mismo grupo terapéutico.

Wilson y cols.1998 comprobaron que el tiempo transcurrido desde el trasplante con la acción del inmunodepresor es inversamente proporcional al grado de AG. Montebugnoli y cols.1996 refieren en su estudio cruzado con 39 pacientes cardíacos transplantados una correlación inversa estadísticamente significativa entre los parámetros periodontales y la duración del tratamiento con ciclosporina, al final de la terapia el fármaco actuaría con mínimo efecto adverso y la severidad del AG podría reducirse progresivamente. A la misma conclusión han llegado los estudios de Hosey y cols.1995,2002 entre la severidad del AG y el tiempo de exposición a ciclosporina en una población de niños transplantados de hígado: se establecía una relación inversa.

Otros estudios aportan que la regresión del AG provocado por ciclosporina se produce con el tiempo de exposición al fármaco -Montebugnoli y cols.2000- o la regresión espontánea después de finalizar el tratamiento -Daley y cols.1986-.

En el estudio de Montebugnoli y cols.2000 con pacientes sometidos a transplante cardíaco el decrecimiento del volumen gingival fue significativo a los 36 meses del transplante mientras que el índice gingival ya descendió a los 12 meses influido por las sesiones de higiene oral realizadas 3 meses antes. El número de pacientes *responder* descendió progresivamente en las sucesivas visitas hasta los 36 meses pasando de 7 a 2.

Otros estudios aportan una independencia entre exposición temporal al fármaco y AG:

- Angelopoulos y Goaz 1972, Dahllöf y Modèer 1986, Peñarrocha y cols.1990: Estudios de pacientes con tratamiento de fenitoína y prevención de la aparición del AG por control de placa bacteriana.
- McGaw y cols.1987, Pernu y cols.1992, Romito y cols.2003, 2004: No encontraron relación entre tiempo de exposición a ciclosporina y AG.
- Sin correlación entre duración del tratamiento con administración de antagonistas del calcio, con ciclosporina y en combinación de ambos grupos de fármacos -Pernu y cols.1993b, King y cols.1993, Allman y cols.1994, Lowry y cols.1995, Nery y cols.1995, Cebeci y cols.1996ab, Nakou y cols.1998, Thomas y cols.2001-.

4.3.1.3-Terapia combinada y substituciones.

La terapia combinada de 2 fármacos inductores de AG no siempre incrementa la prevalencia de la condición de forma ostensible pero es un factor de riesgo para la progresión y la recurrencia del AG -Thomason y cols.1993,1995,1996a, Pernu y cols.1993a, Wondimu y cols.1996, 1997, Spratt y cols.1999, Pernu y Knuuttila 2001-.

Los efectos adversos de la administración crónica de ciclosporina -HTA y nefrotoxicidad- se controlan con la asociación de nifedipina -Seymour 1991, Bökenkamp y cols.1994, Wilson y cols.1998- por lo que esta combinación es muy frecuente en casos de tratamiento con este inmunosupresor.

Margiotta y cols.1996 comprobaron que el 60% de los pacientes *responder* recibían terapia combinada de ciclosporina y nifedipina. Khoori y cols.2003 aportan un aumento de la prevalencia del AGIF con la asociación de

nifedipina y ciclosporina -de 6% con ciclosporina a 52% con la combinación- y también habría aumento de la severidad.

En un estudio de Slavin y Taylor 1987, la prevalencia de AG fue mayor en el grupo de pacientes que recibían terapia combinada -ciclosporina+nifedipina: 51%- al comparar con el que sólo recibía ciclosporina -8%- y la cirugía de resección se realizó sólo en esos pacientes -13%-. Según Spolidorio y cols.2006 también aumentó la prevalencia del AG en aquellos pacientes que recibieron la combinación de los fármacos ciclosporina y nifedipina con respecto a los que sólo recibían ciclosporina.

Según King y cols.1993 aunque hay sinergia entre ambos tipos de fármacos no se produjo un efecto aditivo del AG al combinar ciclosporina y nifedipina o ciclosporina y diltiazem con respecto a ciclosporina en monoterapia, y la incidencia oscilaba alrededor del 49%. Cebeci y cols.1996b consideran que, en una combinación de ciclosporina y verapamil, la prevalencia y severidad del AG son mayores pero los cambios no son significativos con respecto a la administración monoterápica. En otro estudio de los mismos autores no se observan efectos aditivos en el sobrecrecimiento al asociar ciclosporina a otros calcio-antagonistas -Cebeci y cols.1996a-. En pacientes pediátricos transplantados no se ha observado una diferencia significativa en el grado de AG con la combinación de ciclosporina-nifedipina al comparar con los niños que sólo recibían ciclosporina -Allman y cols.1994, Hosey y cols.1995-. La conclusión de estas aportaciones es que habría un mismo efecto terapéutico sin adición.

Pernu y cols.1993b citan un 35% de prevalencia de AG en la asociación ciclosporina y dihidropiridinas sin ser significativo con respecto a monoterapias de ciclosporina o dihidropiridinas, aunque la severidad aumentó en los pacientes susceptibles -potenciación-. Esta conclusión la comparten otros autores -Thomason y cols.1993, 1995-.

La asociación de ciclosporina con amlodipina produjo mayor prevalencia de AG que la combinación ciclosporina-nifedipina en un grupo de pacientes transplantados renales -James y cols.2000a-, a pesar de que amlodipina presenta menor prevalencia que nifedipina en régimen de monoterapia -ver tabla XIV-.

En un estudio clínico con ratas se observó que la combinación terapéutica de ciclosporina y nifedipina no produjo en el análisis histométrico un aumento de los parámetros clínicos relacionados con AG, al comparar con los

resultados obtenidos con la acción de los fármacos individualmente por lo que no hubo aumento de severidad -Chiu y cols.2001-.

En pacientes transplantados, la combinación de prednisolona y azatioprina también permite una inmunosupresión eficaz y disminuye la reacción local inflamatoria -Hassell y Hefti 1991, Somacarrera y cols.1994b, Wilson y cols.1998, Vieira y cols.2002-. En estudios comparativos de prevalencia de AG por los inmunosupresores ciclosporina y azatioprina se ha comprobado que los grupos de pacientes que recibía ciclosporina mostraban una alta prevalencia con respecto a los que recibían azatioprina que fue casi nula -Friskopp y Klintmalm 1986, Seymour y cols.1987, Pernu y cols.1992, Vieira y cols.2002-. En un paciente transplantado cardíaco sometido a tratamiento inmunosupresor con ciclosporina y prednisona se realizó un seguimiento con examen oral completo y cortes histológicos puntuales durante 18 meses. Al producirse toxicidad renal al 10º mes se cambió ciclosporina por azatioprina y se produjo una reducción del AG del 26,8% y en el infiltrado inflamatorio. En el grupo control formado por 13 pacientes con las mismas características pero sin discontinuidad en el tratamiento de ciclosporina, 7 desarrollaron AG en el noveno mes y el promedio del grupo experimentó un aumento de severidad del 2% -Somacarrera y cols.1996-.

Tacrolimus es una molécula macrólida de mayor potencia que ciclosporina y la substitución en la terapia inmunosupresora baja la prevalencia y la severidad del AG de forma significativa en la mayoría de estudios -James y cols. 2000b, Sheehy y cols.2000, de Oliveira Costa y cols.2006-. Wondimu y cols.2001 comprobaron que ningún paciente que recibió tacrolimus durante 1 año mostró AG, a diferencia del grupo al que se le administró ciclosporina que presentó un 35% de sobrecrecimiento. Ellis y cols.2004a compararon 2 grupos de pacientes transplantados y sometidos a uno de los inmunosupresores: tacrolimus o ciclosporina. El 15 % del grupo tacrolimus presentaba AG significativo frente a un 30 % del grupo ciclosporina el cual tenía también mayor severidad.

Pacientes bajo tratamiento con tacrolimus y nifedipina presentaron menor prevalencia y severidad de AG que aquéllos que recibieron ciclosporina y nifedipina -Mc Kaig y cols.2002-. Se podrían considerar variables de riesgo las dosis de azatioprina y de calcio-antagonistas concomitantes a la administración de ciclosporina o de tacrolimus para la severidad del AG según el estudio realizado en una muestra de 585 pacientes transplantados -de Oliveira Costa y cols.2006-.

Hernández y cols.2000 describen un caso de una paciente sometida a una terapia combinada de fenitoína y ciclosporina. Durante la administración del primero como único fármaco no se manifestó AG, pero después la asociación de ambos provocó la aparición del sobrecrecimiento gingival. La substitución de ciclosporina por tacrolimus disminuyó la prevalencia y la severidad del AG y a los 6 meses del cambio se consiguió la regresión.

La politerapia anticonvulsivante aumenta la prevalencia del AG por mediación de fenitoína. Se produce una inducción del enzima P450 a nivel hepático - Peñarrocha y cols.1990, Majola y cols.2000-. En un estudio de Seymour y cols.1985 con 30 pacientes epilépticos fenitoína provocó mayor AG que en los pacientes que recibían valproato los cuales no mostraban diferencias significativas con respecto al grupo control. En otro estudio similar realizado con 79 pacientes y distribuidos en 6 grupos según la combinación terapéutica de fármacos neurológicos -fenitoína, carbamazepina, primidona, fenobarbital y ácido valproico- se observó que la incidencia de AG no era significativa en los grupos en los que el tratamiento era fenitoína en monoterapia o combinada entre fenitoína y ácido valproico, en cambio en el resto de los grupos que recibían otras combinaciones con fenitoína sí había una significación estadística de AG -Maguire y cols.1986-. Según otros autores no se observó un aumento de la prevalencia ni de la severidad de AG en un grupo de pacientes epilépticos sometidos a fenitoína y a una terapia combinada de anticonvulsivantes. No hubo diferencias significativas con respecto al grado de AG entre ambos grupos de terapia ni se modificaron de forma significativa los niveles del metabolito más importante de fenitoína en plasma y saliva -Kamali y cols.1999-.

En el estudio de Brunet y cols.2001 realizado con un grupo de pacientes neurológicos que recibían fenitoína se comparó con otro bajo terapia con distintos anticonvulsivantes y se comprobó que el primero mostraba mayor prevalencia y severidad de AG y ambos mayor que el grupo control.

Se cita un caso de AG por vigabatrina, anticonvulsivante de uso restringido con poca experiencia en sus efectos terapéuticos -Katz y cols.1997-.

Se podrían administrar otros antagonistas del calcio para disminuir la incidencia del AG por substitución de nifedipina: Verapamil también induce AG -Pernu y cols.1989- aunque con una incidencia menor -4.1%- -Miller y Damm 1992- - ver tabla XIV-. Según un estudio de Jorgensen 1997 realizado en una muestra

de 150 pacientes cardíacos que recibieron amlodipina, sólo se observó AG en 5 con sobrecrecimiento moderado y se podría administrar en terapia substitutiva. Isradipine no provocó sobrecrecimiento gingival y fue eficaz al substituir a nifedipina -Westbrook y cols.1997- -ver tabla XIV-. También diltiazem reporta casos de AG -Bowman y cols.1988- en general con prevalencias muy bajas. De felodipina, nicardipina, nisoldipina se conocen casos aislados y no constan incidencias significativas.

4.3.1.4-Variables demográficas: edad, sexo, raza, peso.

Según los estudios revisados, los niños, adolescentes y mujeres tienen más susceptibilidad al AG por ciclosporina que los adultos varones -Wysocki y cols.1983, Tyldesley y Rotter 1984, Daley y cols.1986, Schulz y cols.1990, Karpinia y cols.1996, Kilpatrick y cols.1997-. El Grupo de Estudio sobre la Esclerosis Múltiple -1990- presentó mayor diversidad de edades y observó de forma significativa que pacientes con AG eran más jóvenes que aquéllos sin sobrecrecimiento gingival -Marshall y Bartold 1998-. Spratt y cols.1999 confirman esta relación aunque observan que hay mayor prevalencia de AG por ciclosporina en el género masculino. También los estudios de Thomason y cols.1995,1996a sobre AG por ciclosporina observan mayor predisposición en los varones, aunque no hay diferencias significativas en todos los casos. En edades avanzadas AG estaba reducido en el grupo bajo terapia con ciclosporina-nifedipina -James y cols.2000a-.

En un estudio de Somacarrera y cols.1994b, los pacientes transplantados más jóvenes presentaban mayor severidad de AG por ciclosporina que pacientes de más edad, y la incidencia era más alta en la 2ª y 3ª década de la vida. No obstante la prevalencia de AG por este inmunosupresor se incrementa con la edad -Seymour y cols.1987, Wilson y cols.1998-.

Aunque hay estudios que no encontraron relación entre edad y AG inducido por ciclosporina -McGaw y cols.1987, Pernu y cols.1992, King y cols.1993, Montebugnoli y cols.1996,2000-. En el estudio *in vitro* de Sobhani y cols.1989, los fibroblastos de pacientes de diversas edades no mostraron diferencias en los efectos provocados por ciclosporina. También en terapia combinada de ciclosporina-nifedipina, Cebeci y cols.1996a, Thomas y cols.2001 y Khoori y cols.2003 no observaron ninguna relación de AG con la edad.

Los estudios epidemiológicos de pacientes con AG por fenitoína confirman

que en edades tempranas hay mayor probabilidad en la incidencia del sobrecrecimiento gingival en comparación con la madurez -Addy y cols.1983, Dahllöf y Modéer 1986, Thomason y cols.1992, Sasaki y Maita 1998, Majola y cols.2000-. Aunque hay estudios de terapia con fenitoína para pacientes epilépticos en que no se correlacionó la edad con AG -Hassell y cols.1984, Peñarrocha y cols.1989a,1990-, pero los pacientes con mayor severidad de AG tenían una media de edad más baja. En estudios *in vitro* se ha comprobado que la síntesis de proteína y colágeno de fibroblastos procedentes de AG por fenitoína disminuía al aumentar la edad del donante, pero era significativamente mayor que la correspondiente a encía normal. En cambio la degradación no tenía relación con la edad del paciente -Johnson y cols.1990-. No se puede afirmar un predominio evidente de afectación para uno de los géneros ya que están implicados otros factores locales. No se ha podido observar una correlación entre el tipo de crisis epilépticas y el AG pero sí que los pacientes con retrasos intelectuales más severos presentaban mayor AG -Peñarrocha y cols.1989a-.

Para AG inducido por nifedipina la edad no es un factor de riesgo, a menos que se asocie en la terapia a ciclosporina -Nery y cols.1995, Miranda 1997, Ellis y cols.1999-. En estudios con ratas se observó más severidad de AG en las jóvenes al comparar con las mayores, y las del género masculino eran más susceptibles -Ishida y cols.1995, Nishikawa y cols.1996-. La administración de terapia combinada de ciclosporina con nifedipina no permitió relacionar el AG con la edad de la rata -Spolidorio y cols.2003-.

El AG por nifedipina es tres veces más frecuente en hombres que en mujeres -Harel-Raviv y cols.1995, Ellis y cols.1999-. El género masculino tendría un umbral plasmático más bajo a partir del cual se produciría el AG -Chabria y cols.2003-.

Con respecto a la raza y al sexo hay estudios que no los relacionan con la presentación de AG:

- Referidos a AG por fenitoína -Angelopoulos y Goaz 1972, Addy y cols.1983-.
- Referidos a AG por ciclosporina y a AG por calcio-antagonistas -McGaw y cols.1987, Pernu y cols.1992, King y cols.1993, Allman y cols.1994, Cebeci y cols.1996ab, Montebugnoli y cols.1996, Sheehy y cols.2000, Thomas y cols.2001-.

En un estudio de Addy y cols.1983 se observó que el peso era una variable de riesgo inversamente relacionada de forma significativa con la severidad del AG provocado por fenitoína.

4.3.1.5-Placa bacteriana y nivel de inflamación. Control de higiene oral.

La mayoría de autores coinciden en afirmar que existe una relación intrínseca entre placa bacteriana-inflamación gingival y AG inducido por fármacos (AGIF) para los tres grupos de fármacos inductores. Algunos estudios obtienen resultados parciales estadísticamente significativos en la correlación entre parámetros periodontales y los índices que expresan el grado de inflamación, placa bacteriana, y sangrado al sondaje en la clínica del AG -tabla XVI-.

La placa bacteriana podría favorecer el desarrollo del AG por la aparición de la respuesta inflamatoria y participar de forma implícita en el sobrecrecimiento -Seymour y Smith 1991, Daly 1992-. El estudio de Somacarrera y cols.1994b puso de manifiesto la prevalencia del AG por ciclosporina y su correlación con la placa y la gingivitis, al observar en una muestra de 100 pacientes transplantados de diversos órganos que a los 6 meses del trasplante el sobrecrecimiento había aumentado de forma significativa y se estabilizaba mientras la placa bacteriana y la gingivitis disminuían por un programa de motivación y refuerzo en la higiene oral.

Varga y cols.1998 evalúan el estado periodontal antes del trasplante y su afectación después con la inmunosupresión en el desarrollo del AG. Los pacientes que mostraban gingivitis clínica previa al trasplante tenían más posibilidades de manifestar AG después del trasplante. Por este motivo las higienes bucales del tratamiento periodontal realizadas antes de la administración de ciclosporina fueron beneficiosas en la prevención de un AG severo según la observación comparativa de unos pacientes transplantados. Otros estudios clínicos han observado esta consecuencia llegando a la misma conclusión -Adams y Davies 1984- también con nifedipina como fármaco inductor -Nishikawa y cols.1991-. Se podría considerar como una cierta susceptibilidad de los fibroblastos a la placa bacteriana y a ciclosporina acumulada en su interior -Seymour y cols.2000-.

Al ser fármacos inmunosupresores la fenitoína y la ciclosporina, no se

consigue fácilmente una progresión de la enfermedad periodontal como sería de esperar por los microorganismos de la placa y la inflamación que se produce, por eso en los estudios de Seymour y cols.1985,1996 la pérdida de hueso alveolar fue menor que en el grupo control.

Stone y cols.1989: en una población de 90 pacientes con esclerosis múltiple observaron mayores índices de placa e inflamación en el grupo que recibía ciclosporina aunque el control también presentaba un grado variable de gingivitis, posiblemente en ambos grupos también influido por la falta de destreza manual en el cepillado.

Hancock y Swan 1992 observan el efecto de reducción notable de un AG en un paciente bajo tratamiento con nifedipina sólo con sesiones de higiene oral, sin sustitución del fármaco.

En modelo experimental de rata, libre de patógenos, y bajo la influencia de nifedipina, se produjo AG sin inflamación ni placa. En el grupo con dieta de nifedipina en el que había además infección inducida por *Streptococcus mutans*, el AG fue mayor en severidad -Morisaki y cols.1993- .

Hay otros estudios por el contrario que no observan ninguna relación entre valores de placa bacteriana-grado de inflamación y AG. Se aporta una independencia entre ellos -Daley y cols.1986, Seymour y cols.1987, Schulz y cols.1990, Wondimu y cols.1993, Bökenkamp y cols.1994, Mc Laughlin y cols.1995-. Tampoco en terapia combinada -ciclosporina y nifedipina- se relacionó el AG con la inflamación gingival ni con irritantes locales -Margiotta y cols.1996-. Además la distribución de la placa bacteriana y la extensión de la gingivitis no se observó idéntica a la del sobrecrecimiento gingival según Thomason y cols.1996b y habría más relación con algunos condicionantes anatómicos.

Algunos autores introdujeron en la relación: cálculo dental, profundidad de sondaje y nivel de inserción periodontal y tampoco comprobaron una correlación significativa al comparar con grupos control en ninguna de las variables correspondientes a los depósitos con respecto a los parámetros periodontales -Hefti y cols.1994, Romito y cols.2003, 2004-. Yamada y cols.2001 no encontraron diferencias en el título de IgG a 13 bacterias periodontales en los grupos de pacientes con AG y en los pacientes que también recibían fenitoína y no presentaban el sobrecrecimiento gingival. La falta de correlación que refieren algunos autores la han comprobado con la

ESTADO DE LA CUESTIÓN

autores	correlación significativa
Addy y cols.1983	68 pacientes epilépticos. AG y grado HO
Hassell y cols.1984	77 pacientes discapacitados. AG y IP IGPS CI banda EQ
Seymour y cols.1985	30 pacientes epilépticos. AG y IP IG PS
McGaw y cols.1987	30 transplantados renales. AG y IP IG [Cs] en saliva completa
Peñarrocha y cols.1989	106 pacientes epilépticos. AG y IG CI
Peñarrocha y cols.1990	60 pacientes epilépticos. AG y IP IG PS CI
Barclay y cols.1992	19 pacientes cardiovasculares. AG y IG PS
Pernu y cols.1992	32 transplantados renales. AG y IP IG CI IS
Thomason y cols.1992	46 pacientes epilépticos. AG y IP PS
Thomason y cols.1993	55 transplantados renales. AG y IP En terapia combinada Cs-Nf: AG y IS
Allman y cols.1994	26 transplantados renales-hepáticos. Asociación AG-depósitos
Somacarrera y cols.1994b	100 transplantado cardíacos, renales, hepáticos. AG y IP IG
Nery y cols.1995	252 pacientes cardiovasculares. AG y HO
Thomason y cols.1995	94 transplantados cardíacos. AG y IP IS. En terapia combinada Cs-Nf: AG y PS IS
Ball y cols.1996	36 pacientes epilépticos. AG y PS IS
Cebeci y cols.1996a	52 transplantados renales. En terapia combinada Cs-Dhp: AG y IP IG PS
Cebeci y cols.1996b	51 transplantados renales. En terapia combinada Cs-Vrl: AG y IG PS
Karpinia y cols.1996	49 transplantados renales. AG y IG PS banda EQ
Montebugnoli y cols.1996	39 transplantados cardíacos. AG y IG
Thomason y cols.1996a	172 transplantados. AG y IS
Miranda 1997	258 pacientes cardiovasculares. AG y IG
Nakou y cols.1998	35 pacientes cardiovasculares. AG y IP IG IS
Ellis y cols.1999	911 pacientes cardiovasculares. AG y IG IS
Kantarci y cols.1999	31 transplantados renales. AG y IP IG entre test y control
Spratt y cols.1999	120 transplantados renales. AG y IP IS PS
Majola y cols.2000	134 pacientes epilépticos. AG y IP
Montebugnoli y cols.2000	AG y IG
Thomas y cols.2001	236 transplantados renales. En terapia combinada Cs -Nf: AG y IP IG
Afonso y cols.2003	20 transplantados renales y 20 controles negativos. IP, IG
Thomason y cols.2005	100 transplantados. AG y IS
de Oliveira Costa y cols.2006	585 transplantados renales. AG y IS

-tabla XVI: Estudios que aportan una relación significativa entre el AG farmacológico y variables que dependen de la higiene oral. HO: Higiene oral, IP: Índice de placa bacteriana, IG: Índice gingival, PS: Profundidad de sondaje, CI: Cálculo, IS: Índice de sangrado, Dhp: Dihidropiridina, Cs: Ciclosporina A, Nf: Nifedipina, Vrl: Verapamil, EQ: Encía queratinizada-

independencia entre la exacerbación que produce la placa bacteriana y el inicio de la administración del fármaco -Seymour y Heasman 1988, Seymour 1991, Seymour y Jacobs 1992-.

4.3.1.6-Factores genéticos.

Hay una predisposición genética en el metabolismo de fenitoína, nifedipina y ciclosporina y desarrollo del AG. Los tres se metabolizan por la familia del citocromo P450. Este citocromo tiene un polimorfismo genético importante que permite una variación interindividual de la actividad enzimática. Esta variación influye en la respuesta del paciente al fármaco -Seymour y cols.1996-. También se ha observado un polimorfismo genético para la citocina interleucina 1a (IL1a) como factor de riesgo en pacientes con terapia de ciclosporina que presentan AG porque debe predisponer a la inducción farmacológica -Bostanci y cols.2006- -ver 4.4 Patogenia-.

A través de la expresión del sistema antigénico humano linfocitario (HLA) se ha observado una relación estrecha entre determinadas secuencias de la expresión HLA y el desarrollo clínico del AG -Pernu y cols.1994, Cebeci y cols.1996a, Margiotta y cols.1996-.

HLA DR1 permite una protección contra AG -Cebeci y cols.1996a-. En cambio HLA DR2 puede incrementar la severidad del AG y se asocia con AG moderado y severo -Pernu y cols.1994-, aunque sean bajos los niveles plasmáticos de ciclosporina -Kudlacek y cols.1992-. El alelo HLA A19 manifiesta una tendencia al AG -Margiotta y cols.1996- y el alelo HLA B37 aumenta mucho el riesgo -Thomason y cols.1996a, Seymour y cols.2000-. Estos alelos de riesgo sensibilizan a algunos de los factores de riesgo y parámetros considerados con gran implicación en la aparición del AG: duración de la terapia con fármacos inductores, terapéutica combinada ciclosporina-nifedipina, filtración plasmática, inflamación gingival con sangrado papilar, edad y sexo -Thomason y cols.1996a-ver 4.4 Patogenia -.

4.3.1.7-Otras variables: maloclusión, hábitos, iatrogenia, infecciones.

Se considera que el AG tiene relación con la malposición dentaria y la incompetencia labial -Wilson y cols.1998-. También la respiración bucal estaría asociada con el AG debido a la deshidratación continua con influencia de la inflamación gingival que se acompaña en estos casos -Peñarrocha y cols.1989a-. El número de dientes también estaría relacionado con mayor predisposición al sobrecrecimiento gingival hasta considerar en personas edéntulas una falta o mínima expresión del AG en general -Dreyer y Thomas 1978, Nery y cols.1995-.

La dieta blanda permitiría también una tendencia al aumento del AG por fenitoína en poblaciones de pacientes hospitalizados -Hassell y cols.1984, Peñarrocha y cols.1989a-.

La aplicación de aditamentos de ortodoncia, obturaciones y coronas, pueden irritar los tejidos blandos y dificultar la higiene con un aumento de acumulación de placa bacteriana, potenciando la prevalencia y la severidad del AG -Seymour y cols.2000--ver 4.6 Clínica-. Esta correlación de iatrogenia no la refieren otros autores que en su estudio no reconocen la influencia de la irritación, ni la sobreexposición del tratamiento bucal con el AG -Margiotta y cols.1996, James y cols.2000ab-.

Se ha observado que el tabaquismo y el consumo de alcohol se asociaron con una disminución de la prevalencia del AG inducido por fenitoína. Ambos hábitos tienen un efecto inmunosupresivo sobre los linfocitos y se reduce la severidad de la inflamación en presencia de placa bacteriana -Majola y cols.2000-.

Al parecer el tipo de transplante no se considera un factor de riesgo así como para otras pautas terapéuticas de inmunodepresión -Thomason y cols.1996a-

Se ha comprobado una posibilidad de riesgo de replicación vírica del citomegalovirus humano (CMVH) si se produce la asociación de periodontitis y reservorio del virus en la bolsa periodontal con transplante renal: En 38 pacientes transplantados, diagnosticados de periodontitis e infección por CMVH, se registró una prevalencia de un 68% de AG -Nowzari y cols.2003- y asociación entre AG y CMVH en una persona de 33 años con inmunodeficiencia -Kaur y cols.2003-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

La flora microbiana residente en el surco gingival o la bolsa puede influir en el desarrollo y crecimiento del AG. En un estudio de Romito y cols.2004 se detectó una flora de patógenos subgingivales en pacientes transplantados cardíacos en tratamiento con ciclosporina. *Micromonas micros* se descubrió positivamente relacionado con los pacientes que presentaban AG, también hubo relación con *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium sp* -tabla XVII-.

En un estudio de la flora subgingival de 38 transplantados renales distribuidos en grupos según periodontitis crónica o con salud periodontal, se observó una alta prevalencia de microorganismos heterotópicos, normales en otros órganos de la economía, el resto de las microbiotas encontradas

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	23%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	36%
* <i>Prevotella intermedia</i>	93%
* <i>Fusobacterium sp.</i>	66%
<i>Campylobacter rectus</i>	30%
* <i>Micromonas micros</i>	66%
Hongos	30%

-tabla XVII: Principales microorganismos patógenos observados en bolsas gingivales de pacientes sometidos a ciclosporina y sus prevalencias. Los marcados con * fueron significativos con AG -Romito y cols.2004-

era compatible con los estados de salud y enfermedad periodontal -Leung y cols.2003- por lo que se podría sospechar de alguna alteración en la composición de la flora subgingival en transplantados renales.

Nakou y cols.1998 estudiaron la composición de la placa subgingival en 140 lesiones de 35 pacientes que recibían nifedipina por trastornos cardiovasculares y descubrieron en las lesiones de mayor severidad las especies bacterianas: *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium alactolyticum* y *Fusobacterium sp.*

En un estudio realizado con pacientes bajo tratamiento con fenitoína se tomaron muestras de las bolsas periodontales para el estudio de la flora

ESTADO DE LA CUESTIÓN

subgingival y se observó que predominaban los géneros *streptococcus* -38-42%- y *actinomyces* -23-26%- en el total de bacterias recolectadas y cultivadas. En los pacientes que tenían AG se encontró un aumento significativo de cocos Gram - obligados; los cocos Gram -anaerobios negro-pigmentados se detectaron en un 10,3% del total de bacterias cultivadas y de ellos el patógeno más frecuente en este grupo fue *Prevotella intermedia* a diferencia del grupo control en el que destacó *Prevotella nigrescens* -Takada y cols.2003-.

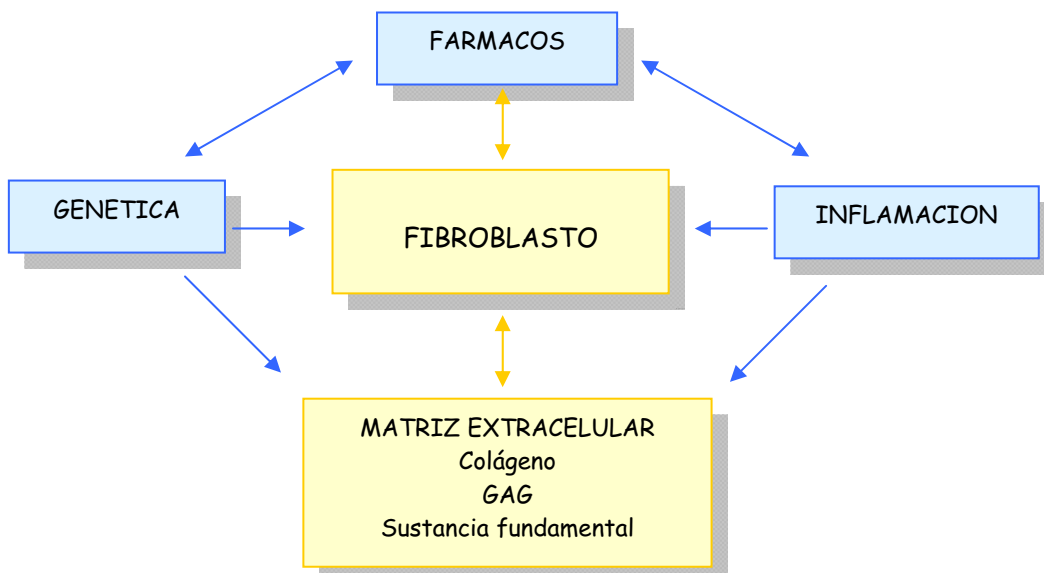
4.4-Patogenia del Agrandamiento gingival farmacológico

Se considera que la patogénesis del AGIF es multifactorial y hay estudios que relacionan AG con la sensibilidad de los individuos al fármaco y/o sus metabolitos -Wysocki y cols.1983, Chabria y cols.2003-. Entre estos factores hay distintas moléculas y vías que modulan el AG: citocinas, mediadores de la inflamación y respuestas inmunes que se han observado en el flujo gingival crevicular y en los tejidos periodontales. Se pueden agrupar en 3 causas principales: genéticas, inflamatorias por depósito de placa bacteriana y farmacológicas -figura 4,4-.

Los factores genéticos influyen en la heterogeneidad de los fibroblastos, su entorno extracelular y en el metabolismo del fármaco -Baños y Farré 2002-.

Los cambios inflamatorios producidos en la encía pueden provocar una alteración en la relación entre el fibroblasto y el fármaco y una actividad distinta en su comportamiento.

Los fármacos pueden afectar la respuesta inflamatoria de los tejidos gingivales con afectación del infiltrado celular y todos sus componentes moleculares y alterar la genética de los fibroblastos -Plemons y cols.1996, Seymour y cols.1996-.



-figura 4,4: Relaciones del tejido conectivo gingival con los factores básicos que influyen en el AGIF-

En consecuencia las relaciones de los factores considerados tendrían una implicación en los fibroblastos y en la matriz intercelular: con alteración del número celular, de su morfología y del equilibrio entre la síntesis y la degradación del colágeno, de los glicosaminoglicanos (GAG) y de la sustancia fundamental en general.

4.4.1-Genotipos distintos de la población fibroblástica.

La aportación de numerosos estudios de investigación ha puesto en evidencia la existencia de una subpoblación de fibroblastos reactivos que se conoce como *responder* por su incremento en la actividad de síntesis proteica en ambos compartimentos intra-extracelular ante la terapia de fármacos inductores de AG: fenitoína -Hassell y Gilbert 1983, Majola y cols.2000-, calcioantagonistas -Lucas y cols.1985, Fujii y cols.1994- y ciclosporina -Tipton y Dabbous 1986, Allman y cols.1994- con resultado tisular de AG. Hay otra subpoblación que no manifiesta cambios a pesar de la inducción por esos fármacos o por otros factores predisponentes -inflamación- y se conoce como *non responder* con menor síntesis proteica. Esta distinción se traduce en una heterogeneidad funcional o fenotipo distinto y su proporción estaría determinada genéticamente -Teoría de la subpoblación celular de Hassell y Cooper- Hassell y Stanek 1983, Coley y cols.1986, Seymour y Heasman 1988, Seymour y cols.1993-. En la población linfocitaria también habría un fenotipo distinto que implicaría unas características funcionales en la respuesta inmune -Varga y cols.1998-.

Fenitoína o sus metabolitos tendrían efecto sobre la población de fibroblastos *responder* -de forma directa o a través de mediadores- y podrían facilitar un incremento en su proliferación o una alteración en su morfología, lo que no ocurriría en fibroblastos de baja actividad -Seymour y Heasman 1988-.

Se ha sugerido que hay una sensibilidad individual en la respuesta a la terapia con ciclosporina marcada por la clase II del sistema genético HLA-DR del receptor y con afectación indirecta en la encía -Zlabinger y cols.1992-. Este fármaco también se ha visto capaz de influir directamente o mediante intermediarios -su metabolito HidroxiCs (M17), TGFβ y otras moléculas mediadoras- en la proliferación de fibroblastos y afectar su fenotipo *secretor* -Coley y cols.1986, Mariotti y cols.1998, Cotrim y cols.2003-.

La prueba de esta influencia genética estaría en estudios de fibroblastos en cultivo procedentes de gemelos sometidos a fenitoína. Los gemelos monozigóticos presentan una similitud en la síntesis de proteínas que no ocurre en los gemelos dizigóticos -Cockey y cols.1987-.

Existen otros dismorfismos gingivales con respuesta genética reactiva -no farmacológicos- que también presentarían un incremento en la proporción de proliferación celular y con aspecto de AG -fibromatosis gingival hereditaria- -Tipton y cols.1997, Coletta y cols.1998- ver 3.2.2-AG no inflamatorio-.

Esta heterogeneidad individual, según la configuración genética, se manifiesta a otros niveles con fenotipo distinto: superficie celular y afinidad de unión a receptores con sus efectos, síntesis, secreción y degradación de macromoléculas -GAG, colágeno, colagenasa-, y metabolismo farmacológico -Cockey y cols.1986, Tipton y Dabbous 1986, Sooriyamoorthy y cols.1988, Fan y Scott 1989, Brown y cols.1991a, Tipton y cols.1991, Pernu y Knuuttila 2001, Stabellini y cols.2004, Grünheid y Zentner 2005-.

Podría haber una acción farmacológica de ciclosporina a nivel celular inhibiendo la apoptosis de los fibroblastos programada genéticamente. Al parecer se ha observado una correlación positiva entre la concentración plasmática de ciclosporina y la expresión de la proteína bcl-2 que previene o reduce la muerte celular mediante diferentes estímulos, a diferencia de la acción que produce la proteína p53 -Bulut y cols.2005-.

4.4.2-Homeostasis del colágeno.

La fibrosis sería una consecuencia de un fracaso del *turnover* en el equilibrio "síntesis-degradación" de colágeno con un incremento en la síntesis y/o una disminución en la degradación con resultado de acumulación de fibras colágenas y por consiguiente el aumento en volumen del tejido - Varga y cols.1998, Kataoka y cols.2001-. En muestras de AG por fenitoína se observó un aumento de los niveles de proteínas y de producción de colágeno al comparar con fibroblastos *non responder* sometidos a fenitoína y con fibroblastos procedentes de personas sanas -controles- -Hassell y cols.1976-. Por eso se distinguen 2 procesos:

Hay autores que creen que la fibrosis es una consecuencia de:

- **aumento de síntesis del colágeno:**

-Narayanan y cols.1988: El incremento de colágeno en AG por inducción de fenitoína estuvo en un aumento del mRNA colagénico que favoreció la traducción proteica y no fue por disminución de la degradación intracelular del colágeno.

-Schincaglia y cols.1992: Ciclosporina estimularía la síntesis de procolágeno tipo I en fibroblastos gingivales humanos por incremento de los niveles de mRNA-procolágeno.

-Fujii y cols.1994: Estudio con fibroblastos *responder* sometidos a antagonistas del Ca y a fenitoína sobre la síntesis de colágeno y de DNA y se observó un aumento significativo de estos valores al comparar con fibroblastos *non responder*.

Otros investigadores consideran que es una:

- **disminución de la degradación del colágeno** -ver figura 4 página 175-:

-Hassell 1982: El fibroblasto *responder* puede sintetizar y secretar colagenasa inactiva. Fenitoína podría interferir la prolil-hidroxilasa y disminuir la colagenasa activa. La prolil-hidroxilasa activa la estromelina la cual es necesaria para que se produzca el paso de procolagenasa a colagenasa - figura 4,5-.

-Moy y cols.1985: La actividad de la colagenasa se reduce en cultivos de fibroblastos de piel humana sometidos a fenitoína por inhibición de la prolil-hidroxilasa que también regula la producción de hidroxiprolina en el proceso de síntesis de colágeno -figura 4,5-.

-Fan y Scott 1989: Estudiaron la acción colagenolítica con ciclosporina a un margen de dosis -200-400ng/ml- observando una disminución al final del período de incubación.

-Tipton y cols.1989, Tipton y Dabbous 1989: La ciclosporina sería capaz de inhibir la estimulación de la actividad colagenolítica promovida por linfocitos y monocitos. Esta respuesta colagenolítica sería dosis-dependiente de ciclosporina: a mayor dosis se producía más reducción de la actividad colagenolítica en cultivos de fibroblastos sometidos a un rango creciente de dosificación, de 0,1 a 1 µg/ml.

-Tipton y cols.1991 y 1994: En fibroblastos *in vitro* sometidos a ciclosporina y nifedipina respectivamente aportan que se produce más una reducción del metabolismo del colágeno por disminución de la actividad de la colagenasa con poca variación o disminución de la proliferación celular, de los GAG y de la fibronectina.

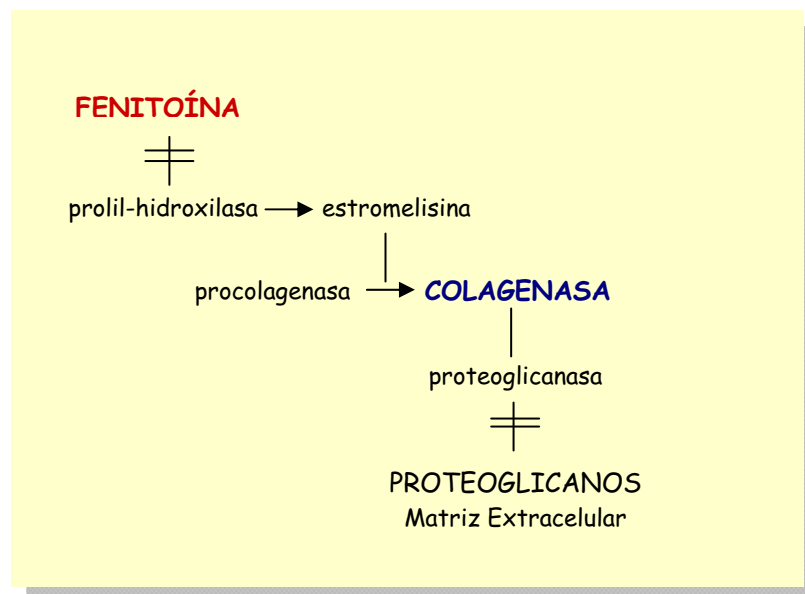
ESTADO DE LA CUESTIÓN

-Thomason y cols.1998: En su estudio inmunocitoquímico de colagenasa y estromelisina en muestras de encía humana se observó menor tinción de colagenasa en aquéllas procedentes de AG inducido por ciclosporina por supuesta carencia en su producción, en cambio no hubo diferencias para estromelisina al comparar las muestras de encía sana con las de AG.

En la fibromatosis gingival hereditaria también se ha comprobado un exceso de acumulación de colágeno por disminución de la colagenasa y de sus inhibidores -Coletta y cols.1999-.

La disminución de la degradación del colágeno podría ser también por una reducción de su fagocitosis:

-Kataoka y cols.2001: Nifedipina provocó AG por disminución de la fagocitosis del colágeno I que aumentó su depósito en fibroblastos gingivales de rata a partir del 30º día de dieta con el fármaco inductor.



-figura 4,5: Participación de la fenitoína en su acción sobre la colagenasa-

La fagocitosis del colágeno fue inhibida por nifedipina y fenitoína a dosis dependiente en fibroblastos de encía humana sana -Saito y cols.1996-. La reducción de la fagocitosis por nifedipina se comprobó en AG de ratas por disminución de los receptores de superficie del colágeno -integrinas: $\alpha_1\beta_1$ para colágeno IV y $\alpha_2\beta_1$ para colágeno I- -Kataoka y cols.2001-. Estos mismos

autores comprobaron también en modelo de rata un aumento de colágeno con la administración de ciclosporina por reducción de su fagocitosis y aumento de la expresión mRNA colagenasa; aunque con mayor severidad clínica y de aparición más temprana que en el estudio anterior -Kataoka y cols.2000-. En otro experimento realizado con ratas *in vivo-in vitro* se observó una reducción de la actividad fagocítica de los fibroblastos por ciclosporina sin observarse cambios en la transcripción del colágeno ni de la colagenasa y la administración de azitromicina compensaba esta reducción de la fagocitosis con mejoría clínica del AG -Paik y cols.2004-.

En un estudio de McGaw y Porter 1988 se compararon muestras gingivales humanas de pacientes sometidos a tratamiento con ciclosporina, muestras-control inflamadas y muestras-control sanas. Los resultados manifestaron una clara disminución de la actividad fagocítica en las muestras experimentales al comparar con las otras dos, con diferencia significativa al comparar con las muestras inflamadas que presentaban una fagocitosis acentuada. Según Varga y cols.1998, los fibroblastos de AG por fenitoína o por ciclosporina tienen una actividad fagocítica reducida en tejido inflamado como resultado de una disminución de la proporción de células fagocíticas, en esta situación sería simultánea la inducción farmacológica con la inflamación.

En un estudio *in vitro* de Kato y cols.2005 fibroblastos gingivales humanos se sometieron a diferentes dosis de fenitoína y se comprobó por técnicas de proliferación celular, transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y de Western-Blott que se producía una reducción de la degradación del colágeno en sus 2 vías de metabolismo y ésta podría ser la patogenia del AGIF: -por afectación en la colagenasa y sus inhibidores y por disminución de los receptores de superficie $\alpha_2\beta_1$ para la endocitosis.

Hay aportaciones científicas en las que se evidencian distintos efectos en la actividad enzimática colagenolítica por la inducción de los fármacos: En el estudio *in vitro* de Zebrowski y cols.1988 esta actividad estuvo significativamente incrementada por nifedipina, decrecida por fenitoína e indiferente por ciclosporina y los efectos para fenitoína y nifedipina fueron dosis-dependiente.

En estudios de distintos autores se ha mostrado fenitoína capaz de inducir:

- **ambos procesos a la vez -aumento de la síntesis de colágeno y reducción de su degradación-:**

-Dabbous y cols.1986: En aumentos de la síntesis proteica y de colágeno fue evidente que la actividad colagenolítica estaba disminuida en fibroblastos sometidos a ciclosporina.

-Vernillo y Schwartz 1987: Aumento de la síntesis de colágeno y GAG y reducción de su degradación.

Podría existir como colofón, un crecimiento general, con independencia del epitelio, de todos los componentes del conectivo: fibroblástico y matriz extracelular, debido a una pérdida de control en el turnover sin variar la proporción de sus elementos y con aumento de la actividad mitótica celular, según Hassell y cols.1978 en un estudio microscópico de muestras gingivales humanas sanas y sometidas a la acción de fenitoína -ver en Discusión: Morfología tisular en el análisis microscópico-.

4.4.3-Inflamación gingival inducida por la placa bacteriana. Respuesta inmune.

En numerosos estudios se ha comprobado que la profilaxis en higiene dental para la eliminación de la placa bacteriana reduce la expresión del AG y previene su severidad -Dahllöf y Modéer 1986, Brown y cols.1991a-. El AG severo provocado por ciclosporina en pacientes transplantados resultaría en una exacerbación de la respuesta inflamatoria donde actuaría como cofactor ciclosporina -Varga y cols.1998-.

El efecto de nifedipina *in vivo* dependería de la inflamación local y del tiempo de exposición de tal modo que un ambiente de inflamación local preexistente sería esencial para el inicio del sobrecrecimiento -Nishikawa y cols.1991-. Para la inducción por nitrendipina el AG sólo se produciría en puntos localizados de inflamación gingival y no en sanos según el estudio clínico realizado en perros -Heiji y Sundin 1988-.

Ciclosporina y fenitoína reducirían el número de PMN neutrófilos y de linfocitos en las fases aguda y crónica de la inflamación -Dahllöf y cols.1986a, McGaw y Porter 1988, Bartold y cols.1989c-. El aumento de sangrado del AG no sólo sería consecuencia de la inflamación sino también de la supresión de los

mediadores de la defensa inmune que suelen inhibir la respuesta vascular en la inflamación crónica -Varga y cols.1998-.

Según estudios *in vitro*, la ciclosporina disminuiría la acción del lipopolisacárido (LPS), procedente de algunos microorganismos, que tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de fibroblastos gingivales y en la expresión del mRNA-colagenasa del fibroblasto por lo que reduciría la degradación del colágeno -Bartold 1989, Barber y cols.1992-, Sugano y cols.1998-. Nifedipina inhibiría, según estudios *in vitro*, las acciones de LPS que provocan reducción celular -Fujimori y cols.2001- -figura 4,6-. Esta participación inflamatoria favorecería el AG al invertir estos fármacos la acción de la LPS con excepción de fenitoína -Modéer y cols.1992b,c-. Un estudio *in vitro* de Sato y cols.2005 puso en evidencia la interacción de nifedipina con la inflamación al observar un aumento máximo de la proliferación y síntesis de DNA de fibroblastos cuando había presencia combinada de nifedipina y interleucina 1 β (IL1 β).

La ciclosporina también podría influir en la síntesis de prostaglandinas (PGs): disminuiría de forma significativa la síntesis vascular de PGI₂ *in vivo*-*in vitro*. Esta PG tiene una función de regulación de la proliferación celular y de la matriz extracelular en la encía, por lo que la influencia de ciclosporina tendría un efecto de estimulación de la actividad proliferativa y mitótica de los fibroblastos según un estudio realizado en tejido gingival de ratas, conejos y humanos -Nell y cols.1996-. También influiría sobre la síntesis de PGE de forma indirecta a través de citocinas como tumor necrosis factor α (TNF α) -Wondimu y Modéer 1997-, células intermediarias y su liberación *in vitro* - hasta un 77% y un 39,3% de incremento por incubación de ciclosporina y de azatioprina respectivamente, al comparar con controles- -Roberts y cols.1989, Pistorius y cols. 2003-. Fenitoína actuaría a través de algunas citocinas como IL1 β o TNF α , aumentando la síntesis de PGE₂ y de LPS -Modéer y cols.1992b-. En general la actividad metabólica es más alta en tejidos inflamados al comparar con tejidos sanos.

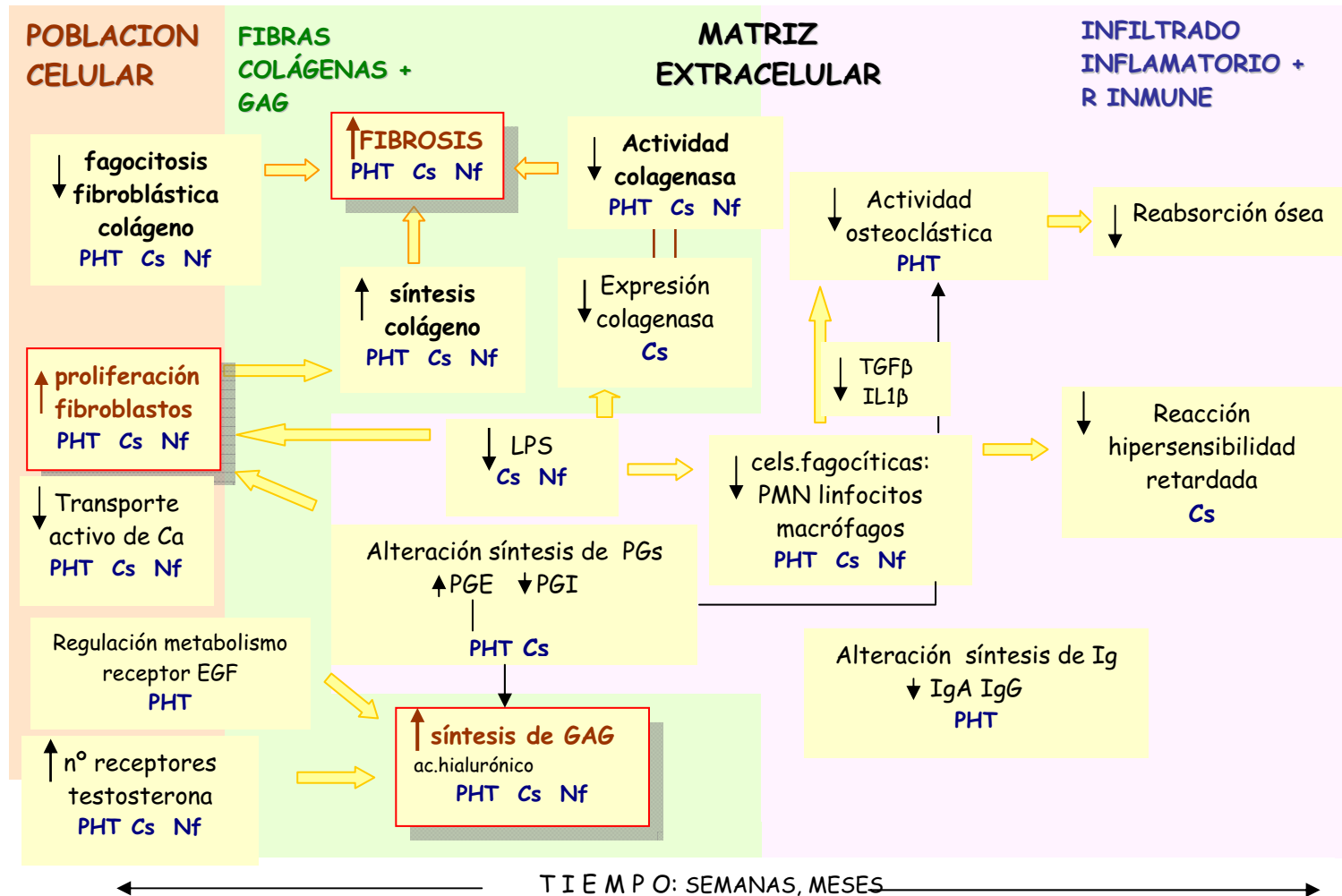
Los tres fármacos inductores de AG reducen la respuesta inmunitaria. Se ha observado que ciclosporina inhibe específicamente los linfocitos T-cooperadores, en cambio los linfocitos T-supresores serían los menos afectados. Se mantendría la respuesta humoral de los linfocitos B con secreción de inmunoglobulinas y también inhibiría la activación de los macrófagos -Marshall y Bartold 1998-. Las dihidropiridinas también tendrían un efecto de supresión de la proliferación de linfocitos T.

En estudios *in vitro* se ha observado que la acción de fenitoína y su metabolito (HPPH) en cultivos de linfocitos con mitógeno -concanavalina A- son capaces de potenciar la acción mitogénica en presencia de células fagocíticas mononucleares y favorecer la proliferación de los linfocitos, lo que no sucede si hay ausencia de estos fagocitos -Dahllöf y cols.1986a-.

Los antagonistas del calcio presentan un efecto inmunomodulador dosis-dependiente y reversible sobre linfocitos *in vitro* al inhibir la activación linfocítica después de la estimulación por mitógenos, la migración linfocítica inducida por citocinas, su actividad citotóxica y la síntesis proteica intracelular. La reducción de la proliferación de los linfocitos T podría ocurrir por interferencia con las células fagocíticas y con cambios en las proporciones de linfocitos/macrófagos -Pernu y Knuutila 2001-.

Habría una alteración en la concentración de las inmunoglobulinas (Ig) a nivel sérico y salival con repercusión en el tejido gingival mediante mayor inflamación. Se ha comprobado una disminución de IgA durante el tratamiento con fenitoína y otros fármacos antiepilépticos -carbamazepina- -Marshall y Bartold 1998-. Estos cambios provocarían una dificultad para el reconocimiento antigénico -Seymour y Heasman 1988, Brown y cols.1991a-. La disminución de los niveles de IgA en el tejido gingival puede favorecer la acción de la placa bacteriana en su permanencia y desarrollo y aumentar la respuesta inflamatoria crónica en la encía marginal con resultado de sobrecrecimiento -Aarli 1976a-. Esta disminución sérica de IgA se inició a los 2-3 meses de terapia con fenitoína, fue más frecuente en pacientes *responder* y reversible con el cese del tratamiento anticonvulsivante -Aarli 1976b, Gilhus y Aarli 1981-. En otro estudio -Aarli 1976c-, se realizó un seguimiento de las fluctuaciones en los niveles séricos de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgE y IgA en 15 pacientes epilépticos, los descensos de IgG y IgM fueron inconsistentes así como las oscilaciones de IgE; en cambio la disminución observada en IgA fue más evidente así como su reversibilidad después de la terapia. Los niveles séricos de IgG eran más bajos en los pacientes que presentaban menor tiempo de exposición al fármaco que en aquéllos con 10 años de terapia. Con la disminución de las respuestas humoral y celular se produciría una depresión en el comportamiento de los linfocitos T y en la reacción de la hipersensibilidad retardada con reducción de los complejos Ag-Ac, producción de citocinas y actividad del complemento. Por consiguiente su conexión con la actividad osteoclástica quedaría también

ESTADO DE LA CUESTIÓN
SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA



-figura 4,6: Esquema de las acciones de los fármacos a nivel tisular gingival con interacción de la inflamación en la patogenia del AG. PHT:Fenitoína, Nf:Nifedipina, Cs:Ciclosporina, LPS:Lipopolisacárido, PMN:Leucocitos polimorfonucleares, PGs:Prostaglandinas, EGF:Factor de crecimiento epidermoide,TGFβ: Factor de crecimiento transformante,IL1β: Interleucina 1β, GAG:Glicosaminoglicanos, Ig:Inmunoglobulinas-

reducida y no habría pérdida de hueso alveolar significativa en los pacientes sometidos a terapia con fenitoína-Thomson y cols.1983, Seymour y Heasman 1988-.

4.4.4-Interacción con el metabolismo hormonal.

Se ha comprobado que los andrógenos se metabolizan usualmente en la encía. Sus productos activos -5 α -dihydrotestosterona y 4-androstenediona-promueven una proliferación de fibroblastos con un efecto estimulador de su actividad sintética. Este proceso farmacológico aumentaría por la inflamación gingival asociada a la placa bacteriana, de forma más evidente en la mujer al equiparar esta capacidad metabólica con el hombre. También se incrementaría por inducción de fenitoína ya que los receptores gingivales se multiplicarían y los efectos esteroideos en los fibroblastos también estarían modificados -Southren y cols.1978, Vittek y cols.1979, Sooriyamoorthy y cols.1986, 1988, 1990, Ojanotko-Harri y cols.1992- -figura 4,6-. Por la influencia de las hormonas sexuales el AG sería más prevalente en edades más tempranas -ver en Epidemiología 4.3.1.4-VARIABLES demográficas.

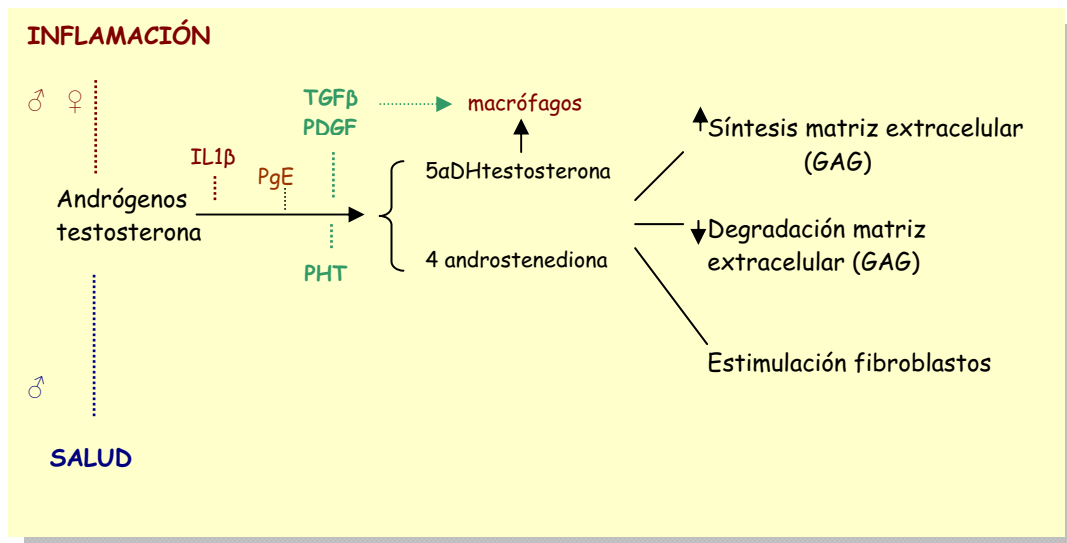
Las observaciones anteriores se han comprobado *in vitro* con sustratos de testosterona y/o de 5 α -dihydrotestosterona al aumentar su síntesis en cultivos de fibroblastos sometidos a fenitoína, IL1 β y EGF. Este metabolito activo participaría en la producción de matriz extracelular -Soory y Kasasa 1997- -figura 4,7-.

Por el mismo motivo la acción de sustancias antagónicas como algún inhibidor de la fosfatasa alcalina -levamisole - o un antiandrógeno -finasteride- podría influir en la reducción de los niveles de andrógenos en los fibroblastos estimulados por fenitoína y disminuir el AG -Soory y Suchak 2002-. Todos los resultados de estas aportaciones experimentales presentan variaciones interindividuales debido a la distinta sensibilidad ante la terapia con fenitoína.

Los andrógenos en un ambiente de inflamación gingival podrían influir también en la fagocitosis de los macrófagos, con acción intermediaria de la histamina -Soory y Suchak 2001-, y estimular la síntesis de macromoléculas de la matriz extracelular -ac. hialurónico y proteoglicanos- -Kasasa y Soory 1998, Soory y Virdy 1998- -figura 4,7-.

Sooriyamoorthy y cols.1990 comprobaron que en pacientes con encías inflamadas y sometidos a terapia combinada de ciclosporina y nifedipina, presentaban niveles significativamente más elevados de 5 α -dihidrotestosterona y de 4-androstenediona que el control, procedente de encía sana, y eran ligeramente más elevados que los niveles observados en las encías de los pacientes monoterápicos.

Podría haber una competencia de fenitoína con la hormona adrenocórticotropa (ACTH) y disminución de la síntesis de glucocorticoides de la corteza suprarrenal. Tal vez de forma compensatoria aumentaría la secreción de hormona de crecimiento que produciría un incremento en la proliferación de fibroblastos y en consecuencia la aparición de AG según algunos autores -Seymour y Heasman 1988-. Aunque hay que recordar que la hormona de crecimiento actúa sobre la mayoría de las células del organismo sin un órgano diana específico



-figura 4,7: Acciones de las hormonas sexuales sobre el tejido conectivo gingival. PHT: Fenitoína, PgE: Prostaglandina E, TGFβ: Factor de crecimiento transformador, PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL1β: Interleucina 1 β-

4.4.5-Aumento de los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular.

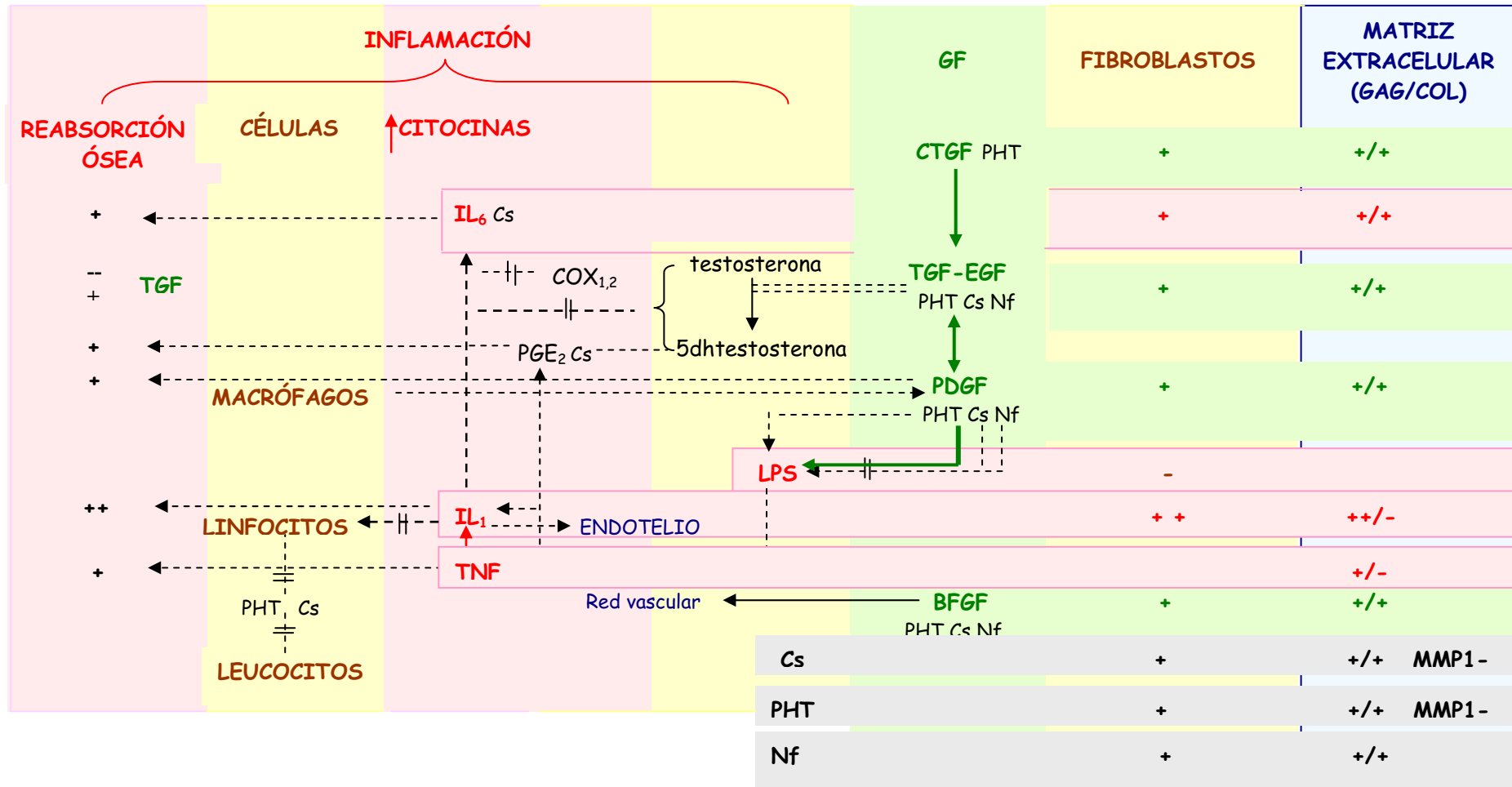
La inflamación gingival favorecería una reducción de la actividad fagocítica de los fibroblastos en el tejido inducido por ciclosporina o fenitoína, lo que podría explicar el aumento de volumen por un resultado neto de más tejido sintetizado -McGaw y Porter 1988, Varga y cols.1998-. El exceso de matriz extracelular conectiva que se observa podría ser consecuencia de un incremento en la proliferación de fibroblastos con mayor capacidad de síntesis y secreción o simplemente un exceso de producción de glicosaminoglicanos (GAG) -Varga y cols.1998-. La implicación podría ser indirecta a través de la acción tisular de mediadores solubles de la inflamación y de la respuesta inmune -factor de crecimiento transformador β (TGF β_1)- -James y cols.1995, Cotrim y cols.2002- como se ha comprobado en fibroblastos cultivados procedentes de pacientes con AG que mostraban un incremento de GAG intra y extracelular -Kantor y Hassell 1983, Dahllöf y Hjerpe 1987- figura 4,7-.

En un estudio histopatológico se observó que en muestras de AG provocado por fenitoína, había un aumento de proteoglicanos en la matriz extracelular sin un incremento relativo del colágeno al comparar con explantes de encía normal -Dahllöf y cols.1986b-. Lucas y cols.1985 observaron la histología de 4 muestras de encía, las procedentes de AG por fenitoína y por nifedipina presentaban un aumento de fibroblastos con alta concentración de mucopolisacáridos y presencia de gránulos de secreción en el citoplasma de los fibroblastos de AG inducidos por nifedipina.

En un estudio *in vitro* sobre poblaciones de fibroblastos procedentes de 2 localizaciones distintas de encía -libre e insertada- se comprobó que fenitoína era capaz de aumentar los niveles más bajos de GAG extracelular en la muestra de encía libre y también la concentración intracelular de GAG en los fibroblastos de encía insertada. El ácido hialurónico mantenía una concentración complementaria intra-extracelular con los niveles de GAG en los 2 tipos de encía -Pagliarini y cols.1995-.

Hay estudios de muestras de AG provocadas por ciclosporina o de cultivos de fibroblastos sometidos a ciclosporina y factores de crecimiento -TGF β - que comprueban un aumento de la concentración de GAG y matriz no colagénica en general al comparar con muestras procedentes de encía sana -Mariotti y cols.1998, Stabellini y cols.2004-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 4,8: Interacciones entre fármacos inductores, moléculas mediadoras -citocinas, factores de crecimiento- y elementos estructurales. Cs:Ciclosporina, Nf:Nifedipina, PHT:Fenitoína,LPS:Lipopolisacárido, COX_{1,2}:Ciclooxigenasa 1 y 2, IL:Interleucina, PGE₂:Prostaglandina E, GF:Factores de crecimiento, CTGF:Factor de crecimiento del tejido conectivo, TGF:Factor de crecimiento transformador, EGF:Factor de crecimiento epidermoide, PDGF:Factor de crecimiento derivado de las plaquetas, BFGF:Factor de crecimiento fibroblástico, TNF:Factor necrosis tumoral, GAG:Glicosaminoglicanos, COL:Colágeno, MMP1:Metaloproteinasas 1-colagenasa, TIMP:Inhibidor tisular de la metaloproteinasas.

Sobhani y cols.1989 comprueban un incremento en la síntesis de proteínas de la matriz, proporcional y dependiente de las dosis de ciclosporina que se administran a nueve cepas de fibroblastos gingivales humanos: a 100ng/ml 3 cepas aumentan la cantidad proteica, a 400ng/ml 5 cepas, a 1000ng/ml ya son 8 cepas.

En lesiones inflamatorias de rata la inducción de ciclosporina permitiría la acumulación de macromoléculas de GAG y un proceso de fibrosis -Bartold y cols.1989c-.

En un estudio *in vitro* de fibroblastos sometidos a la acción de ciclosporina y nifedipina se comprobó un incremento sustancial de GAG al comparar con las muestras de fibroblastos de encía sana y fibroblastos *non responder* inducidos por ciclosporina. Este aumento de GAG se relacionó con una alteración del metabolismo del precursor ³H-glucosamina y en ningún caso con aumentos significativos de la proliferación fibroblástica ni de colágeno -Zebrowski y cols.1994- -figura 4,8-.

Otras células, inflamatorias e inmunitarias, podrían participar en la producción de estas macromoléculas de mucopolisacáridos: los PMN serían capaces de sintetizar y secretar *in vitro* proteoglicanos aunque de características moleculares distintas -Bartold y cols.1989a-. También los linfocitos activados estarían directamente relacionados con la síntesis de proteoglicanos según un estudio *in vitro* realizado con timocitos y linfocitos de rata, con independencia de la proliferación celular -Bartold y cols.1989b-.

En un estudio en el que se analizó la expresión génica de esta matriz extracelular en muestras de AG por ciclosporina, se comprobó por técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), un aumento de la transcripción de perlecán al compararla con la de un grupo control de encía sin AG. La función de esta macromolécula estaría en las interacciones con otros proteoglicanos mediante la intervención de factores de crecimiento con influencia en la síntesis de fibras de colágeno. Otras macromoléculas de la matriz -decorín, biglycán, versicán- no se alteraron y su función estaría en la modulación y organización de la fibrogénesis del colágeno pero con funciones antagónicas en la regulación por TGFβ -Kähäri y cols.1991, Gnoatto y cols.2003-. Habría una interacción entre la formación de GAG y su implicación en la síntesis de fibras colágenas -Kantor y Hassell 1983-.

En el desarrollo del AG podrían intervenir proteínas acídicas ricas en cisteína a nivel de la matriz extracelular, según se comprobó en un estudio *in vitro* con fibroblastos sometidos a la acción de ciclosporina, tacrolimus y a su vehículo por la técnica de RTPCR. La presencia de estas glicoproteínas específicas sólo se produjo en los cultivos tratados con ciclosporina que inducen AG, y no en aquéllos sometidos a tacrolimus o a su vehículo. Se puede considerar que este fármaco inmunosupresor -tacrolimus- estabilizaría la matriz extracelular sin provocar sobrecrecimiento gingival por falta de transcripción de estas proteínas acídicas -Gagliano y cols.2005-.

4.4.6-Factores de crecimiento y citocinas.

Estas proteínas se consideran factores reguladores de la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular. En los cultivos de fibroblastos también se han observado cambios como consecuencia de su acción -Zebrowski y Singer 1989-. Se liberan de forma autocrina y paracrina con acciones diversas y complejas de síntesis, regeneración y reabsorción tisulares -figura 4,8-. Entre ellas se puede citar el control de la síntesis transcripcional proteica en el fibroblasto con interés para el colágeno y la colagenasa -Narayanan y cols.1986, Narayanan y Page 1987-.

Su síntesis y secreción derivadas de los linfocitos T queda alterada por la acción de los fármacos inductores, junto con la de otros mediadores que influyen en el comportamiento de los macrófagos y en la respuesta inmunitaria celular, según se ha observado en estudios *in vitro* -Thomson y cols.1983-.

Se distinguen principalmente: factor de crecimiento (GF) transformador - Ver en D-Diseño del Estudio-, GF epidermoide, GF derivado de plaquetas y GF fibroblástico. Otros péptidos, por su efecto tisular más destructivo, se conocen como citocinas; se consideran importantes: las interleucinas y el factor tumor-necrosante -Woessner 1991-.

El GF epidermoide (EGF) se ha aislado en boca por su secreción salival. Participa en la reparación y regeneración de los tejidos con aumento de la síntesis de DNA y de proteínas. Promueve la producción de GAG y estimula el flujo de Ca en cultivos de fibroblastos *in vitro*. Sus acciones biológicas dependen de un receptor específico de membrana (EGF-r) -Huey y cols.1980, Modéer y Andersson 1990, Modéer y cols.1990-.

EGF-r se localiza en una cantidad importante en la mucosa bucal y detectable sólo en encía inflamada, aunque los niveles de EGF permanezcan en cualquier estado tisular.

La fenitoína regula el metabolismo del EGF-r en la membrana plasmática para que se produzca la estimulación del fibroblasto en la unión con el ligando. Es capaz de disminuir esta internalización y en compensación aumentar el número de EGF-r -Modéer y Andersson 1990-. Los fibroblastos *responder* presentan un comportamiento distinto: según un estudio de Modéer y cols.1990 realizado con fibroblastos procedentes de 2 pacientes sometidos a terapia con PHT, uno con AG y el otro *non responder*, no mantuvieron diferencias significativas en la afinidad de EGF a su receptor durante el tratamiento con fenitoína, pero sí que se apreciaron diferencias en los niveles de mRNA EGF-r siendo bajos en *responder -down-regulation-*, con internalización del EGF-r más acentuada -Alberts y cols.1996-.

Bajo tratamiento con ciclosporina se detectaron niveles elevados de EGF en saliva en pacientes *responder* al comparar con pacientes control *non responder*, su relación fue inversa al observar las muestras séricas. En flujo crevicular no se detectaron indicios de EGF -Markopoulos y cols.2001-.

En muestras de AG procedentes de nifedipina y de nicardipina se produjo *in vitro* un aumento en la proliferación celular con incremento en el número de receptores de EGF al someter los fibroblastos a otros antagonistas del calcio y a fenitoína y comparar con controles no medicados -Matsumoto y cols.2001-.

El GF derivado de las plaquetas (PDGF) es esencialmente un factor regulador muy ubicuo que estimula la proliferación fibroblástica y la síntesis proteica -colágeno III y IV, GAG y fibronectina- -Narayanan y Page 1983, Cochran y cols.1989-. En el proceso inflamatorio se produce en cambio un patrón destructivo por la presencia de IL1 β . Al parecer los monocitos y macrófagos definirían el fenotipo de comportamiento -degradativo, proliferativo,..- según la síntesis de diversos GF -Dill y cols.1993, Offenbacher 1993, Nares y cols.1996, Plemons y cols.1996-. Tacrolimus no induciría a PDGF ni a GF transformante β (TGF β), a diferencia de ciclosporina -Boltchi y cols.1999-, aunque los niveles plasmáticos de TGF β estarían elevados con la administración de ambos inmunosupresores al comparar con controles -Ellis y cols.2004b-.

También PDGF reduce el efecto inhibitorio que provoca la endotoxina lipopolisacárido sobre el crecimiento de fibroblastos gingivales -Bartold y cols.1992-figura 4,8-. Interviene como mediador en el metabolismo gingival androgénico en presencia de enfermedad periodontal inflamatoria al actuar conjuntamente con TGF β y PGE $_{1y2}$ -Kasasa y Soory 1996, Soory y Gower 1998- -figura 4,7 y 4,8-. En estudios inmunocitoquímicos, muestras de encía humana sometidas a nifedipina, permitieron la observación de anticuerpos correspondientes a PDGF, TGF β y CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo) -Kataoka y cols.2001, Uzel y cols.2001-.

El GF fibroblástico (FGF) engloba un grupo de proteínas de las que interesa mencionar algunas por su implicación en la patogenia del AG: GF fibroblástico básico (BFGF) que actuaría por estimulación de fenitoína en tejidos diana y sería liberado a la circulación. Los pacientes con AG provocado por fenitoína tienen mayores niveles séricos de BFGF que los controles y se asoció este dato con la severidad del AG -Sasaki y Maita 1998-. Se ha comprobado que fenitoína y su metabolito actuarían sobre células de la circulación para liberar factores de esta familia que potenciarían la síntesis de DNA de fibroblastos gingivales para su proliferación en estudios *in vitro* -Modéer y cols.1989-. Nifedipina estimularía su síntesis y en consecuencia se produciría un incremento en la proliferación gingival de fibroblastos y en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular -Saito y cols.1996, Sasaki y Maita 1998-figura 4,8-. También fenitoína, nifedipina y ciclosporina serían capaces de aumentar la transcripción de mRNA de otro factor de la familia -GF queratinocítico (KGF)- y controlar la síntesis de sus receptores. Este factor tiene una acción directa en las células epiteliales y controla la homeostasis epitelial en muchos tejidos -Das y Olsen 2000, 2001, Das y cols.2001-.

Se ha comprobado que BFGF junto con otros GF -endotelial vascular, angiopoietina 1 y TGF β_1 - forma un conjunto de factores angiogénicos que participarían en el desarrollo de la red vascular en tejidos en crecimiento como sería el caso del AG -Yang y Moses 1990--figura 4,8-. Estos factores actúan en equilibrio con otros denominados angiostáticos -angiopoietina 2, endostatina, angiostatina, inhibidores de la angiogénesis específicos del cerebro y trombospondinas-. Según el estudio de Koh y cols.2004 en muestras de AG inducidas por ciclosporina, se comprobó la expresión génica de estos factores y se observó que sólo había diferencias significativas en la trombospondina 2 con disminución en su expresión en AG al comparar los resultados con controles sanos. No se apreciaron incrementos de factores

angiogénicos por lo que se concluye que el proceso patogénico de AG que induce la ciclosporina sea distinto al de los otros fármacos inductores.

El GF de tejido conectivo (CTGF) actúa de mediador directo de las acciones de TGF β en la estimulación de la matriz extracelular *in vivo* e *in vitro* -Saito y cols.1996, Uzel y cols.2001, O'Hara y cols.2002-. En muestras de AG por fenitoína se observaron niveles significativos de CTGF ($p < 0.05$) en el estroma del tejido conectivo, área perivascular y capas endoteliales de los vasos sanguíneos. En cambio en sobrecrecimientos gingivales inducidos por nifedipina, ciclosporina y controles, los títulos de CTGF fueron bajos -Uzel y cols.2001-. Favorece la producción de colágeno tipo I, integrina α_5 y fibronectina desde los fibroblastos en forma de cascada en relación con TGF β -figura 4,8-.

La interleucina 1 β (IL1 β) es una citocina con gran potencia inductora en procesos inflamatorios -ver 2-Inflamación y respuesta adaptativa inmunitaria-. Favorece la proliferación de los fibroblastos de encía y del ligamento periodontal y a través de ellos la actividad procólagenasa y su inhibidor tisular -Van der Zee y cols.1997, Domeij y cols.2004-. En estudios *in vitro* se ha observado una acción sinérgica con factor necrosante tumoral (TNF α) en la inhibición de la síntesis de colágeno aunque a diferentes niveles: IL1 α , β modulan a un nivel pretraduccional y TNF α a nivel transcripcional y dosis-dependiente -Mauviel y cols.1991- -figura 4,8- -ver D-Diseño del Estudio-.

En combinación con los inhibidores de la ciclo-oxigenasa 1 y 2, controla la producción de IL6 por los fibroblastos gingivales humanos *in vitro* a través de la PGE $_2$ endógena -Bartold y Haynes 1991, Czuszak y cols.1996, Tipton y cols.2003-. Su acción conjunta con PGE $_2$ inhibe la proliferación de linfocitos -Bartold y cols.1989b-figura 4,8-.

Es sinérgica con fenitoína en su acción de reducir o frenar la expresión de $\alpha 1$ procólageno mRNA o de su expresión génica -Modéer y cols.1996- y la potencia en su actividad y a través de ella a lipopolisacárido (LPS) para iniciar un proceso de reabsorción ósea -Czuszak y cols.1996, Marshall y Bartold 1998 -ver 4,4,3-Inflamación gingival-. Nifedipina y ciclosporina también presentan sinergismo con IL1 β al influir en la síntesis de colágeno. Según la cantidad de IL1 β el efecto sería de reducción de la síntesis -concentración baja- o de aumento de la síntesis de colágeno -concentración alta- Bartold y cols.1989b, Johnson y cols.2000-.

Su producción queda inhibida por reducción de sus receptores en los linfocitos Tcooperadores por la acción de la ciclosporina -Thomson y cols.1983- -figura 4,8-.

IL2 es importante en la proliferación celular de los linfocitos T podría influir en la síntesis de proteoglicanos al asociarse con IL1 β -Bartold y cols.1989b-, aunque en un estudio previo no se observaron diferencias en el recambio del *turnover* de los proteoglicanos al comparar entre presencia y ausencia de IL1 β -Bartold 1988-. Ciclosporina inhibiría la síntesis de IL₂ a bajas concentraciones y la capacidad de respuesta a IL₂ por bloqueo de los receptores.

IL6 se ha relacionado con el desarrollo y promoción del tejido conectivo gingival en el dismorfismo y tiene una acción estabilizadora del catabolismo promovido por citocinas proinflamatorias como TNF y IL1 β -Irwin y Myrillas 1998-. Los fibroblastos gingivales responden a ciclosporina con secreción de IL6, dependiente de la dosis, que aumenta la síntesis de colágeno y de glicosaminoglicanos (GAG) -Williamson y cols.1994, Morton y Dongari 1999-. Sus niveles eran más altos en muestras de AG inducidas por ciclosporina que en las de tejido gingival inflamado -Myrillas y cols.1999-. Los andrógenos reducen su producción y se compromete la capacidad de respuesta ante la inflamación bacteriana -Gornstein y cols.1999- -figuras 4,7 y 4,8-.

4.4.7-Influencia del flujo de Calcio a través de la membrana celular.

Se ha comprobado que los tres grupos de fármacos inductores tienen una acción directa en el flujo de Ca entre los compartimentos intra y extra -celular en su lugar de acción. Fenitoína es capaz de inhibir la entrada del ión a la célula en su mecanismo de acción intrínseco y también antagoniza la acción de algunos factores de crecimiento -EGF- que favorecen la entrada de Ca como señal para el progreso del ciclo celular en células inactivas -Brunius y Modéer 1989-. Cuando se comparaban las variaciones de flujo de Ca entre fibroblastos gingivales normales y *responder* por la acción de fenitoína, se obtenían diferencias significativas en las concentraciones de Ca intracelular, incluso al comparar con controles no tratados. El nivel basal de Ca citoplasmático en *responder* estaba decrecido de forma significativa al comparar con los *non responder* y también durante el efecto de fenitoína -Modéer y cols.1991-.

Para el estudio de distintas razones de proliferación fibroblástica *in vitro*, se observaron los efectos de distintas concentraciones de Ca necesarias en el medio de cultivo, con un margen entre 0 y 2 mM. Para conseguir una razón

regular o constante de crecimiento la concentración de Ca debía ser de 1 mM -Fujii y cols.1994-.

Los fármacos antagonistas del Ca como inductores de AG también bloquean los canales lentos del Ca, inhibiendo de este modo las acciones que se derivan de la concentración intracelular del Ca. La ciclosporina también bloquea las acciones que dependen del calcio en los linfocitos T -Dongari y cols.1993-.

4.4.8-Depleción de ac.fólico.

La fenitoína podría interferir en la absorción intestinal de ac. fólico con una inhibición directa del enzima folato reductasa y disminución de sus niveles séricos. El ac. fólico es necesario especialmente en puntos donde la tasa de recambio celular es alta como en el epitelio de unión del surco gingival por su acción en la síntesis de DNA -Brown y cols.1991a-. Al parecer el tratamiento crónico con fenitoína y la combinación con otros antiepilépticos provocaría una alteración en estos tejidos de *turnover* alto, con aumento del volumen corpuscular medio y de la hemoglobina corpuscular media, y cambios en el metabolismo de la vitamina B₁₂ típico de las anemias megaloblásticas hipercromáticas -Peñarrocha y cols.1989b-. Ante su deficiencia, el tejido conectivo subepitelial próximo sería más susceptible a la inflamación por la placa bacteriana.

4.4.9-Influencia vírica.

Se ha comprobado que las bolsas periodontales son reservorios para la replicación del Citomegalovirus (CMVH), su correlación con la patogenia del AG se ha estudiado en una población de niños transplantados hepáticos en los que se relacionó la severidad del AG provocado por ciclosporina y la infección vírica pero no se pudo concluir una asociación entre CMVH y el sobrecrecimiento gingival -Hosey y cols.2002-. Aunque según Nowzari y cols.2003 -ver en Epidemiología 4.3.1.7 página 104- habría una asociación entre periodontitis y CMVH en pacientes transplantados renales.

Hay una evidencia de infección vírica por papilomavirus humano (PPVH) en una muestra de AG inducido por ciclosporina por transplante renal en una

mujer adulta -Saglam y cols.1996-. En un estudio histopatológico en el que se compararon 13 biopsias de AG procedentes de terapia con ciclosporina de pacientes transplantados renales con 4 muestras de mucosa sana de los mismos enfermos, 12 de las procedentes del AG presentaban infección por PPVH y reacción al DNA vírico en las sanas, por lo que podría suponerse un aumento de riesgo a la infección de PPVH -Bustos y cols.2001-. En otro estudio con 38 pacientes diagnosticados de enfermedad periodontal se realizaron biopsias de muestras gingivales para estudiar la presencia de DNA vírico de PPVH mediante la técnica RT-PCR y se observó un 26% de biopsias positivas con localización en la zona más coronal del epitelio de unión de la bolsa -Hormia y cols.2005-. Se podría sospechar la infección vírica en las células basales del epitelio de unión como diana del virus en concordancia con otros estudios.

En perros *Beagle* sometidos a terapia de ciclosporina durante 26 semanas con aparición de lesiones cutáneas papilomatosas de estructura histológica similares a AG inducido por fármacos, no se encontraron indicios de infección por PPVH -Seibel y cols.1989a-.

4.4.10-Alteraciones génicas.

Se ha observado en algunos estudios *in vitro* realizados a partir de casos clínicos de sobrecrecimiento gingival por fármacos inductores la aparición de carcinomas escamosos. Se estudiaron unas muestras de sobrecrecimiento gingival por nifedipina y por fenitoína en la expresión de una proteína *protectora* del genoma -*p53* en el brazo corto del cromosoma 17- que por agentes carcinogénicos podría provocar un fenotipo de descontrol celular similar al observado en neoplasias malignas en las que se detecta una mutación o pérdida del gen *p53*. Otro de los marcadores estudiados fue el antígeno nuclear *ki-67*, observado en tejidos displásicos y carcinomas orales escamosos. También se ha comprobado un aumento de la expresión de TGF β en tejidos tratados tópicamente con productos derivados del benceno y del forbol que facilitarían el desarrollo de papilomas y displasias precancerosas -Saito y cols.1999-.

4.5-Histopatología del Agrandamiento gingival farmacológico

Las muestras de AG se caracterizan por presentar una alteración estructural en los tejidos que lo componen con similitud entre los distintos tipos de AG -ver 3.2 Clasificación del AG-, pero con características particulares en la proporción de los componentes del parénquima y del estroma en el AG farmacológico (AGIF) según el fármaco inductor -Bonnaure-Mallet y cols.1995-.

La mayoría de autores coinciden en aceptar que el AGIF es una lesión proliferativa a expensas del compartimento extracelular con poca variación en la celularidad en su aspecto de proliferación o modificación cualitativa - Lucas y cols.1985, Hassell y Hefti 1991, Bonnaure-Mallet y cols.1995-.

Para el estudio de la composición estructural de los tejidos patológicos se utilizan técnicas que se agrupan en la observación de la morfología de los componentes histológicos -microscopía, inmunocitoquímica- y en estudios de comportamiento celular en cultivos de células de tejidos.

4.5.1-Microscopía óptica y técnicas de inmunofluorescencia.

La anatomía patológica del AG -figura 4,9- confirma la presencia de unas características determinadas en el epitelio y el conectivo:

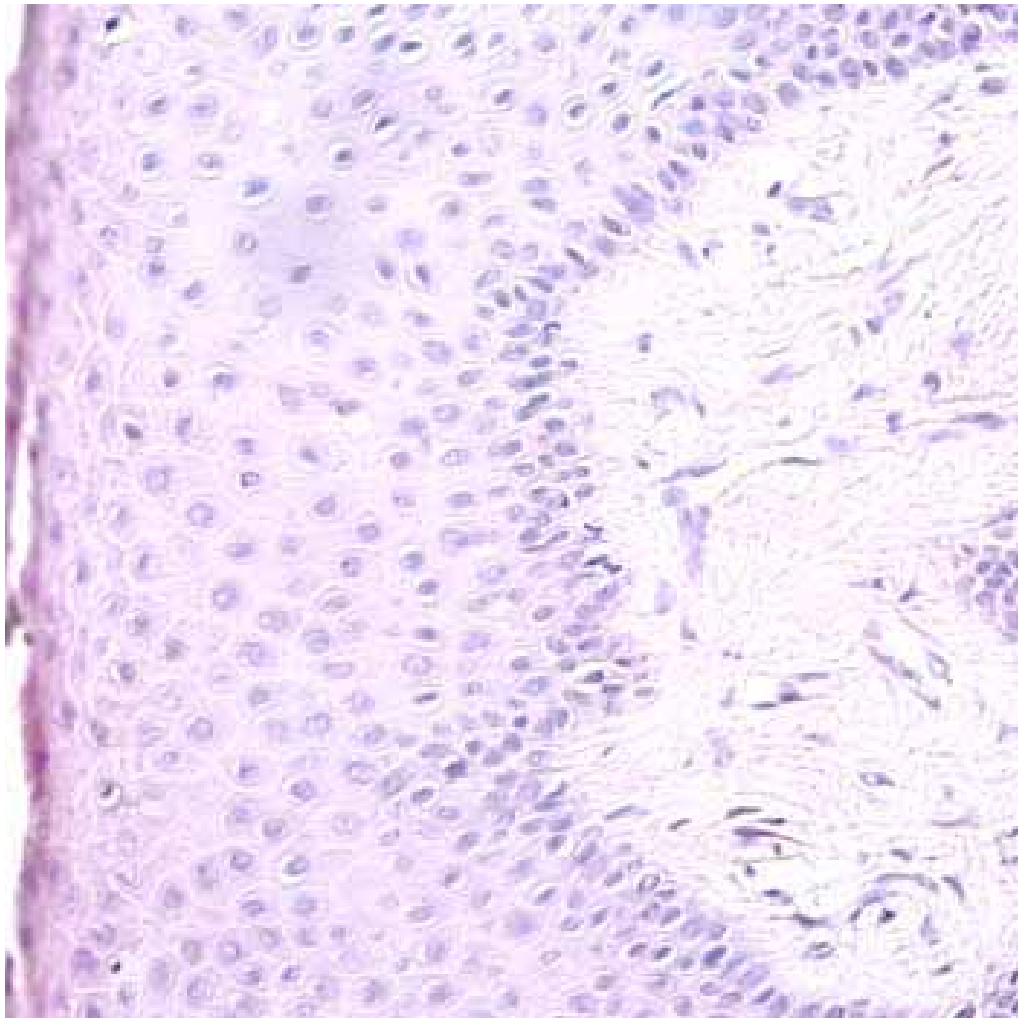
- epitelio acantótico escamoso paraqueratinizado
- interdigitaciones papilares elongadas con diseño tubular
- infiltrado inflamatorio crónico variable
- aumento de fibroblastos, macromoléculas y fibras colágenas en la matriz extracelular en proporción variable

-Wysocki y cols.1983, Pernu y cols.1989, Brown y cols.1991a, Nishikawa y cols.1991, Tipton y cols.1994, Pernu y Knuuttila 2001-

El epitelio presenta una acantosis -hiperqueratosis-, con alteración en la queratinización de la capa córnea -paraqueratosis-. Este aumento de volumen inducido por nifedipina y ciclosporina sería a expensas de la capa espinosa. Las papilas epiteliales son muy alargadas, se interdigitan con el corion conectivo especialmente en

ESTADO DE LA CUESTIÓN

muestras de AG por ciclosporina; también aparecen islas epiteliales aisladas por las secciones tangenciales de la muestra -Wysocki y cols.1983, Bowman y cols.1988-. Pernu y cols.1989 aportan en AG por verapamil perlas disqueratósicas en las papilas epiteliales. Pueden haber células de Langerhans pero están disminuidas al comparar con muestras histológicas de encía normal -Perona y cols.1987-.



-figura 4,9: Histopatología de una muestra de AG inducida por ciclosporina de paciente transplantado renal. Se puede observar un epitelio con células que conservan sus núcleos en la capa córnea, y una fibrosis en la lámina propia. Imagen original -

La proliferación celular de queratinocitos estaría aumentada por un incremento de la actividad mitótica en la capa basal del epitelio oral y no tan acentuada en el epitelio sulcular o en la cresta de la papila al observar muestras gingivales procedentes de AG por nifedipina y AG de pacientes que recibían tratamiento con inmunosupresores -ciclosporina, azatioprina, prednisolona-. Al parecer las áreas de submucosa con inflamación no favorecerían la mitosis -Nurmenniemi y cols.2001-.

El tejido conectivo está aumentado por un incremento de fibras colágenas en disposición variada y de sustancia fundamental amorfa. En ésta aparecen macromoléculas de mucopolisacáridos y glicoproteínas -fibronectina- distribuidas entre las fibras de colágeno y elastina -Wysocki y cols.1983, Lucas y cols.1985, Rostock y cols.1986, Deliliens y cols.1986-. La población de fibroblastos presenta un número moderado-alto de células -Wysocki y cols.1983, Bowman y cols.1988-. El infiltrado inflamatorio es variable con diferentes tipos celulares: leucocitos, macrófagos, linfocitos.

Estas observaciones histológicas coinciden con las descritas en unas lesiones cutáneas en 12 perros *Beagle* sometidos a terapia de ciclosporina - 30 mg/Kg/día- durante 26 semanas -Seibel y cols.1989a-.

En un estudio de Pernu y Knuuttila 2001 se observó en muestras de AG por nifedipina de pacientes cardíacos, un aumento de linfocitos CD8 en la lámina propia por debajo del epitelio sulcular y una concentración de macrófagos con aspecto reparativo y proliferativo en el tejido conectivo subyacente al epitelio oral al comparar con muestras de encía sana.

En el estudio histopatológico de la matriz extracelular de Bonnaure-Mallet y cols.1995, las 20 biopsias analizadas se tomaron de los AGIF conocidos por los 3 fármacos inductores -fenitoína, ciclosporina, nifedipina-, cuatro por cada procedencia, otras cuatro eran muestras de gingivitis marginal crónica y las 4 restantes eran controles gingivales sanos. Los resultados se cuantificaron y se compararon entre ellos. Se observó en todas ellas que en los componentes de la matriz extracelular la trama vascular ocupaba un 2-6% de la totalidad, los fibroblastos entre 0.6-1.6%, la fibronectina se situaba entre un 10 y un 20%, las fibras elásticas representaban menos de un 3%, en cambio el colágeno se extendía desde un 56% hasta un 83% del que destacaba el tipo III y el tipo IV.

Narayanan y Hassell 1985 coinciden en esta observación con descenso del colágeno I y aumento del tipo III en muestras de AG por fenitoína. En otros estudios de estos autores se comprueba la presencia de colágeno en sus diferentes tipos a partir de muestras de encía humana, y se comparan con AG por fenitoína, AG inflamatorio y encía sana y se confirma un cambio en la proporción de colágeno tipoI/tipoIII variando de forma significativa en el AG inflamatorio con un incremento sustancial del tipo V con respecto a encía sana como en lesiones fibroproliferativas -Narayanan y cols.1983, Narayanan y Page 1985, Bonnaure-Mallet y cols.1995-. En muestras de encía inflamada no se observaba apenas presencia de colágeno tipo III -Narayanan y Page 1976, Narayanan y cols.1988-. Al asociar suero con factores de crecimiento aumentaba el depósito de colágeno V y disminuía el colágeno III -Narayanan y Page 1983-.

Por consiguiente los análisis inmunohistoquímicos destacaron el colágeno tipo IV más abundante en muestras de AG por ciclosporina con localización principal en la membrana basal. En cambio el colágeno tipo III tenía mayor presencia en la gingivitis marginal y en muestras de AG por fenitoína ya citadas. El colágeno ocupaba una zona en AG inducido por nifedipina que era significativamente mayor que en los otros AGIF y similar al control -Bonnaure-Mallet y cols.1995-.

En un estudio comparativo de fibroblastos tratados con fármacos inductores se observó mucha fibrosis en las muestras de AG por fenitoína, mientras que las procedentes de ciclosporina y nifedipina no presentaban diferencias significativas con respecto al grupo control. En estas muestras, la inflamación era muy evidente en cambio AG por fenitoína apenas presentaba. Las crestas epiteliales eran más acentuados en AG provocado por fenitoína que en los otros grupos -Uzel y cols.2001-. Por el contrario, los estudios de Wysocki y cols.1983, Thomason y cols.1998 sí que aportan un incremento de la fibrosis por aumento de los fibroblastos y del colágeno en muestras gingivales sometidas a ciclosporina. En éstas, según otros autores, el colágeno denso se alternaba con áreas incrementadas de cambios mixomatosos, no se apreciaba un incremento en la población de fibroblastos y en el estroma el infiltrado inflamatorio era rico en células plasmáticas -Rostock y cols.1986, Deliliers y cols.1986, Bonnaure-Mallet y cols.1995-.

La fibronectina y las fibras elásticas se presentan con mayor predominio en

AG de nifedipina al comparar con otros AGIF y es característica su localización y cuantificación con respecto a los otros AGIF y podría ser resultado de una acción específica del fármaco -Romanos y cols.1993, Bonnaure-Mallet y cols.1995-. Aunque Tipton y cols.1994 no observaron este incremento ni el de GAG al comparar el sobrecrecimiento gingival de nifedipina con muestras de encía sana.

La fracción de matriz extracelular no fibrótica también experimenta un incremento. En AG por fenitoína, el colágeno disminuyó de forma relativa con acumulación de matriz no colagénica. La composición de esta matriz extracelular era de condroitín sulfatos disacáridos y no sulfatados, dermatán sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico -Dahllöf y cols.1986b, Solomon y cols.1986-. Aunque al parecer no habrían diferencias significativas entre la distribución por tamaño molecular de ácido hialurónico y glicosaminoglicanos (GAG) al comparar tejidos gingivales sanos y con agrandamiento -Martins y cols.2003-.

El área ocupada por vasos en sobrecrecimientos gingivales por nifedipina y por fenitoína era mayor que el control, que la correspondiente a la muestra de AG inducida por ciclosporina y que la que aparecía en la gingivitis marginal -Bonnaure-Mallet y cols.1995-.

En estudios con humanos se confirma un aumento de la circulación capilar en diferentes AGIF -vigabatrín, ciclosporina- además de la fibrosis y el infiltrado inflamatorio -Katz y cols.1997, Thomason y cols.1998-.

Los fibroblastos se distribuían en una zona que en muestras de AG por fenitoína era más amplia que en los otros AGIF. La extensión de fibroblastos en AG por nifedipina y por ciclosporina fue menor que en encía sana -Bonnaure-Mallet y cols.1995-. Aunque otros autores observaron otras proporciones: La población de fibroblastos destacaba más en muestras de AG por nifedipina según Lucas y cols.1985 y Barak y cols.1987. Hall y Squier 1982 en su estudio morfológico de sobrecrecimientos por fenitoína en monos no observan un aumento del número de fibroblastos. Spolidorio y cols.2002 refieren una mayor celularidad en la población fibroblástica con aumento de las fibras colágenas y decrecimiento vascular en AG por ciclosporina.

En estudios realizados con modelo de ratas sometidas a dieta de ciclosporina, se comprobó un aumento de la encía marginal con incremento

del número de capas celulares del epitelio e hipertrofia con alteración de la queratinización. La afectación del epitelio también se extendía al sulcular y al de unión. En el corion se observó una trama vascular extensa con vasodilatación, mayor proporción de la matriz extracelular y reducción del número de fibroblastos al comparar con el control y con muestras *non responder* sometidas a ciclosporina -Ayanoglou y Lesty 1999-.

También en ratas los AG provocados por nifedipina no presentaron un patrón inflamatorio tan marcado como en humanos y un gran depósito de colágeno tipo I -Barak y cols.1987, Kataoka y cols.2001-.

4.5.2-Microscopía electrónica.

Hall y Squire en 1982 estudiaron la ultraestructura del AG por fenitoína en hurones y observaron que los fibroblastos presentaban unas características en número y forma invariables, los fagosomas estaban disminuidos y el colágeno ocupaba un volumen inferior con respecto a la sustancia fundamental.

El retículo endoplásmico rugoso de los fibroblastos puede indicar en su densidad y en su aspecto la capacidad de síntesis de proteínas independiente de la degradación, con repercusión de estos procesos en la matriz extracelular y explicar una posible patogenia del AG. Las observaciones de Hassell y Hefti en 1991 refieren un retículo endoplásmico rugoso de baja densidad y pocos gránulos con resultado de poca síntesis proteica, en cambio un retículo desarrollado con abundantes gránulos de secreción aparecía en fibroblastos próximos a zonas donde había colágeno más concentrado -Lucas y cols.1985-. Por este motivo hay semejanzas en la matriz intercelular entre AG inducidos por fenitoína y por ciclosporina ya que ambos presentan también gránulos de secreción densos en los fibroblastos -Sooriyaamoorthy y Gower 1989-.

En algunas circunstancias los fibroblastos adquieren modificaciones citológicas del tipo de miofibroblastos: formas fusiformes elongadas que presentan un abundante retículo endoplásmico rugoso con acumulaciones de microfilamentos en el citoplasma. Su aparición se asocia a etapas tardías en el recambio tisular y en los procesos de reparación y curación. Se observaron en muestras de AG inducidas por fenitoína -Dill y Iacopino 1997-.

En otro estudio con microscopía electrónica de muestras de AG, se observaron miofibroblastos en las inducidas por ciclosporina -23.8%- al comparar con las observadas en AG inflamatorio -5.9%-, lo que sugiere una característica morfológica típica de un tejido fibroso proliferativo -Yamasaki y cols.1987a-. También se ha observado una presencia extensa en muestras de encía procedentes de una fibromatosis gingival hereditaria -Bitu y cols.2006-. Aunque se considera que esta morfología miofibroblástica es un fenotipo reversible de un estado celular contráctil por una respuesta metabólica del citoesqueleto a la interacción con las fibras colágenas en la membrana plasmática -Hillmann y cols.1999- ver 1-Anatomía del periodonto-.

Mariani y cols.1996 realizan un estudio ultraestructural de la sustancia fundamental en AG provocado por ciclosporina de pacientes renales transplantados y se muestra que el aumento en volumen depende de la sustancia amorfa como resultado de la liberación de histamina de los mastocitos. Los tejidos presentaban niveles elevados de GAG inducidos supuestamente por ciclosporina al descubrir esta concentración elevada en cultivos de fibroblastos procedentes del AG inducido por ciclosporina.

A nivel del epitelio, se han observado, también con técnicas inmunohistoquímicas, en muestras de AG inducido por ciclosporina procedente también de pacientes transplantados renales, células de Langerhans con ausencia de gránulos de Birbeck en su citoplasma, y dispuestas en el interior de un epitelio hiperqueratósico. Esta característica morfológica podría explicar una inmunodeficiencia que se produce en el AG -Mariani y cols.2004-.

El estudio de Lucas y cols.1985 describe AG inducido por nifedipina y fenitoína de pacientes y observa una semejanza entre ambos caracterizada por un aumento de la proliferación fibroblástica y una ausencia de infiltrado inflamatorio al comparar con muestras de encía sana. La mucosa presentaba un epitelio escamoso por encima de un estroma denso en colágena y una submucosa con inflamación aguda discreta. Los fibroblastos presentaban formas alargadas y estrelladas con retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado con moderado número de mitocondrias, sin lámina basal ni uniones celulares. En zonas del estroma donde no había tanto colágeno se extendía más sustancia fundamental y los fibroblastos presentaban menor retículo endoplásmico con disminución de gránulos secretorios en su citoplasma. No se apreciaban mastocitos en la matriz.

4.6-Clínica, semiología. Diagnóstico y pronóstico del Agrandamiento gingival farmacológico

El dismorfismo del AG presenta una alteración del perfil gingival con unas consecuencias en la salud, en las funciones y con una apariencia estética desagradable. En concreto, el inicio del AGIF se produce en las papilas gingivales interdentales que progresivamente adquieren una forma lobulosa y desarrollándose en sentido vestibulo-lingual y vertical y coalescer con las vecinas. Al crecer coronalmente existe la posibilidad en su proceso de ocultar parcialmente las coronas dentarias; apicalmente no se traspasa la línea mucogingival porque se limita en la encía queratinizada -Wysocki y cols.1983-. En casos de severidad se producirían infecciones gingivales con destrucción de la inserción conectiva al hueso -periodontitis- y caries -Nares y cols.1996-, también por la dificultad en mantener una higiene oral eficaz. No se distingue ninguna característica clínica diferencial entre los distintos AGIF.

Se puede interferir la función oral habitual y causar un retraso y/o erupción ectópica de los dientes, perjuicio en el lenguaje e incomodidad en la masticación -Ciantar 1996-. Puede existir incluso un impacto psicológico en los niños si se produce un cambio importante en la encía -Chabria y cols.2003-.



-figura 4,10: Paciente con transplante hepático sometido a terapia con ciclosporina, Se observa un componente inflamatorio importante, eritematoso en la encía marginal superior, con papilas gingivales voluminosas y flácidas y abundante placa bacteriana en general-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

En AG por inducción de ciclosporina la localización más frecuente es en las papilas de dientes anteriores y en las superficies labiales más que en las linguales -Daley y Wysocki 1984, Tyldesley y Rotter 1984, Van der Wall y cols.1985, Schulz y cols.1990, Wondimu y cols.1993, Thomason y cols.1996b, Nell y cols.1996-figura 4,10-. Somacarrera y cols. 1994a, observaron en pacientes transplantados cardíacos que había AG en las papilas inferiores de dientes anteriores y no había en tramos edéntulos.

Para pacientes en tratamiento con antagonistas del calcio también se observa una preferencia de localización en superficies labiales de papilas de dientes anteriores, sin aparecer en tramos edéntulos -Van der Wall y cols.1985, Miranda 1997-figura 4,11-. En pacientes que recibieron verapamil manifestaron AG de forma más prominente en regiones anteriores y áreas interdientarias asociadas con retención de placa bacteriana -Pernu y cols.1989-.



-figura 4,11: Paciente con terapia de diltiazem de 10 años de evolución a una dosis de 120 mg/12 h. Se observa tumefacción de las papilas inferiores y la superior entre los dientes 1.2 y 1.1-

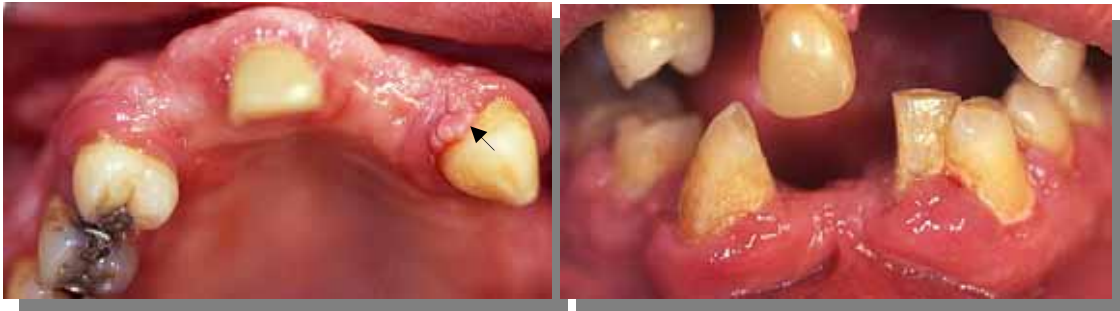
Aunque no acostumbra a aparecer AGIF en pacientes edéntulos, se han descrito algunos casos aislados que presentaban sobrecrecimiento generalizado con la administración de fenitoína -Dreyer y Thomas 1978, Mc Cord y cols.1992-. También con la administración de ciclosporina y nifedipina en un estudio de transplantados renales apareció AG en 1 edéntulo de los 19 que participaron en el estudio -Thomas y cols.2001-. Un paciente transplantado renal, edéntulo, bajo tratamiento con ciclosporina y nicardipina presentó un crecimiento exuberante de la encía con problemas de retención y soporte de su prótesis bucal -Thomason y cols.1994-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Según Thomason y cols.1996b en un estudio realizado en 194 pacientes transplantados según la localización del AG provocado por ciclosporina, se observó una mayor severidad de AG en la región canina, sin diferencias significativas entre superior e inferior. La papila central interincisiva superior estuvo menos afectada que las caninas y similar a las de las zonas premolar y molar -figura 4,12-.

James y cols.2000a confirman que los pacientes sometidos a terapia combinada con amlodipina y ciclosporina presentaban mayor AG en caras linguales de papilas de dientes inferiores al comparar con pacientes que recibían la asociación nifedipina y ciclosporina.

El inicio es a los 3 meses de la administración del fármaco -Seymour y cols.1987-. En Seymour y cols.1994 los pacientes recibían amlodipina -dosis diaria de 5-10 mg- y los cambios gingivales con AG también aparecieron a los tres meses del inicio del tratamiento especialmente en aquéllos con compromiso periodontal -Somacarrera y cols.1994a, James y cols.2000a, O'Hara y cols.2002-.



-A-

-B-

-figura 4,12: paciente sometido a inmunoterapia con ciclosporina por trasplante renal. A: Arcada superior, obsérvese el aspecto mamelonado de la papila mesial del diente 2.3 (flecha). B: Arcada inferior, tumefacción severa de las papilas anteriores-

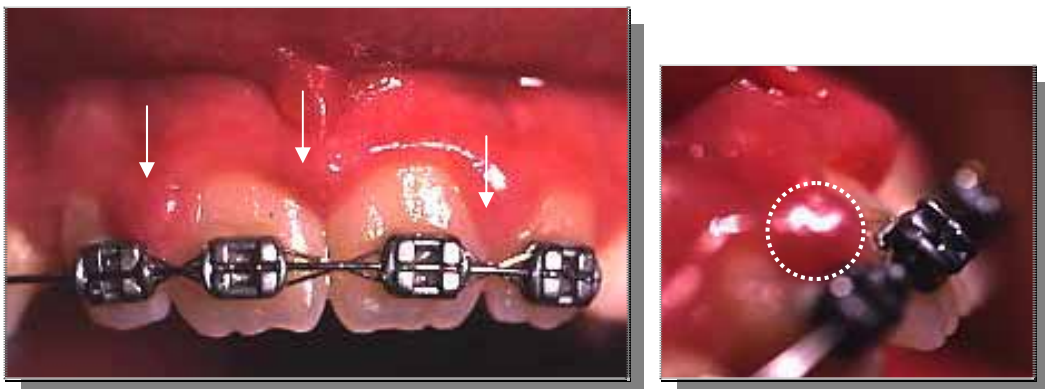
En otros estudios se observa que el desarrollo del AG por ciclosporina en pacientes susceptibles se produce en los primeros 6 meses y no más tarde de tal modo que si la aparición no se produce temprana nunca se producirá posteriormente -Somacarrera y cols.1994b, Montebugnoli y cols.2000-figura 4,12-. En pacientes con terapia de fenitoína, el AG se produce a las 2-3 semanas del inicio del tratamiento en pacientes susceptibles, con máxima severidad a los 9-12 meses. Peñarrocha y cols.1989a refieren el inicio de la sintomatología del AG inducido por fenitoína a los 3 meses con severidad similar ante diferentes tiempos de exposición al fármaco.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

En un estudio con perros *Beagle* sometidos a terapia con ciclosporina, los cambios más tempranos se observaron a las 3 semanas del inicio del tratamiento con un aumento de la papila interdental, llegando a las 6 semanas a ocultar parcialmente los dientes -Seibel y cols.1989b-.

La inflamación asociada se debe al mayor depósito de placa bacteriana en el tejido gingival agrandado, a veces la manifestación clínica en casos de AG por ciclosporina es como una gingivitis marginal, una gingivitis crónica edematosa y/o hiperplásica -Varga y cols.1998-. Los pacientes con terapia de ciclosporina pueden presentar una hiperestesia oral -Nell y cols.1996- con halitosis, posiblemente por el componente inflamatorio con la retención de la placa bacteriana que podría relacionarse con la severidad del AG, y dolor por traumatismo que impide también una correcta higiene -Wysocki y cols.1983, Daley y cols.1986-. En AG inducido por nifedipina puede asociarse dolor gingival con sangrado espontáneo si el grado de afectación es más severo según un estudio aportado por Katz y cols.1992.

En ocasiones la proximidad de algún factor externo puede contribuir como irritante en la gravedad del AG: cálculo, restauraciones defectuosas, aditamentos ortodóncicos -figura 4,13- y prostodóncicos, obturaciones desbordantes en las zonas del col gingival o en la encía marginal -Wysocki y cols.1983, Nell y cols.1996-. La respiración bucal o una incompetencia labial con falta de cubrimiento de los incisivos superiores también facilitaría la prevalencia del AG apareciendo una encía más rojiza y brillante. -Wilson y cols.1998-ver en Epidemiología: 4.3.1.7-Otras variables.



-figura 4,13: Ortodoncia fija en paciente de 12 años que favoreció el sobrecrecimiento gingival por un control de placa irregular. La papila gingival entre los dientes 12 y 11 fue la más afectada-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

El apiñamiento dentario influye en el sobrecrecimiento gingival por su localización más frecuente en los sectores anteroinferiores y porque dificulta el mantenimiento de un buen control de placa. Por el mismo motivo, factores anatómicos y fisiológicos pueden permitir una resistencia al desarrollo del AG o una influencia en su distribución: la acción de la lengua al hablar, al masticar, sobre la encía palatina y lingual, la dilución que provoca la saliva en zonas de concentración local gingival por secuestro de antagonistas del calcio y los frenillos vestibulares interincisivos, que pueden enlentecer o resistir el proceso del AG -Thomason y cols.1996b-.

Se puede producir migración dentaria con diastemas por el crecimiento papilar y alteraciones alveolares en casos de AG por ciclosporina -Fu y cols.1997- y por fenitoína -figuras 4,14, 4,15 y 4,16-. Después del tratamiento quirúrgico -gingivectomía- los dientes se pueden reponicionar espontáneamente en el postoperatorio -Rostock y cols.1986-.



-figura 4,14: Aspecto bucal de mujer con epilepsia sometida a tratamiento con fenitoína y 15 años de evolución a una dosis de 100mg/8h. Dientes sin puntos de contacto, se aprecian unas papilas más contorneadas-

El AG es reversible al substituir el fármaco inductor -Katz y cols.1992-nifedipina-, -Pernu y cols.1989-verapamil- o con la reducción de la dosis. Una disminución de la dosis de fenitoína necesita 4 meses para conseguir una reducción del AG -Little y cols.1975- o después de unos meses del cese de un tratamiento -van der Wall y cols.1985-nifedipina-, Daley y cols.1986-ciclosporina-, Mathur y cols.2003-ciclosporina-.

En estudios con perros *Beagle* se ha comprobado una regresión de las lesiones cutáneas papilomatosas a las 8 semanas de cesar la administración de ciclosporina -Seibel y cols.1989a-. La terapia de ciclosporina en perros cachorros cazadores provocó la aparición de quistes gingivales en la región

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 4,15: Aspecto lingual de la paciente anterior sometida a terapia con fenitoína. Obsérvese el rodete gingival engrosado alrededor de los incisivos-



-figura 4,16: Agrandamiento de la papila gingival en un diastema interdentario entre los dientes canino y bicúspide-

incisiva no erupcionada. Al cesar la terapia de ciclosporina, los quistes regresaron en 1 mes y los dientes quedaron descubiertos de encía. De forma simultánea hubo una pérdida de peso al comparar con perros sin tratamiento -O'Hara y cols.2002-.

En modelo de rata también se observa mayor crecimiento papilar por vestibular y menos severo en el maxilar que en la mandíbula. El máximo desarrollo se produjo a los 40 días desde el inicio de la terapia, y se redujo espontáneamente al dejar el tratamiento -Nishikawa y cols.1996-.

Ocasionalmente, se puede producir una mejoría gradual con la administración del fármaco durante un período largo de tiempo -ciclosporina y transplantados renales -Montebugnoli y cols.1996-. De lo contrario se produce una agravación progresiva de la encía queratinizada hasta los 36 meses cuando ya es difícil la reversibilidad a la regresión completa, en esta situación el tratamiento adecuado es la gingivectomía -Daley y cols.1986, Montebugnoli y cols.2000-.

Son frecuentes las recidivas o recrecimientos del AG: 1 mes después de la intervención quirúrgica a la que se sometieron pacientes bajo tratamiento con verapamil se apreció que la mayoría de ellos presentaban AG -Pernu y cols.1989-. Con respecto a la administración de ciclosporina, también hubo una discreta recidiva de AG en un paciente después de la intervención quirúrgica -Rostock y cols.1986-.

Si se tiene en cuenta la edad, los niños son más susceptibles al AG por ciclosporina que los adultos -Daley y cols.1986, Karpinia y cols.1996, Kilpatrick y cols.1997-- ver 4.3-Epidemiología en 4.3.1.4-Variables demográficas-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

No se ha aportado una implicación de la reactividad de fibroblastos gingivales *responder* en otras localizaciones extraorales conectivas. En un estudio de Montebugnoli y Bernardi 1999 se realizó un seguimiento de 22 pacientes transplantados cardíacos sometidos a un régimen de ciclosporina durante 6 meses. Se registraron parámetros periodontales para AG provocado por ciclosporina, cicatrices residuales después de la toracotomía e hiperproducción de tejido conectivo en la región subclávica, y los resultados no demostraron una correlación entre AG y el tejido cicatricial extraoral; la hiperproducción de colágeno se veía limitada a la cavidad oral.

Se ha observado AG alrededor de implantes de titanio osteointegrados en el maxilar de pacientes con tratamiento de nifedipina -Silverstein y cols.1995-. En otro paciente portador de implantes bajo terapia de fenitoína también presentó sobrecrecimiento de la mucosa marginal -Chee y Jansen 1994-.

El resultado es una conformación gingival alterada en altura y grosor de la encía, hiperémica, con pérdida del festoneado positivo marginal y tendencia al sangrado espontáneo, resilente, textura friable y aspecto mamelonado. Estas características pueden variar en proporción según el grado de inflamación secundaria -figuras 4,17 y 4,18-.



-figura 4,17: Paciente sometido a terapia con ciclosporina por trasplante renal. El crecimiento de la encía queratinizada en anchura y altura oculta parcialmente las coronas dentarias. Obsérvese en A el desarrollo y agrandamiento papilar (círculo blanco). En B las papilas señaladas por las flechas han crecido en volumen-

El diagnóstico se va a establecer por la clínica y la semiología citada que presenta el paciente al comprobar con la anamnesis la patología sistémica controlada con el fármaco causante del AG -figura 4,18-.

Se podrá realizar un diagnóstico diferencial con otros AG de distinta causa -ver 3-El Agrandamiento Gingival en 3.2-Clasificación- y el análisis histopatológico confirmará en sus características estructurales el AG.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

El pronóstico es bueno porque es reversible al suspenderse la administración del medicamento o en ocasiones se puede reducir en gran medida el AG si se acompaña de una técnica correcta de cepillado habitual.

Si no se produce una higiene oral adecuada podría haber una pérdida de inserción conectiva al hueso por una inflamación crónica mantenida en el interior de las pseudobolsas gingivales. En este caso estaría indicada una seriada radiográfica como técnica complementaria al diagnóstico para valorar el nivel óseo y su perfil en relación a los dientes. Una situación de periodontitis empeoraría el pronóstico periodontal, individual y en ocasiones general, de los dientes.



A



B

-figura 4,18: 2 casos de pacientes con AGIF por ciclosporina, A: Arcada inferior. Obsérvese el aspecto agrandado de la encía y especialmente exuberante en B. El diagnóstico se estableció por la anamnesis y la clínica. B:Imagen cedida por Hernández 2006-

4.7-Índices de medida del Agrandamiento gingival

En todos los estudios clínicos y experimentales es necesaria la cuantificación para objetivar lo que se está investigando y permitir la comparación de los datos con otros estudios referentes al mismo tema. De este modo se concreta lo abstracto y se realizan análisis comparativos con capacidad de ser reproducibles para el estudio. A partir de estos datos objetivables se infieren enunciados universales.

En el estudio del Agrandamiento gingival ha existido un exceso de subjetividad debido a la definición de las categorías clínicas con poca concreción en el significado conceptual. Además hay autores que no han utilizado ningún índice de medida o bien el que se ha aplicado no ha sido únicamente cuantitativo.

Las categorías de cada índice permiten indicar un grado de patología del AG para objetivar un nivel de severidad. Los primeros índices reflejan una valoración del AG en sentido vertical y es interesante mencionar el de Robinson -1942-:

Se valoró de 1 a 5 el grado de agrandamiento en sentido creciente de severidad, siendo la categoría 1 de normalidad sin sobrecrecimiento y de 5 el máximo crecimiento gingival, ocultando en diferentes grados las coronas de los dientes.

Harris y Ewalt -1942- modificaron con su aportación el índice anterior, estableciendo 5 categorías con estas características -Miranda 1997-:

- 0 ... No hay signos clínicos de AG
- 1 ... Agrandamiento mínimo, aumenta la densidad de la encía
- 2... Agrandamiento moderado, la papila interdental y la encía marginal están aumentadas
- 3 ...Agrandamiento evidente, el tejido gingival invade las coronas
- 4....Agrandamiento severo, puede haber interferencia en la función

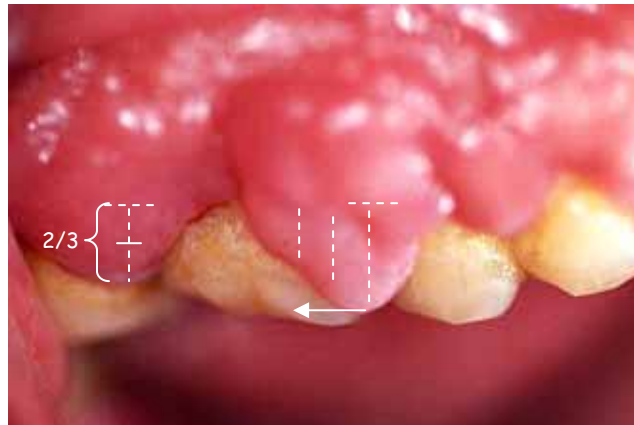
ESTADO DE LA CUESTIÓN

Según Angelopoulos y Goaz 1972 la descripción de su índice de medida para AGIF secundarios a fenitoína, distinguía las siguientes categorías:

- 0... Encía sana
- 1... El tejido gingival cubre $1/3$ de la corona clínica
- 2... El tejido gingival cubre $2/3$ de la corona clínica
- 3... El tejido gingival cubre $>2/3$ de la corona clínica

Posteriormente Addy y cols.1983 también lo modificaron según la gravedad del AG -figura 4,19- en:

- Mínimo: Sin AG o incipiente
- Moderado: AG con incremento de la papila y de la encía marginal
- Severo: AG evidente por cubrimiento del tejido gingival en una parte de la corona clínica



-figura 4,19: Índices de medida aplicados a un Agrandamiento gingival en un paciente sometido a tratamiento inmunosupresor. Según Harris y Ewalt se trataría de un AG de categoría 3-4. A la izquierda de la imagen la papila muestra un índice de grado 2 según Angelopoulos y Goaz; a la derecha la papila contigua presentaría un grado 3 en ocupación coronal según el índice de Seymour. Las categorías cualitativas de Addy permiten una descripción de severidad en este caso.-

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Seymour y cols.1985 ya consideran también el componente horizontal. Su descripción incluye las localizaciones más frecuentes -figuras 4,19 y 4,20-:

- región anterior de las 2 arcadas, superior e inferior, entre los caninos. Si faltara uno de estos dientes, se substituiría por el premolar.
- se consideran 5 unidades gingivales bucales y linguales o palatales.

Para el componente horizontal se distinguen para cada unidad gingival las categorías:

valor 0.....Anchura normal del margen gingival libre
" 1..... Grosor gingival desde la normalidad hasta 2 mm
" 2.....Grosor > 2 mm

Observación desde una visión incisal.

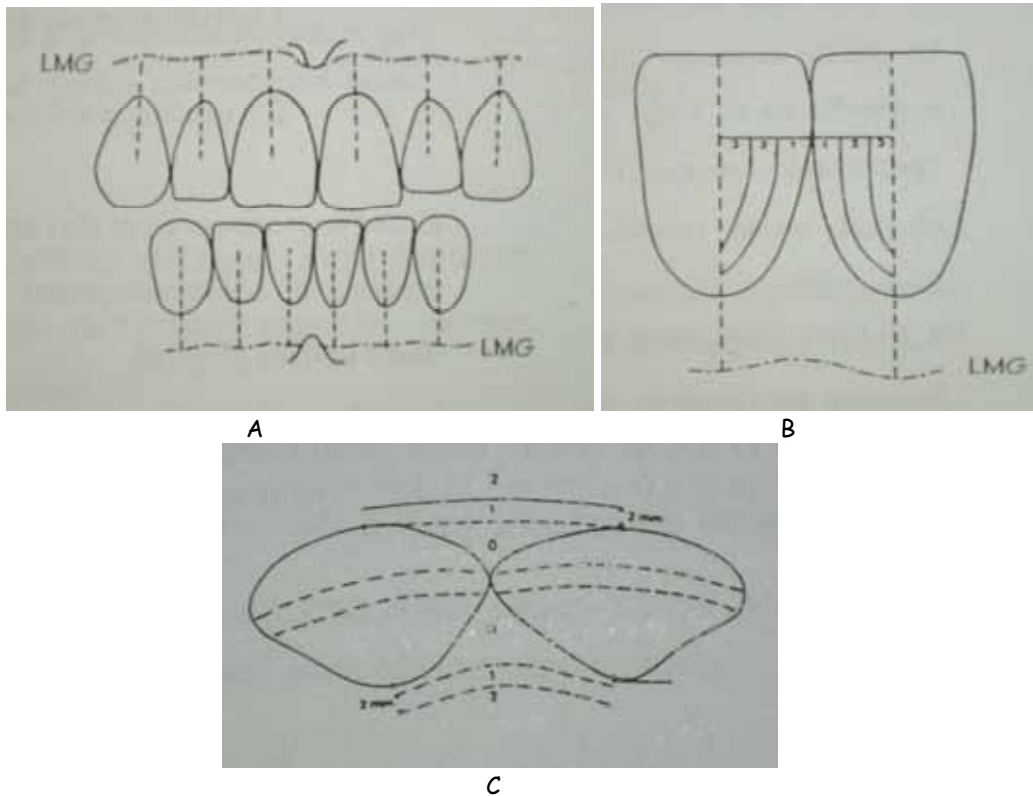
El componente vertical incluiría el crecimiento de la unidad gingival en sentido coronal y la invasión mesio-distal a las coronas vecinas:

El margen de valoración transcurre de 0 a 3 que indica severidad en sentido ascendente con respecto al acercamiento al borde incisal del diente y grado de ocultamiento de la corona lateralmente hacia su línea media de forma simultánea.

0.....No hay AG
1.....AG ligero. La encía marginal crece de forma incipiente
2... AG moderado. Ocupación como máximo de la mitad de la longitud de la corona
3.....AG severo. Ocupación de más de la mitad de la longitud de la corona

Observación desde una visión bucal o lingual.

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 4,20: Características del índice de Seymour: A- Se distinguen 5 unidades gingivales en el sector anterior para cada arcada en visión bucal y en lingual/palatina. B- Desplazamiento horizontal-lateral del AG en su severidad. C- Desplazamiento horizontal-sagital del AG en su severidad. LMG: Línea mucogingival. Cedido por Miranda 1997-

Si hay discrepancia en la invasión de las coronas vecinas se obtiene una asimetría en el crecimiento y en este caso se registrará la de valor más alto -más severa-.

Para cada unidad gingival se suma el valor obtenido para el grosor -componente horizontal- con el valor del componente vertical por lo que el valor máximo sería de 5 y se examinan un total de 20 unidades gingivales correspondientes al sector anterior superior-inferior, bucal-lingual.

Es uno de los índices que más se ha utilizado en estudios de investigación del AG inducido por fármacos por su capacidad de registrar el sobrecrecimiento en 3 dimensiones.

Dahlöf y Modéer en 1986/87 aplicaron un índice de AG en cuanto al grosor de la encía marginal en sentido buco-lingual, en la región de los incisivos y de los molares de ambas arcadas. Se tomaban unas medidas con un material de impresión para estudiar los modelos positivos en yeso. Se registraba la

ESTADO DE LA CUESTIÓN

medida horizontal desde la pared vestibular hasta el punto más prominente de la encía marginal y como medida vertical, en clínica, de las profundidades de sondaje superiores a 4 mm.

Barak y cols.1987 crearon un índice histológico basado en la medida del epitelio según su estudio al microscopio óptico:

- 1...**encía normal**, ancho del epitelio: 0,30-0,50 mm
- 2...**AG ligero**, ancho del epitelio: 0,50-1,50 mm
- 3...**AG moderado**, ancho del epitelio: 1,50-3,00 mm
- 4...**AG severo**, ancho del epitelio: 3,00-4,00 mm

Otros autores consideran unas categorías de **AG** más subjetivas, como las que establece el índice de Grant y cols.1988 -Miranda 1997-:

- Inexistente**.....No hay cambios
- Ligero**.....Encía firme, punteada y agrandada ligeramente en su base
- Moderado**.... **AG** con un tejido que cubre menos de la mitad de la corona de los dientes anteriores
- Severo**.....Cubrimiento de más de la mitad de la corona de los dientes anteriores

En 1992 Miller y Damm modificaron el índice de Angelopoulos y Goaz con la incorporación de la medida en mm del recubrimiento gingival por tercios coronarios:

- 0... Encía sana
- 1... El tejido gingival cubre $\leq 1/3$ de la corona clínica, leve, <2mm
- 2... El tejido gingival cubre $2/3$ de la corona clínica, moderado, 2-4mm
- 3... El tejido gingival cubre $>2/3$ de la corona clínica, severo, >4mm

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Miranda y cols.2001 describieron un índice de agrandamiento gingival -nódulo-papilar MB- derivado del descrito por Seymour en el que se registra el componente horizontal en sentido bucal-palatino/lingual sin la consideración del componente vertical -figura 4,20 C-. Se trata de un índice clínico de la papila interdental ya que es la zona gingival que se afecta primero -figura 4,21-:

- 0...Grosor de la papila interdental <1mm
- 1...Grosor de la papila interdental 1-2mm
- 2... Grosor de la papila interdental >2mm



-figura 4,21: Agrandamiento gingival en arcada inferior en un paciente sometido a tratamiento inmunosupresor. Obsérvese el componente horizontal en extensión buco-lingual en la zona de premolares izquierdos donde se podría considerar un índice MB de 2-

4.8-Prevención y tratamiento del Agrandamiento gingival farmacológico

Las opciones terapéuticas del AGIF tendrían una primera fase *de prevención*. Se ha comprobado que el factor que potencia la aparición, desarrollo y severidad del AG es la acumulación de la placa oral bacteriana y la inflamación gingival que provoca, por consiguiente una instrucción en la técnica de higiene oral sería prioritaria para disminuir este sobrecrecimiento especialmente cuando no es posible la sustitución del fármaco prescrito o la reducción de la dosis. Según la eficacia obtenida se realizará un tratamiento de mantenimiento con soporte farmacológico o terapia resectiva.

4.8.1-Prevención del AGIF.

El objetivo está en evitar la aparición clínica del AG mediante la aplicación de una técnica en higiene oral, un estudio del paciente y una preparación bucal. Estas medidas pretenden

1. eliminar la placa oral bacteriana
2. realizar la operatoria dental que conduzca a eliminar cualquier lesión e irritación físicas de la encía marginal por iatrogenia en tratamientos dentales anteriores, o por influencia del paciente en la cavidad oral: abandono de la higiene oral y otros hábitos.

1. La eliminación del depósito blando bacteriano con el cepillado consigue la disminución del componente inflamatorio del AG y se puede conseguir la reducción de los requerimientos de tratamiento quirúrgico al finalizar la fase higiénica por una desinflamación importante -Kantarci y cols.1999-.

La prevención de la inflamación en el desarrollo del AGIF se pone de manifiesto por el momento en que las medidas de control de placa bacteriana se aplican en relación con la administración del fármaco y por la intensidad de esas medidas según un estudio longitudinal de niños epilépticos no hospitalizados y sometidos a terapia con fenitoína. Cuanto más temprana y más eficaz era la aplicación de la higiene bucal, menor era el grado de AGIF: de los tres grupos con diferente grado de prevención, el sometido a un programa intensivo no presentó AG a diferencia de los otros

programas que mostraron un 40% de prevalencia en AG -Modéer y Dahllöf 1987-.

Hay estudios que reducen la prevalencia del AG inducido por nifedipina después de unas sesiones de higiene oral -Barclay y cols.1992, Ciantar 1996-. Somacarrera y cols.1997 comprobaron la eficacia del tratamiento periodontal por la reducción de la severidad de AG provocado por ciclosporina y la gingivitis asociada en un grupo de 80 pacientes transplantados de corazón, hígado y riñón. A los 6 meses los pacientes que desarrollaron mayor severidad del AG fueron los que no se sometieron a esta terapia periodontal. En otro trabajo de investigación con terapéutica combinada de ciclosporina y nifedipina también se comprobó una reducción del AG con el control de la inflamación -King y cols.1993-. Se estudió un grupo de adultos sometidos a un transplante de corazón y se hizo su seguimiento durante un período de 36 meses y se clasificaron en *responders* y *non responders* según su respuesta gingival al inmunosupresor. A los 6 meses del transplante se realizó un programa de control de higiene oral. En el primer grupo se produjo una mayor reducción del AG con disminución del índice de placa y gingival en ambos -Kilpatrick y cols.1997, Montebugnoli y cols.2000-.

El control del depósito de la placa bacteriana lo realizará el paciente en su domicilio como un hábito después de una enseñanza en la técnica de la higiene oral por el higienista. Esta instrucción requiere una motivación del paciente con información básica de la enfermedad periodontal. De este modo y con refuerzo de esta conducta se consigue una adhesión al hábito y a un programa de mantenimiento profesional pautado e indefinido en la consulta.

La técnica en higiene oral es un protocolo minucioso de cepillado de las superficies gingivales y dentarias mediante diferentes aditamentos (seda dental y cepillos, convencionales o eléctricos) e individualizado a las características morfológicas que presentan, con el fin de eliminar los depósitos blandos y desinflamar la mucosa y las encías. Con el cepillado se utilizan productos químicos -detergentes, espumantes, agentes activos- incluidos en los dentífricos y colutorios -ADA 2003-tabla XVIII-.

Los colutorios actúan como un complemento de terapia preventiva química y de aplicación tópica cuyos efectos son siempre supragingivales. Esta presentación del agente activo es eficaz en la contención y reducción de la

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Componentes	Acción
abrasivos: carbonato, óxidos aluminio, fosfatos, silicatos	eliminación restos alimentarios blanqueamiento
fluor	prevención caries
nitrato potásico cloruro estroncio citrato sódico	reducción sensibilidad
peróxidos	blanqueamiento
pirofosfatos, citrato cinc	anti cálculo
clorhexidina, triclosán	reducción inflamación anti placa
aromatizantes	sabor, efecto cosmético
espesantes: coloides, gomas, celulosas	estabilizante de formulación
detergentes: lauril sulfato sódico	espumantes, aumentan solubilidad de placa
humectantes: glicerol, sorbitol, propilenglicol	mantienen agua

-Tabla XVIII: Componentes de los dentífricos y colutorios-

inflamación en pacientes con dificultad en el control mecánico de la placa y especialmente si reciben tratamiento con fenitoína por afectación neurológica. La clorhexidina (CHX) es capaz de reducir los índices de placa y gingival -Shibly y cols.1994-.

El higienista eliminará el cálculo y las toxinas acumulados en las superficies y en las zonas de difícil acceso mediante un raspado radicular en los dientes y en sus furcaciones, con pulido y alisado. En las coronas dentarias también procederá al pulido con eliminación de las tinciones provocadas por productos de la ingesta o hábitos tóxicos.

Las medidas preventivas evitarán la aparición del componente inflamatorio del AG o bien se estabilizará el proceso patológico si ya se ha instaurado, sin aumentar la severidad. Este tratamiento preventivo y conservador disminuiría en algunos casos los requerimientos de la terapia resectiva -Kantarci y cols.1999-.

4.8.2-Tratamiento farmacológico.

Aunque un control con instrucciones de higiene oral y técnicas de eliminación de los depósitos blandos disminuiría la severidad y la prevalencia del AG, no evitaría la aparición o el establecimiento del AG inducido por los fármacos -Dahlloff y Modèer 1986, Seymour y Smith 1991, Daly 1992-. Se consideran las características del fármaco con el médico especialista para estudiar la posibilidad de reducir la dosis o substituir el fármaco inductor por otro con la misma indicación terapéutica y con el menor efecto indeseable -Pernu y cols.1989, Katz y cols.1992, Seymour y cols.1993-. La substitución farmacológica persigue la disminución del componente fibrótico del AG.

La retirada del tratamiento con fenitoína en niños epilépticos provocó una reducción significativa del AG en el plazo de 1 mes -Dahlloff y cols.1991-. Aunque también una reducción de la dosis también se ha visto beneficiosa para el control del AG. Un substituto anticomicial sería la carbamazepina o el valproato aunque su eficacia habría que valorarla en casos individualizados.

Una disminución de la dosis de ciclosporina puede reducir el AG de forma significativa, o incluso su retirada terapéutica permitiría la resolución entre 1 y 18 meses -Daley y Wysocki 1984, Daley y cols.1986, Mathur y cols.2003-, incluso con la substitución por tacrolimus -James y cols.2000b, Hernández y cols.2000-.

En un estudio preliminar con 4 pacientes transplantados -entre 2 y 7 años- y que ya habían desarrollado AG, la substitución de ciclosporina por tacrolimus evitó el tratamiento quirúrgico del AG y hubo una reducción del AG desde los 4 meses del cambio -Hernández y cols.2003-. Una población de niños transplantados hepáticos que habían recibido tacrolimus no presentaron AG frente al grupo de ciclosporina que tuvo un 35-63% de prevalencia -McKaig y cols.2002-. También la substitución por otro inmunosupresor favoreció la reversibilidad del AG inducido por ciclosporina -Somacarrera y Lucas 1996-.

Se ha comprobado una mejoría en el AG después de la administración de diversos antibióticos: azitromicina, metronidazol, claritromicina. Wong y cols.1994 aportaron la resolución de AG inducido por ciclosporina en 4 casos de pacientes transplantados renales con la administración de metronidazol. Wahlström y cols.1995 observaron una reducción de AG provocado por ciclosporina con la administración de azitromicina. Un estudio de Chand y cols.2004 con 25 pacientes bajo tratamiento con ciclosporina a doble ciego,

randomizado, mostró que azitromicina era más eficaz que metronidazol para el manejo terapéutico del AG. Los mecanismos de acción de los quimioterápicos se pueden atribuir a su acción antibacteriana. Aunque también, la presencia intracelular de azitromicina en los fibroblastos y células fagocíticas, permitiría una interacción con factores de crecimiento y mediadores de la inflamación -Winsberger y Pfragner 1999-.

En un estudio realizado *in vivo-in vitro* con fibroblastos gingivales de ratas sometidos a la acción de ciclosporina y con AG clínico, se observó que la administración de azitromicina compensaba el AG por incremento de la actividad fagocítica de los fibroblastos -Paik y cols.2004-.

También se ha descrito la regresión de AG por fenitoína con la administración de un derivado de ácido retinoico a una dosis de 35 mg/día que recibía una mujer para el tratamiento del acné refractario. La isotretinoína inhibe la colagenasa pero también el colágeno y la proliferación de fibroblastos -Norris y Cunliffe 1987-.

Se ha puesto en evidencia que en el tratamiento crónico con fenitoína se produce además una deficiencia de ácido fólico especialmente si se asocia en politerapia anticomicial -Bermejo y cols.1985-. Podría haber un mecanismo de interacción competitiva entre fenitoína y ácido fólico o una inducción de fenitoína en el metabolismo hepático del ácido fólico. Olesen y Jensen en 1970 comprobaron que suplementos de folatos inhibían la formación del metabolito más importante de fenitoína causante del AG en animales. Según múltiples estudios, el ácido fólico participa en procesos de proliferación celular por ser esencial en el recambio tisular especialmente donde es más rápido -formación de hematíes, crecimiento y equilibrio dinámico en la adherencia epitelial del periodonto y en general en procesos de crecimiento y maduración celular-. Su déficit en la encía de pacientes con AG por fenitoína podría existir aunque los niveles plasmáticos estuvieran normales. En el estudio de Addy y cols.1983 tampoco se observó una relación entre los niveles séricos de folatos y el grado de AG.

El efecto terapéutico del ácido fólico en el AG por fenitoína se ha seguido investigando:

En un estudio realizado con 23 niños bajo tratamiento con fenitoína durante 1 año se distribuyeron de forma randomizada a un grupo con suplemento de ácido fólico -5 mg/día- y a otro sin suplemento. Los niveles séricos de fenitoína estuvieron muy bajos, aunque los pacientes no tuvieron ningún episodio de crisis, y no se observaron diferencias significativas en AG por fenitoína entre los dos grupos. Al estudiar en otra muestra de 9 adultos con retraso mental severo y con terapia de fenitoína se obtuvieron niveles plasmáticos altos de este fármaco y sí se vio una reducción significativa del AG en el grupo sometido a los suplementos de folatos -Backman y cols.1989-. Su eficacia también fue evidente en aplicación tópica en solución, al comprobar una reducción significativa del AG a los 6 meses en una población de pacientes con tratamiento de fenitoína. El grupo que recibió ácido fólico en cápsulas -sistémico- también experimentó un decrecimiento pero sin diferencias apreciables, mientras el grupo con placebo sufrió un aumento de la severidad del AG en el mismo período de tiempo -Drew y Vogel 1986-. Según este estudio la terapia local de ácido fólico sería más eficaz que con la administración sistémica. Aunque el efecto del folato sistémico fue favorable en la prevención del AG, al comprobar en un grupo de 60 niños sometidos a tratamiento con fenitoína que los que recibían instrucciones de higiene oral y 5 mg/día de ácido fólico presentaban al año menor incidencia y severidad de AG que los niños que sólo recibían medidas de higiene oral -Prasad y cols.2004-.

En un estudio de Brown y cols.1991b realizado con 20 adultos epilépticos discapacitados en régimen hospitalario, a doble ciego, se asignaron de forma randomizada a 2 grupos: uno sometido a 3 mg/día de ácido fólico y el otro a placebo de lactosa, se registraron los índices de AG, de placa y de salud gingival y a las 16 semanas no se observó ningún efecto de reducción del AG en ninguno de los 2 grupos, a pesar de que el experimental presentaba niveles de folatos séricos elevados, lo que indica que es insuficiente la administración única de ácido fólico para el tratamiento del AG por fenitoína.

Su acción localizada consistiría en una reducción de la inflamación gingival comprobada también en otros estudios -Vogel y cols.1976, 1978-. Podría ser que el ácido fólico consiguiera una adherencia epitelial con un efecto sellador de defensa a la invasión externa de microorganismos evitando así una respuesta inflamatoria que se acompañaría en la acción directa gingival de fenitoína. En poblaciones pediátricas es mejor tolerada la presentación en solución al comparar con la presentación en cápsulas.

En un estudio *in vitro* de Dogan y cols.2001 los fibroblastos sometidos a fenitoína disminuían los niveles de IL1 β cuando se incorporaba al medio de cultivo ácido fólico, incluso cuando los niveles de IL1 β estaban aumentados por la inducción de TNFa. Esta acción podría interpretarse *in vivo* como una reducción del tejido gingival cuando está presente ácido fólico en gingivitis de diferente grado de afectación consecuencia de la administración crónica de fenitoína. El ácido fólico también ayuda a disminuir la recurrencia del AG por fenitoína después de una gingivectomía al observar en un estudio una diferencia significativa entre el grupo sometido a aplicaciones de folatos al comparar con un grupo de pacientes control después del tratamiento quirúrgico de AG -Popell y cols.1991-.

Como tratamiento complementario a la instrumentación higiénica en casos de periodontitis, se podrían emplear las fibras de tetraciclina o compuestos derivados de la matriz del esmalte en la bolsa periodontal. Es una terapia local que en el primer caso permite unos niveles quimioterápicos elevados de liberación sostenida con eliminación de productos bacterianos residuales y una mejoría en la calidad de la inserción conectiva. A los diez días se retira la fibra y se observan los parámetros clínicos. Las moléculas de la matriz embriogénica del esmalte permiten una recuperación de los defectos óseos de la periodontitis por regeneración en la base de los cráteres después del desbridamiento en la cirugía de acceso. Se aportan casos de pacientes con AG inducido por nifedipina tratados con fibras de tetraciclina al final de la fase higiénica realizada con anestesia local en 2 sesiones. En estos pacientes no se recomendó gingivectomía -Sakellari y cols.2005-.

4.8.3-Intervención quirúrgica del Agrandamiento gingival.

A menudo se requiere el tratamiento quirúrgico porque el AG se ha estabilizado en su componente fibrótico y se mantiene cronificado como un tejido exuberante sin perfil de adaptación a los márgenes de las coronas - Wysocki 1983, Seymour y cols.1993-. La técnica es básica y sigue los principios quirúrgicos elementales sin diferir según los tipos distintos de AG. En principio, se considera indicada cuando ya se ha realizado la desinflamación del tejido blando, hay un buen control de placa bacteriana que realiza el paciente en casa y se mantiene un AG clínico del 30% -Seymour y cols.1985-.

El objetivo es recontornear el tejido gingival eliminando el exceso - gingivectomía- para permitir un control de placa más eficaz y la

prevención de la pérdida en la inserción dentaria y/o de infecciones periodontales. Aparte de la desinflamación gingival conseguida con un refuerzo en la motivación y en las medidas de higiene oral, la cirugía es el recurso final de la terapéutica: permite recuperar la estética en la relación diente-encía con la eliminación de las pseudobolsas del sobrecrecimiento gingival y la prevención de los desplazamientos dentarios -diastemas, inclinaciones, extrusiones- por el exceso de tejido blando y se consigue recuperar otras funciones alteradas como son el lenguaje y la masticación. Aunque la administración crónica del fármaco y la falta de colaboración del paciente en las visitas de mantenimiento puede permitir la recidiva del AG aunque se haya realizado la cirugía de resección. Algún autor cifra la recidiva muy alta, alrededor del 50% -Plemons y cols.1996-.

En pacientes jóvenes en los que el sobrecrecimiento es severo, una cirugía temprana puede estar indicada para mejorar la función oral, optimizar el desarrollo dental y evitar los potenciales problemas psicológicos asociados al sobrecrecimiento -Chabria y cols.2003-. Aunque puede haber recidiva del AG si sigue la administración tratamiento farmacológico sistémico, la cirugía de resección puede retrasar las complicaciones del AG a medio y largo plazo - Rostock y cols.1986, Wilson y cols.1998-.

La gingivectomía permite la eliminación del tejido gingival en exceso hasta las fibras conectivas supracrestales. La incisión se realiza con el bisturí contra el hueso y bisel externo y deja una superficie de corte cruenta que cura por segunda intención. Al no desperiostizar no se realiza sutura. Su indicación se generaliza a cualquier tipo de sobrecrecimiento gingival una vez se han aplicado las prácticas preventivas y terapias conservadoras, aunque también hay otras indicaciones distintas al AG:

- erupción pasiva alterada del diente,
- alargamiento coronario por motivos prostodóncicos o estéticos

La condición de esta técnica está en disponer de suficiente banda de encía queratinizada adherida de tal manera que con la exéresis del tejido todavía quede un remanente mínimo. Esta premisa obligada deduce las contraindicaciones:

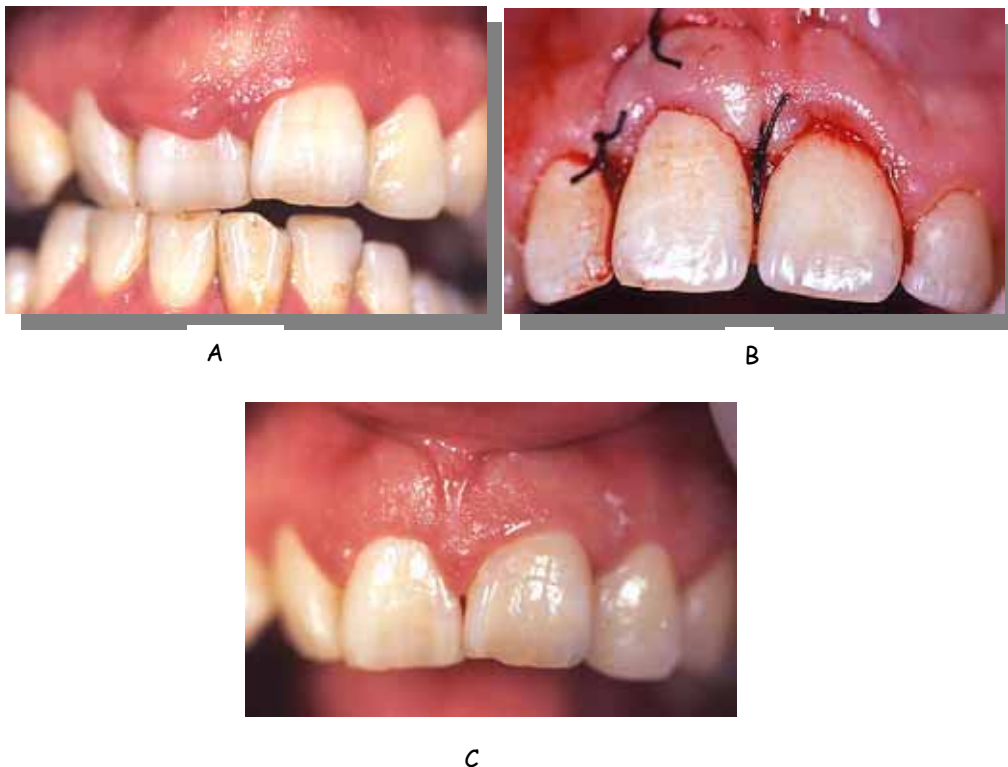
ESTADO DE LA CUESTIÓN

- sondaje periodontal hasta la altura de la línea mucogingival.
- defectos infraóseos que requieran acceso al hueso para desbridamiento y remodelado de su perfil.
- zonas de escasa encía queratinizada adherida.

Las contraindicaciones relativas están en el ámbito de la estética y de la función:

- Si con la gingivectomía se va a producir un compromiso estético por afectarse una zona anterior con coronas clínicas más largas.
- Si con esta técnica puede producirse un cambio en la fonación que puede ser importante en pacientes que profesionalmente dependen de la voz.

Si hay una migración apical de la inserción dentaria con la presencia de un epitelio largo de unión, la técnica quirúrgica indicada es una cirugía de colgajo a bisel interno con resección gingival del tejido agrandado, desbridamiento en la zona de la inserción con eliminación del tejido de



-figura 4,22: A-se observa AG localizado en el incisivo. B-se realizó gingivectomía a bisel interno con levantamiento de colgajo y resección del tejido exuberante. Sutura simple. C-pasadas unas semanas con restitución del nivel y aspecto clínico de la encía-

granulación y posible cirugía ósea -ostectomía, osteoplastia- del hueso de soporte.

Si es preciso según el grado de migración de la inserción y la disponibilidad de encía queratinizada, la reposición del colgajo se realizará también más apical para completar la escisión gingival. La sutura que se realiza en la recolocación del colgajo puede ser interrumpida simple o bien continua. La ventaja de esta cirugía a bisel interno está en una curación sin superficie cruenta por 1ª intención con un postoperatorio más tolerable -figura 4,22-.

Después del periodo de cicatrización en la zona intervenida se puede optar por una gingivoplastia que consiste en afinar el aspecto de la encía en su textura, grosor y adaptación, en cualquier tipo de gingivectomía, mediante el bisturí o una fresa diamantada montada en turbina.

Como alternativa al bisturí frío convencional se utiliza el electro-bisturí con la ventaja de presentar un mejor control del sangrado y pocas molestias postoperatorias. Se utiliza una corriente rectificada con función de corte y coagulación -Walker y cols.1980-. Los inconvenientes están en que se puede reabsorber hueso si se trabaja cerca de la cresta por el calor que se genera, aparte del mal olor que se desprende durante su utilización. Los pacientes con marcapasos tienen el riesgo de presentar incompatibilidad con el equipo de electro-cirugía.

Otras secuelas quirúrgicas en los procedimientos profundos próximos al hueso: -recesión gingival por pérdida de soporte periodontal generada por calor, furcaciones expuestas, movilidads dentarias y necrosis con secuestros óseos -Walker y cols.1980 -figura 4,23-.

Se han aportado técnicas de LASER⁶ por sus ventajas al comparar con las convencionales: disminución del sangrado y del trauma operatorio, sin necesidad de suturas, rápida curación, reducción del riesgo de infección y menor tiempo quirúrgico y postoperatorio -Bader 2000-.

Los láseres que están indicados son los de alta potencia ya que por su efecto térmico concentran mucha energía en un punto muy localizado para la capacidad de corte, de coagulación y de vaporización. Para el tratamiento del AG se distinguen por su eficacia en la exéresis en orden de importancia:

⁶ LASER: Light Amplification Stimulated Emission Radiation

ESTADO DE LA CUESTIÓN



-figura 4,23: Aspecto de cicatrización por segunda intención después de la cirugía con bisturí eléctrico en un paciente bajo tratamiento inmunosupresor.-

- CO₂
- Er, Cr: YSGG
- Er: YAG
- Diodo

Al incidir el laser de CO₂ en el tejido exuberante el rayo es absorbido por el agua de la encía agrandada que se evapora. Este proceso de vaporización conlleva una desecación y desnaturalización de las proteínas celulares con resultado de corte. Su principal aplicación está en el tratamiento de las lesiones de los tejidos blandos con unas claras ventajas -Miranda 1997-:

-Tiempo quirúrgico corto con buena visibilidad por su efecto hemostático en vasos de diámetro <0,5mm durante la intervención y en el postoperatorio.

-Esterilización inmediata que reduce la posibilidad de infección.

-Postoperatorio con dolor de menor intensidad e inflamación ligera al comparar con la cirugía convencional.

-Curación rápida con proceso de cicatrización discreto debido a un trauma quirúrgico mínimo. A las 3 semanas ya se observa una curación completa. Al parecer habría una mayor secreción de colágeno tipo III y fibronectina con previa reacción vásculo-exudativa retardada -Miranda 1997-.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

No obstante es una técnica de elevado coste y se requiere un buen adiestramiento en su utilización por el cirujano ya que la manipulación se realiza sin contacto directo con el tejido. También es preciso el uso de lentes protectoras y la necesidad de cubrir la superficie radicular del tejido que será escindido.

**C-HIPÓTESIS DE TRABAJO
Y OBJETIVOS**

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La revisión de la literatura científica ha evidenciado en estudios clínicos y en estudios *in vitro* que los fibroblastos gingivales son sensibles a los fármacos inductores de Agrandamiento gingival.

La acción farmacológica tisular provoca un patrón histopatológico característico aunque no patognomónico y similar para todos los fármacos inductores estudiados -fenitoína, nifedipina y ciclosporina A-.

En su acción celular estas sustancias químicas inductoras pueden producir un aumento en el crecimiento fibroblástico -hiperplasia- que explica el agrandamiento clínico, única acción patogénica según las primeras aportaciones de estudios sobre el Agrandamiento gingival farmacológico. -

HIPÓTESIS NULA:

Los fármacos inductores del AG provocan una hiperplasia gingival secundaria a la proliferación celular de fibroblastos.

La hipótesis que se establece para el desarrollo del trabajo experimental, está en demostrar una patogenia de AG multifactorial presentada en distintos estudios y vinculada a una alteración de la matriz extracelular por aumento de los glicosaminoglicanos y/o de las fibras colágenas con una afectación de la población celular indeterminada

HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

Los fármacos inductores del AG no provocan una hiperplasia gingival secundaria a la proliferación celular de fibroblastos.

OBJETIVOS

1. Determinar si cultivos de fibroblastos de encía humana son sensibles a la acción de fármacos inductores de Agrandamiento gingival.
2. Observar el efecto de estos fármacos en cultivos primarios de fibroblastos procedentes de las muestras examinadas -estudio de la viabilidad celular-.
3. Cuantificar si hay efecto farmacológico en la transcripción génica del Factor de Crecimiento Transformador β (TGF β), del colágeno y de la colagenasa.
4. Observar si hay efecto farmacológico en la síntesis del colágeno y del TGF β .

D-DISEÑO DEL ESTUDIO

DISEÑO DEL ESTUDIO

El interés del estudio está en observar en el laboratorio por procedimiento experimental las acciones de los fármacos inductores en fibroblastos procedentes de muestras de encía humana.

Los fibroblastos se cultivan para su crecimiento y a partir de un número suficiente se distribuyen por placas y se observa la influencia de la inducción farmacológica sobre su proliferación celular -Viabilidad Celular- para descartar una acción de hiperplasia celular.

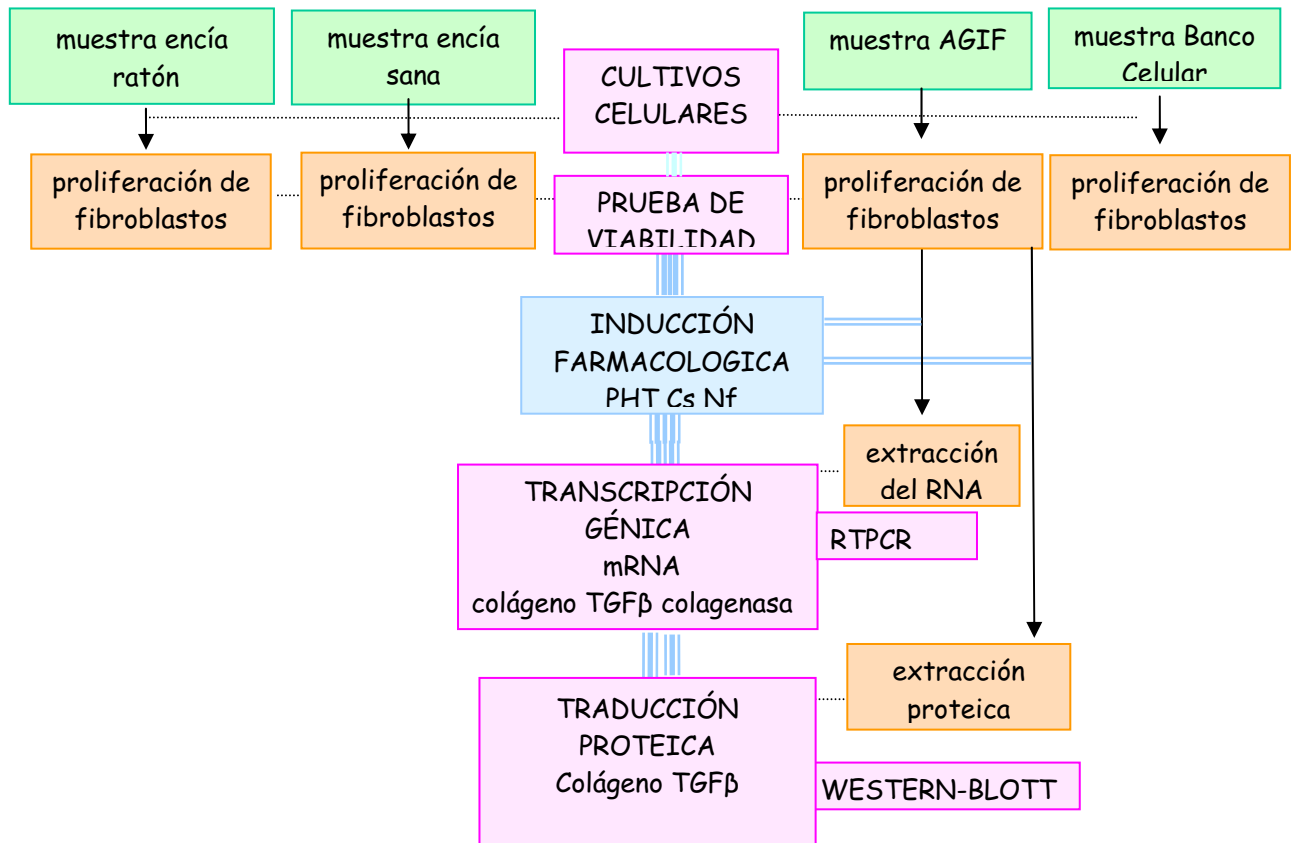
Después se practica el estudio del TGF β , colágeno y colagenasa en su expresión del mRNA -Transcripción génica- y en su traducción proteica bajo la inducción farmacológica, para comprobar si se produce alguna acción en la matriz extracelular que justifique el Agrandamiento gingival -figura 1-.

1-Transcripción génica, expresión del mRNA

Este proceso bioquímico es una copia de la información genética contenida en la secuencia de bases nitrogenadas del DNA que se transcribe en las bases correspondientes del RNA. Lo que implica una síntesis de RNA con ribonucleósidos trifosfato en una secuencia que marca el DNA y que actúa de molde. La diferencia que tiene este proceso con el de la replicación es que consiste en una copia parcial, selectiva y reiterativa del DNA -tan solo una de las 2 cadenas, diversas ocasiones y sintetizando RNA-. De este modo es un primer paso de concesión de información genética para la identidad celular concretada en un fenotipo. En comparación, la replicación se produce una sola vez antes de la división celular y se copia toda la información genética del DNA en otro DNA -es una duplicación de la molécula- -Peñafiel y cols.1995a-.

Este proceso de transcripción es regulado por factores de transcripción proteicos que cooperan con las RNA-polimerasas o interaccionan con secuencias determinadas del DNA -secuencias codificadoras o exones, separadas por intrones que son secuencias no codificadoras-, pero también hay inhibidores de este proceso, con diferente grado de especificidad que interfieren el proceso de síntesis desde el molde previo de DNA.

DISEÑO DEL ESTUDIO

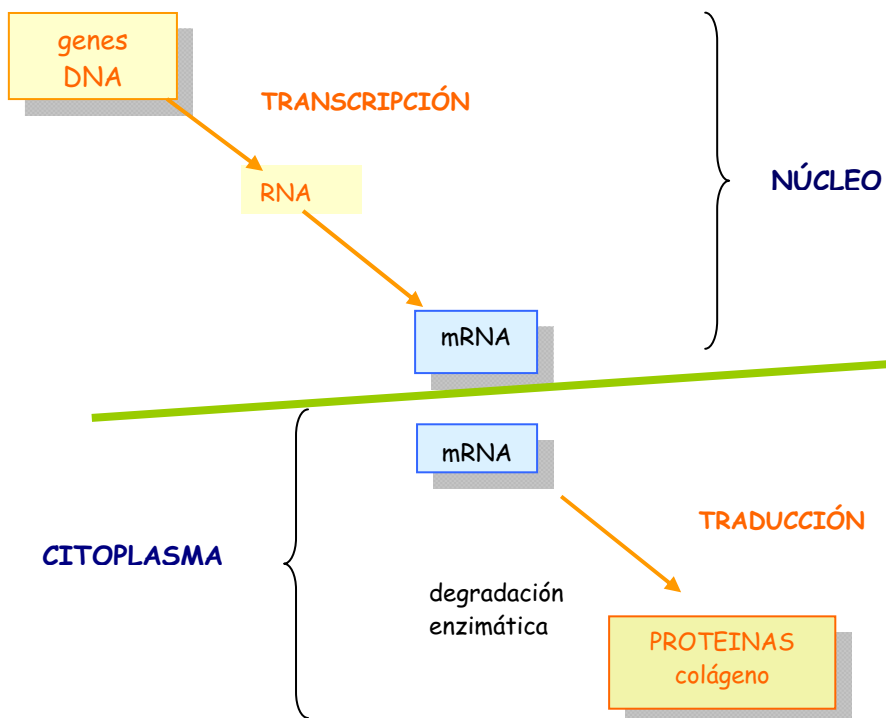


-figura 1: Esquema del diseño del estudio experimental PHT: Fenitoína, Nf: Nifedipina, Cs: Ciclosporina, AGIF: Agrandamiento gingival inducido por fármaco-

En cuanto se produce la síntesis del RNA en el núcleo celular, se necesitan unas reacciones bioquímicas para que sea funcional y que se catalogan como procesos postranscripcionales, ya en los ribosomas del citosol, que recortan, modifican y añaden secuencias estructurales a la molécula de RNA. Una de las funciones es eliminar las secuencias intrones que se transcriben pero no aparecen en el mRNA funcional -figura 2-.

2-Traducción proteica, expresión de la proteína

Este concepto se refiere a la síntesis de proteínas, fase final de la expresión genética, a partir del mRNA funcional o maduro obtenido en el proceso de transcripción y se produce en el citoplasma. Las bases nitrogenadas se combinan en grupos de tres para formar unidades de codificación y determinar la aparición de un aminoácido determinado. El código genético es la relación de identificación de los aminoácidos de la cadena polipeptídica con secuencias de bases nitrogenadas del DNA leídas en forma de tripletes en una dirección precisa. En esta expresión de aminoácidos intervienen tres tipos distintos de RNA: mensajero (mRNA), de transferencia (tRNA) y ribosómico (rRNA).



-figura 2: Procesos bioquímicos implicados en la obtención de las proteínas a partir de la información genética nuclear. Son mecanismos de control de la expresión genética-

El mRNA, debido a su función puntual, es metabólicamente más inestable. Es la síntesis de la transcripción de un gen codificante que se corresponde con

una cadena polipeptídica determinada y posee la información del gen, por eso hay tantos mRNA como genes. De estructura monocatenaria y tamaño menor que el DNA que sirve de molde. Realiza la lectura o descifrado de la información genética.

El tRNA es un tipo de RNA pequeño que une con enlace covalente a un aminoácido formando complejos binarios. Su estructura es monocatenaria y realiza una función de molécula adaptadora porque interacciona también con las bases de mRNA mediante puentes de hidrógeno.

Los ribosomas formados por RNA (rRNA) son partículas subcelulares especializadas que catalizan las uniones entre los aminoácidos.

Al final de este proceso de traducción existen modificaciones postraduccionales o cotraduccionales que controlan la cadena polipeptídica para permitir su forma madura y eficaz -Peñañiel y cols.1995b-.

3-Colágeno: La proteína fundamental de la matriz extracelular

La unión de las moléculas de colágeno con proteoglicanos del espacio extracelular formando una red, es una condición importante para la resistencia al estrés físico y tensional al que se ha de someter para su función. Aunque se distinguen 11 tipos distintos de colágeno, sólo van a ser de interés en este estudio los que se depositan en el espacio extracelular -tipos I, II y III-. Al parecer el tipo I es el más prevalente en la encía y los otros se reparten un porcentaje alrededor del 20%. Las células mesenquimales tienen la habilidad de sintetizar un tipo particular de colágeno idóneo para el ambiente donde participará estructuralmente y con interrelación para realizar la función prevista.

Los aminoácidos que participan en la cadena helicoidal de la molécula, se repiten con una secuencia que está formada por glicina, prolina y hidroxiprolina. Al mismo tiempo hay otras dos cadenas situadas con la primera, formando una trenza de una longitud de unos 86Å. Esta triple cadena helicoidal es estabilizada por unos puentes de hidrógeno.

3.1-Síntesis y degradación del colágeno

Antes de su secreción al espacio extracelular para realizar su función como proteína fibrosa, es sintetizada primero como un precursor: procolágeno - figura 3-. Las cadenas que constituyen esta molécula son sintetizadas por mRNA específicos que traducen su mensaje en el retículo endoplásmico rugoso. En este órgano se produce el metabolismo previo a la secreción extracelular con una hidroxilación de los residuos específicos de prolina y de lisina por los enzimas específicos. Posteriormente hay una glicosilación de la hidroxilisina y una adición de glucosa. En los extremos de la molécula los péptidos desprenden los grupos N terminales antes de ser liberados de los ribosomas como cadenas α -completadas. Estas cadenas simples se reconocen entre ellas a través del propéptido C-terminal que permite la formación de puentes de unión disulfuros para ensamblar las 3 cadenas. Esta unión va seguida del plegamiento de la estructura molecular formando la triple hélice. El procolágeno, formado en su fase final, sale del retículo endoplásmico y accede al complejo de Golgi donde es almacenado en las vesículas para que éstas fusionen su membrana con la membrana celular y se produzca la secreción del procolágeno al exterior por exocitosis con la pérdida de extensiones terminales no plegadas de los grupos amino y carboxilo por peptidasas y obtención del tropocolágeno -Nimni y Harkness 1988- figura 3-.

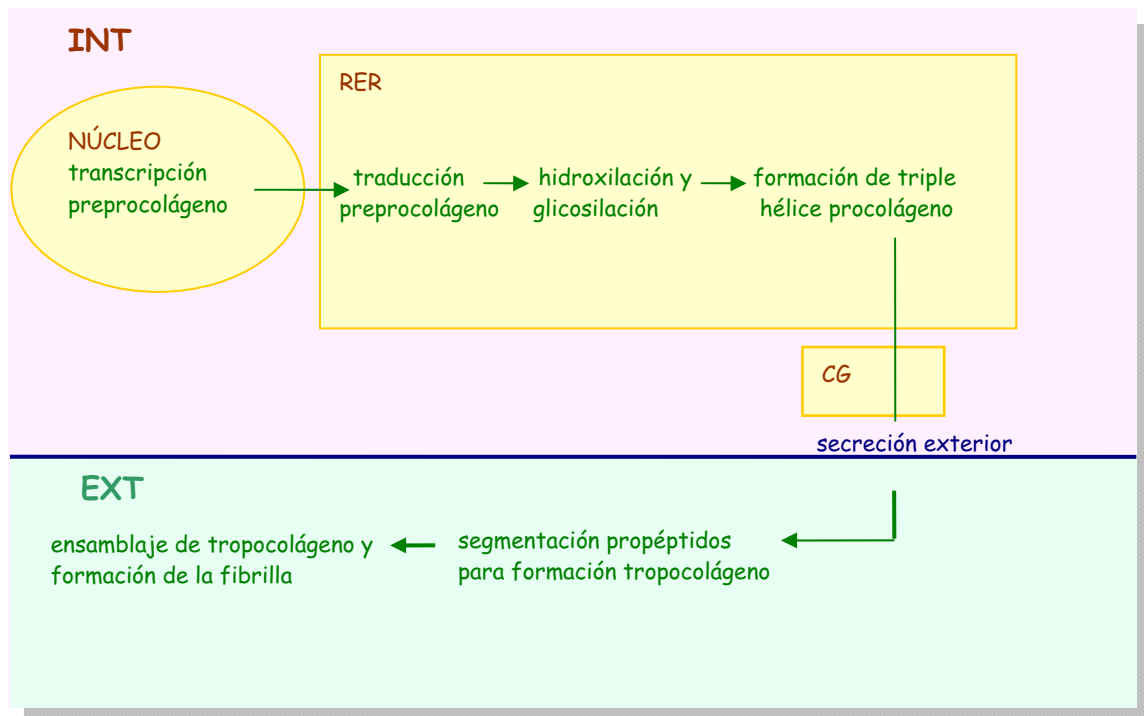
Un terminal carboxy del tropocolágeno puede tener una función de reconocimiento para ensamblarse a otras moléculas y formar polímeros para la organización de los haces de fibrillas. Estas se unirán para dar origen a fibras de varios μm de diámetro. Las fibrillas están reforzadas con enlaces cruzados en la molécula y entre diferentes moléculas en residuos de lisina.

Al microscopio electrónico se observa una secuencia de bandas por la distribución escalonada de las moléculas de tropocolágeno. De este modo se formarán agregados macromoleculares a los que podrán también unirse otras macromoléculas -glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos- que forman parte de la sustancia fundamental extracelular y se sitúan también en los espacios interfibrilares para interaccionar con el colágeno.

Se ha observado que los distintos GAG -condroitín, dermatán, heparán sulfato ...- facilitan el proceso de formación de las fibras colágenas en la

DISEÑO DEL ESTUDIO

fase inicial de fibrillogénesis y su control en la fase de crecimiento fibrilar - Veis y Payne 1988, Nimni y Harkness 1988-. También se ha comprobado *in vitro* que participan en la estabilidad de su estructura helicoidal.



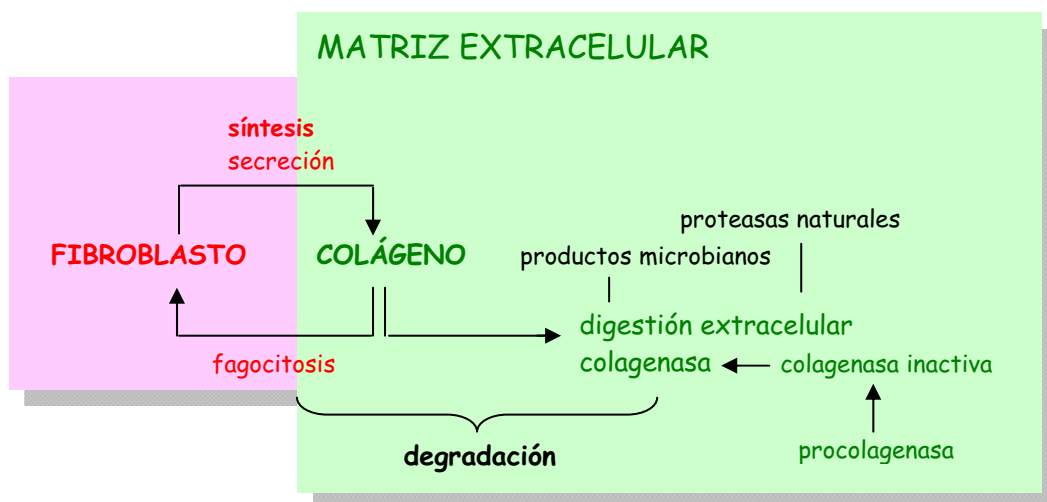
-figura 3: Síntesis y secreción del colágeno. INT: interior celular. EXT: exterior celular. RER: retículo endoplásmico rugoso, CG: complejo de Golgi. Modificado de Gartner y Hiatt 1997-

El metabolismo del colágeno puede estar alterado por distintos factores capaces de modificar su actividad de una forma directa o indirecta. Estos factores observados en cultivos modulan la presencia del colágeno y se pueden citar: linfocitos T estimulados por antígenos, monocitos estimulados por fitohemaglutinina, citocinas,... Los glucocorticoides inhibirían también su producción por inhibición de la actividad de la prolil-hidroxilasa y de la expresión del mRNA-procolágeno. La vitamina A inhibe los efectos de los corticoides en su acción sobre las proteínas, el colágeno y el DNA.

La degradación incluye procesos por diferentes vías en las que también participa el fibroblasto de forma activa: intracelular y extracelular -figura 4-:

DISEÑO DEL ESTUDIO

1. Intracelular—. Consiste en la fagocitosis como mecanismo fisiológico. En situación patológica disminuye su acción. En esta función están implicadas otras células con los fibroblastos. Intervienen proteinasas y citocinas que modulan la acción: el factor de crecimiento transformador β (TGF β) aumenta la fagocitosis, en cambio la interleucina 1 β (IL-1 β) la disminuye -Van der Zee y cols.1997-.
2. Extracelular—. Es la habitual en condiciones patológicas. Mediante la colagenasa -metaloproteinasas colagenolíticas de la matriz tipo 1 (MMP-1)- y productos microbianos que estimulan las citocinas. MMP-1 está controlada en su acción a 3 niveles: -producción, -activación, -inhibición. Previa a la fagocitosis puede existir una primera degradación extracelular y posteriormente la endocitosis. Las citocinas también intervendrían en esta vía. -Van der Zee y cols.1997-.



-figura 4: Síntesis y degradación del colágeno. Esquema original-

Los enzimas colagenolíticos tienen algunas propiedades en común: actuar a pH neutro de forma óptima, no se almacenan en el interior celular, se secretan de forma inactiva o latente o bien unidas a inhibidores que se desprenden para quedar el enzima activo y con menor peso molecular. Presentan un núcleo metálico de zinc y son inhibidas por agentes quelantes como EDTA, cisterna con recambio del zinc por otros metales divalentes. Algunas colagenasas latentes son activadas por agentes no proteolíticos.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Las células que sintetizan colagenasas suelen estar influidas por el ambiente en el que viven, influidas por células residentes del mismo tejido conectivo como células migratorias acumuladas por procesos de inflamación o traumatismos o por productos secretados por ellas.

Los fragmentos obtenidos por la lisis del colágeno -TCA y TCB- son eliminados por la orina y en condiciones patológicas de tipo endocrino o etapas fisiológicas específicas pueden aparecer niveles elevados de hidroxiprolina -Nimni y Harkness 1988-.

El resultado de ambos procesos -síntesis y degradación-, por la influencia de distintos factores, condiciona la variabilidad del depósito -ver 4.4 Patogenia-. En condiciones fisiológicas ambos procesos antagónicos tienen una duración parecida de alrededor de unos 30 minutos -Berkovitz y cols.1977-.

4-Colagenasa: La principal metaloproteinasa

En la degradación del colágeno se conocen al menos 2 metaloproteinasas tisulares distintas a la colagenasa que tienen una función importante en la degradación de la matriz: las gelatinasas, sinérgicas a las colagenasas, que actúan sobre sustratos solubles, y las proteoglicanasas que facilitan la degradación del colágeno por remoción de proteoglicanos protectores. Ante esta diversidad de enzimas colagenolíticas, no todos los efectos de degradación del colágeno dependen de las colagenasas intersticiales.

Es una enzima catiónica, de la que se distinguen la clásica o intersticial, que degrada el colágeno I, II y III, y la colagenasa específica que actúa sobre colágenos genéticamente distintos: IV, V.

4.1-Estimuladores de la producción de colagenasa

Los mediadores fisiológicos más relevantes de producción son las citocinas, con especial protagonismo la interleucina 1 β (IL1) en su expresión por los fibroblastos. También se pueden citar la prostaglandina E₂ (PGE₂) y el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Existen también agentes químicos en su producción: ésteres de forbol -acetato de forbol miristate (PMA)-. Estos tienen una función de activación de la fosfocinasa C e imitan a diacilglicerol. PMA también podría estimular a los fibroblastos para esta secreción. Otros

estimuladores serían también la cytochalasina B y la colchicina -Stricklin y Hibbs 1988-.

4.2-Inhibidores de la biosíntesis de colagenasa

Glucocorticoides: La hidrocortisona y la dexametasona inhiben la expresión de la colagenasa a unas concentraciones fisiológicas $-10^{-7}M-$ en fibroblastos, macrófagos y en cultivos de órganos. El mecanismo sería a través del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular o a través de un inhibidor de la fosfodiesterasa. A diferencia de otras hormonas, los glucocorticoides con el AMPc actúan de forma universal sin ser órgano-específico.

Fenitoína: No inhibe la actividad de la colagenasa de forma directa. Se utilizó para tratar una enfermedad que se caracterizaba por una sobreproducción de una colagenasa alterada -epidermolisis distrófica bullosa- por fibroblastos de la dermis. Se producía también como resultado de su mecanismo de acción una ausencia de fibrillas de anclaje y de antígenos para algunos anticuerpos monoclonales.

Retinoides y derivados: Inhibidores de la expresión de la colagenasa -Stricklin y Hibbs 1988-.

4.3-Modulación extracelular de la actividad de la colagenasa

Esta actividad está incrementada por el aumento en la concentración de los leucocitos neutrófilos y macrófagos y también por la acción de IL1 β . Posteriormente la fagocitosis y la digestión lisosomal del colágeno se producen por una previa desintegración que provoca esta actividad de la colagenasa.

Se pueden citar como posibles factores: 1--control de la unión de la proteinasa al substrato, 2--presencia de la proteinasa en forma latente, 3--intervención de moléculas inhibitorias específicas.

1. Secuestro de la colagenasa en la matriz extracelular.
Mediante macromoléculas de la matriz que previenen su unión al colágeno. Los GAG pueden favorecer la afinidad del enzima

DISEÑO DEL ESTUDIO

-zymógeno o formas activas- por polisacáridos sulfatados -heparina-. No parece que sea ésta la vía para la colagenasa procedente de fibroblastos humanos.

2. Activación de colagenasas latentes.

La mayoría de las colagenasas son secretadas como auténticos zymógenos. Se conocen enzimas proteolíticos que activan las procolagenasas: -tripsina, -plasminógeno activador y plasmina, -calicreína plasmática, -catepsina B, -endógeno-metaloproteasas y serin-proteasas. Podría suceder una progresión enzimática en forma de cascada para la iniciación de esta colagenolisis. En el principio de esta sucesión enzimática estaría un proactivador, necesario para la expresión de la actividad colagenolítica.

La procolagenasa sería una colagenasa latente que es purificada por métodos físicos para ser totalmente activa. Por una tripsinización se obtendrían moléculas más pequeñas pero también activas. Los compuestos órganomercuriales serían activadores eficaces de colagenasa latente.

3. Inhibidores fisiológicos de la colagenasa.

Aparte de los citados anteriormente, se distinguen distintos grupos de inhibidores: - α_2 macroglobulina: Su acción se limita a la matriz del tejido conectivo excepto en situaciones de trauma o de inflamación; -proteínas catiónicas; -inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP): Glicoproteínas muy ubícuas expresadas en muchas líneas celulares en concreto en fibroblastos humanos, macrófagos y plaquetas. *In vitro* ni la densidad celular ni el pH del medio afectan su producción.

5-TGF β , factor de crecimiento transformador β

El factor de crecimiento transformador (TGF) es una proteína que permite la distinción de 2 tipos: α y β . El primero está relacionado químicamente con el factor de crecimiento epidermoide (EGF) por lo que presentan acciones biológicas en común y se unen al mismo receptor. Son capaces de estimular a las células epiteliales, liberar iones calcio del hueso con inhibición de la actividad osteoblástica y facilitar la angiogénesis.

DISEÑO DEL ESTUDIO

TGF β participa como inductor de procesos de reparación y regeneración de la matriz extracelular al estimular la síntesis de proteínas -fibronectina, colágeno y proteoglicanos- -Varga y cols.1987, Cochran y cols.1989- a través de la regulación de la expresión de colagenasa -síntesis y liberación- y de los inhibidores de la colagenasa -Varga y cols.1987, Narayanan y cols.1989, Kähäri y cols.1991, Tipton y Dabbous 1998- y de receptores celulares para proteínas de la matriz -integrinas-. Las plaquetas lo liberan con altas concentraciones en los puntos tisulares donde se necesita el proceso de reparación -fibróticos y angiogénicos- en la curación de traumatismos. En el sistema inmunitario favorece la síntesis de anticuerpos IgA por inducción sobre los linfocitos B. Es secretado por linfocitos T cuando son estimulados por antígenos y fagocitos mononucleares activados por LPS. Aumenta la proliferación de fibroblastos y su migración quimiotáctica -Postlethwaite y cols.1987- con el desarrollo de fibrosis en muchos órganos de la economía en diversos procesos patológicos -Border y Noble 1994-.

Su interés para la investigación en este estudio está en que los tres fármacos inductores aumentarían la expresión de TGF β y estimularían su síntesis directamente y a través de células intermediarias -Saito y cols.1996, James y cols.1998, Cotrim y cols.2002, O'Hara y cols.2002-. Participa en la modulación fenotípica de los fibroblastos, en la inmunosupresión y controla las interacciones en la matriz extracelular.

Se ha comprobado que el agrandamiento gingival inducido por fármacos y la fibromatosis gingival hereditaria presentan un aumento significativo en la expresión de TGF β_1 con diferencias con otras isoformas así como alteraciones en la proporción de sus receptores al comparar con tejido gingival sano -Wright y cols.2001-. También se observaron niveles elevados en flujo gingival crevicular de pacientes transplantados bajo tratamiento con ciclosporina por lo que su presencia se consideraría de alto riesgo para el desarrollo de AG -Ellis y cols.2004b, Wright y cols.2004-.

De TGF β deriva la serie de Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) implicadas en la regeneración ósea por sus propiedades osteoinductivas. Mediante técnicas de clonado se han podido obtener distintos tipos -entre ellas la BMP-recombinante- para el estudio e investigación en la promoción y crecimiento de la matriz ósea.

E-MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de los fibroblastos se efectuará a partir de una muestra de encía con aislamiento en unas condiciones determinadas:

-para el estudio histopatológico el espécimen se *fijará* para la conservación de todas las características estructurales de las células y del estroma tisular.

-para investigar su comportamiento fisiopatológico y los procesos bioquímicos que se producen o bien observar los efectos que inducen determinados fármacos o compuestos sobre células específicas, es preciso tratar la muestra y mantener las células, "vivas", en cultivo -Butler 1996-.

1-Procesamiento de muestras de encía humana para el estudio histológico

Las muestras se obtuvieron de 2 pacientes en el servicio de Periodoncia de la Clínica Odontológica Universitaria de Bellvitge (Barcelona). La primera correspondía a encía de mujer sin AG, que se sometió a una cirugía periodontal, por indicación quirúrgica de reducción de bolsas, sin recibir terapéutica farmacológica. La muestra que presentaba AG procedía de un paciente transplantado de riñón que estaba tratado con ciclosporina desde hacía 2 años a una dosis de 125mg/12h.

Se procedió primero a observar las características histopatológicas de la muestra de AG por ciclosporina al compararla con la de encía sana o en su defecto con algún grado de inflamación -muestra de encía sin tratamiento farmacológico previo conocido ni AG- y comprobar alguna semejanza con el patrón patológico de AG descrito en la literatura.

1.1-Fijación, deshidratación, inclusión

El estudio y tratamiento de las muestras para la tesis se realizó en el laboratorio de Biología Celular del Campus Universitario de Bellvitge (Barcelona). Estas muestras se fijaron⁷ en formaldehído al 4% durante 24 horas.

⁷ Fijación: inmoviliza las células y la matriz extracelular en un aspecto y similar al estado vivo. Se realizó inmediatamente a la extirpación de la encía y en el laboratorio se puso en el agitador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pasadas 24h se lavaron con abundante agua y se procedió a la deshidratación:

Alcohol 70° 10h⁸...Alcohol 96° 3h -con 3 cambios-...Alcohol absoluto 3h -con 3 cambios-...Xilol 1h

Se incluyeron las muestras en un baño de parafina (56-58°C) unas 10h . La inclusión en parafina hace que su impregnación en todas las estructuras morfológicas sea muy intensa, y al ser solidificable permite la partición en secciones delgadas. La penetración es eficaz en estado líquido -funde entre 50 y 56°C- y cuando se realiza de forma progresiva. Por este motivo la impregnación es al calor en una estufa con temperatura regular para que la penetración de la parafina sea homogénea. Al no ser soluble en agua, es importante la deshidratación previa que se ha realizado -Nezelof y cols.1975-.

1.2-Conformación del bloque y obtención de secciones

Con el dispensador de parafina se rellena el molde que acoge la muestra pasada desde la cassette utilizando ésta de tapa. La parafina líquida atraviesa el ranurado de la cassette y cubre la muestra. En pocos minutos ya solidifica y queda conformado el bloque -figura 1-.



-figura 1: En la parte superior aparecen las cassettes con los bloques de parafina conteniendo las muestras. En la parte inferior se observan las secciones de las muestras obtenidas mediante el microtomo -

⁸ El alcohol permite una deshidratación y conservación de la muestra. Se ha utilizado el etílico. Se aplica de forma escalonada de menor a mayor concentración y se elimina el antiguo por decantación. Realizado el cambio, de nuevo se pone la muestra en el agitador.

La solidificación es más homogénea si es rápida y se consigue un enfriamiento a temperatura de congelación. Este bloque se talla en forma de poliedro y se marca para distinguir las muestras.

Preparados los bloques de las muestras, se guardan en el congelador hasta el momento de ser cortados mediante el microtomo. Las secciones serán de 3-5 μm y ya se procederá a su montaje en los portaobjetos.

1.3-Montaje de los cortes y tinción con hematoxilina-eosina

Los cortes se extienden en un baño de agua a 30°C que tiene gelatina para el montaje con adherencia sobre la superficie del portaobjetos ya que recién separados de la tira son irregulares y están plisados; por eso conviene aplanarlos. Finalmente se seca la preparación con escurrido y desecado.

El último paso es la coloración de las preparaciones con hematoxilina-eosina:

Se desparafinan los cortes sumergiéndolos en un baño de xilol durante 10 min y se rehidratan con alcoholes en un proceso de graduación decreciente cubriendo el porta primero con alcohol absoluto y después de 95° y 70°, 1 min para cada alcohol. Se lava con agua destilada y se cubre la preparación con hematoxilina⁹ durante 2 minutos y se lava de nuevo para eliminar los restos del colorante. Si hay exceso de tinción, se elimina de forma selectiva con una mezcla de alcohol-ácido clorhídrico durante pocos segundos¹⁰ y se vuelve a lavar durante 5 minutos. Ahora se cubre la preparación con eosina¹¹ en un tiempo aproximado de 4 minutos y se lava rápidamente.

Ya se procede a deshidratar la preparación porque el medio de montaje

⁹ Hematoxilina: Colorante básico, con afinidad para la tinción de moléculas cargadas negativamente y revela la distribución de los ácidos nucleicos y proteínas ácidas. Coloración azul.

¹⁰ La mezcla alcohol-HCl sirve para *diferenciar* las estructuras ácidas. Con 4 segundos es suficiente para que se elimine la hematoxilina de los orgánulos no tan ácidos como el núcleo -lisosomas, mitocondrias...- si se dejara más tiempo también se perdería la tinción nuclear.

¹¹ Eosina: Colorante ácido, con afinidad para las estructuras citoplasmáticas -acidófilas o eosinófilas-. Coloración rosada, anaranjada.

DPX¹²- es una resina sintética no hidrosoluble y se hace como antes - alcoholes en orden creciente de concentración: 70°, 95° y absoluto -2 veces-, 1 minuto para cada uno-. Finalmente se cubre con xilol 1 minuto porque el medio de montaje necesita de un disolvente miscible.

A continuación se procede al montaje poniendo una gota de DPX sobre la preparación y encima se pone el cubre con un poco de presión para eliminar las burbujas de aire y se deja secar -Nezelof y cols.1975--figura 1-.

2-Procedimiento de cultivos celulares

Las condiciones de los cultivos celulares dependen de los medios de cultivo ricos en nutrientes, factores de crecimiento y proteínas con quimioterápicos para evitar el crecimiento y desarrollo de otras formas de vida. Se necesitan unas condiciones de temperatura -37°C- y de CO₂ -5%- en el incubador para el crecimiento del cultivo a un pH determinado de 7,4 que se mantiene por el sistema amortiguador Bicarbonato-CO₂. El CO₂ se suministra desde una bombona contigua y con un grado de humedad alto en el interior del incubador que permite el control de la evaporación en los recipientes de los cultivos.

En el curso del crecimiento y desarrollo celular se produce la replicación con la ocupación progresiva de la placa por adherencia en el fondo y el medio se va empobreciendo por consumo de sus componentes y por los productos de excreción celulares. Estos procesos requieren el lavado y reposición del medio y un *pase*¹³ del cultivo en otro recipiente más adecuado. De este modo se consigue cultivar una línea celular formada por células independientes y separadas de un tejido, con identidad genética aunque exista una ligera variación, pero la reproducibilidad celular con sus características principales se mantiene normalmente durante varias generaciones.

Según el número de células obtenido existe la posibilidad de congelar -ver 2.4-Proceso de congelación- algunas células antes de la muerte natural de la línea o

¹² DPX: Medio de montaje entre el corte y el cubreobjetos. Es transparente con el mismo índice de refracción que el vidrio, asegura la adherencia del cubre al porta y la conservación de la preparación.

¹³ Pase: Desadherencia con tripsina de las células del fondo para cambiarlas a otra placa. Es un recambio del medio de cultivo y de los fibroblastos.

su degeneración después de un número determinado de pases.

Este proceso de manipulación y tratamiento de los cultivos celulares requiere un trabajo en condiciones asépticas para evitar la contaminación cuyo origen más frecuente procede del personal que trabaja: manos, cabello, aliento... Las medidas a adoptar están consideradas en unos hábitos, métodos barrera, utilización de instrumentos estériles y de un solo uso, medios de cultivo, productos libres de contaminantes y tests de mycoplasmas.

Los recipientes y envases de cultivos son de un material plástico - poliestiren-sulfonato- que permite la adherencia y el crecimiento celular. Se distinguen los flacones -frascos o placas de cultivo- para tratamiento de sub-cultivos, con diferentes tamaños y clasificados por la superficie: 25-75-150-175 cm². Las micropipetas como instrumentos dispensadores de líquidos a cantidades exactas también de volúmenes diversos con uno o múltiples terminales de dispensación, los tubos -falcon®- permiten el trabajo del recambio de líquidos y medio con capacidades distintas, viales y eppendorfs .

La manipulación y el trabajo con cultivos se desarrolla, con el cumplimiento de los requisitos universales mencionados, en el interior de una campana de flujo laminar o de seguridad biológica.

Esta cabina dispone de un flujo continuo de aire vertical filtrado que permite el trabajo horizontal en unas condiciones de esterilidad. Este aire circula en una área de trabajo estéril y un 70-80% recircula para mantener una manipulación estéril y proteger al operador. Según su capacidad de protección frente a agentes tóxicos o infecciosos tiene un grado de seguridad biológica catalogada. Las de mayor uso son las que proporcionan una protección moderada y es de este nivel la que se ha utilizado en la tesis -cabina de flujo laminar de clase II-.

2.1-Cultivo primario de fibroblastos procedentes de encía humana

Previamente se cultivaron 2 líneas celulares de origen distinto: NIH3T3 de ratón y fibroblastos de encía humana procedentes de banco celular -ref. CRL-2014 ATCC-. La justificación de estos cultivos celulares estuvo en realizar viabilidades celulares y comparar los resultados obtenidos con los correspondientes a los cultivos primarios de encías humanas. Por tanto el procedimiento que se explica a continuación es el correspondiente al núcleo del trabajo experimental y con él se verifican las comparaciones con todas las líneas celulares cultivadas.

Una parte de las muestras de tejido correspondientes a la encía sana y a la encía agrandada (AG) de los 2 pacientes se fragmentaron en explantes para la realización de cultivos primarios de fibroblastos y estudiar los efectos del tratamiento inductor farmacológico. Con el cultivo de los explantes se observa el comportamiento celular en su crecimiento y desarrollo de forma comparativa entre la línea celular que deriva del AG y la de la encía sana.

Al tomar las muestras se ponen en PBS¹⁴ 1x para lavarlas. Se cortan en explantes de 1mm de diámetro (Ø) aproximadamente y se ponen en una placa 100¹⁵ donde previamente se ha puesto medio de cultivo compuesto por:

- "Medio Esencial Mínimo Dulbecco" (DMEM)-ref.01-055-1A Biological Industries-,
- 10% Suero Fetal Bovino (SFB)-ref. F7524 Sigma-,
- 4 mM L-Glutamina -ref. 03-020-1B Biological Industries (BI)-,
- 100u/ml penicilina estreptomocina-ref.03-031-1BBI-,
- 2,5ng/ml amfotericina B -ref. 03-029-1C BI-,
- 50ng/ml gentamicina -ref. 03-035-1C BI-.

Este volumen ha de ser pequeño (3-4 ml) para evitar que desde el principio los explantes puedan flotar, pero al mismo tiempo los ha de mantener cubiertos -figura 2-.

En las primeras horas los explantes cubiertos por el medio de crecimiento se van adhiriendo al fondo de la placa y se inicia la migración de las células epiteliales en dirección centrífuga. Durante este proceso, las placas

¹⁴ Tampón o buffer fosfato

¹⁵ 100 mm Ø

MATERIAL Y MÉTODOS



-figura 2: Los explantes sumergidos en medio de cultivo, en una placa p100-

permanecen en el incubador -a 37 °C y 5% de CO₂- y el medio se cambia cada 2 días debido al empobrecimiento por el consumo de los principios vitales y la presencia de los productos de secreción celular. Posteriormente a las células epiteliales, se observa la migración de fibroblastos en días sucesivos -entre el 4° y 5° día- que se separan y se distribuyen también de forma centrífuga a otros puntos más alejados del explante. Se adhieren progresivamente en el fondo de la placa con proliferación y desarrollo hasta la confluencia entre ellos con una distribución en monocapa. El estímulo de crecimiento y diferenciación se produce gracias a su relación con otras células vecinas que cesa con la saturación de la monocapa -inhibición por contacto- cuando se llega a máxima confluencia -ver figura 3 en F-Resultados-.

Mientras los fibroblastos proliferan, se sigue el recambio del medio de cultivo y cuando el fondo de la placa ya está cubierto de fibroblastos se procede a un subcultivo.

2.2-Subcultivo de células

Cuando el cultivo celular está confluyente se procede al subcultivo de las células. Se aspira el medio de cultivo y se hacen 2 lavados seguidos con PBS 1x. Ahora se añaden 2 ml de tripsina-EDTA 0,25%/0,02%-ref. 03-050-1A BI y se incuba la placa durante 3-5 minutos a 37 °C hasta observar que las células se desprenden del fondo -tripsinización-. La tripsina actúa en un

tiempo corto -unos 30 sg-.

Para inactivar la tripsina seguidamente, se añade como mínimo el mismo volumen de medio de cultivo cuyo suero fetal bovino (SFB) es el que la inhibe. Se recoge toda la solución en un tubo y se centrifuga a 47G¹⁶ durante 5 minutos. Después del centrifugado se elimina el sobrenadante y el *pellet* -depósito- de células se resuspende en medio fresco y se reparte en 2 placas.

Si los fibroblastos llegan de nuevo a confluir se realizará otro subcultivo.

2.3-Contaje celular

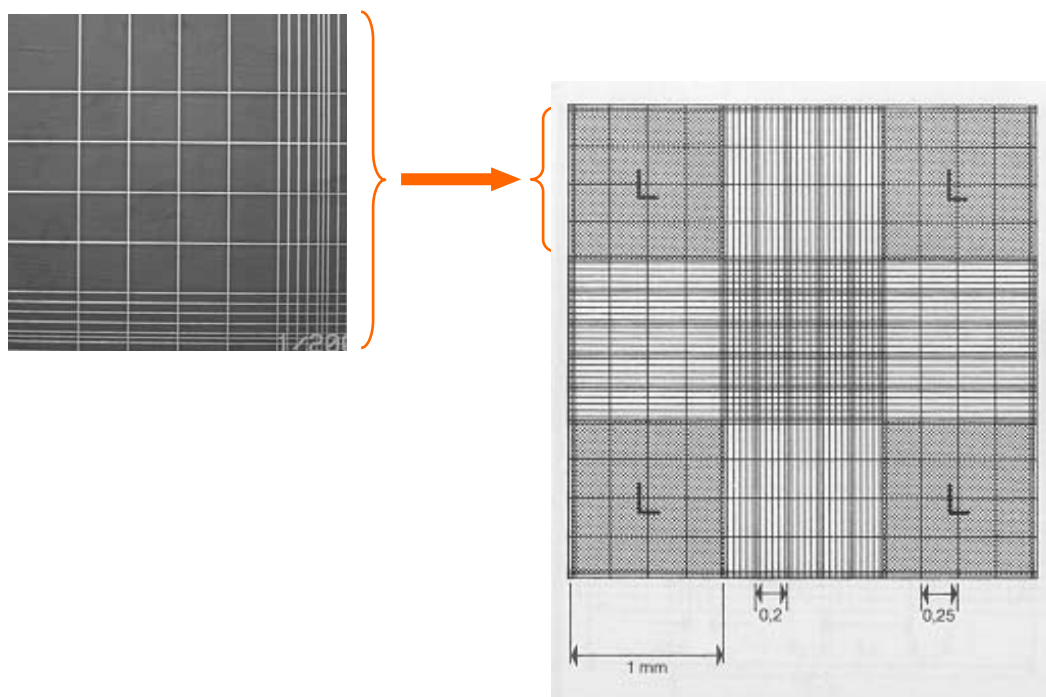
Se toma una gota de 10 µl con una micropipeta de la solución del tubo con los fibroblastos desadheridos por la acción de la tripsina, antes de centrifugarlo, y se pone en una cámara de Neubauer -figura 3-. Esta dispone de 4 cuadrados de 1mm de lado, cada uno dividido en 16 cuadrados más pequeños. Por encima y tapando la gota de la solución, se coloca un cubreobjetos que permite un espacio de altura 0,1mm, de modo que el volumen de líquido que se aloja en cada cuadrado es de 1x1x0,1mm³ -o 10⁻⁴ cm³ que aproximadamente es 10⁻⁴ml-. Por consiguiente la concentración de células por ml será el número de células contadas en cada cuadrado y multiplicado por 10⁴, o expresado en la fórmula el número total de células:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ cel.}}{\text{n}^{\circ} \text{ cuadrados}} \times 10^4 \times \text{volumen total}$$

2.4-Proceso de congelación de células

Se parte de una confluencia del 70-80%. Las células desadheridas del frasco y que no van a "pasar" a un subcultivo se congelarán para reserva. Se procede al recuento de células.

¹⁶47G=500rpm



-figura 3A: Detalle de la figura 3B , se observa aumentada una parte del cuadrado superior izquierdo-

-figura 3B: Los 4 cuadrados de 1mm de lado en los que se puede realizar la lectura para el conteo celular-

Después de la centrifugación se aspira el sobrenadante y queda el pellet. A éste le añadimos una solución formada por SFB -aporta factores de crecimiento- al 90% y Dimetilo Sulfoxido (DMSO)¹⁷ al 10% y se resuspende todo en el tubo. El volumen en el que resuspendemos es el necesario para tener 1×10^6 células en 1ml. En cada vial se pone 1ml. Estos se sitúan en un contenedor de viales donde en su base hay previamente isopropanol para que la congelación se produzca lentamente -disminución de $1^\circ\text{C}/1 \text{ min}$ - y ya se lleva al congelador a -80°C .

2.5-Descongelación de la línea celular

Se toma el vial de células del congelador y para cambiar su temperatura a una de 37°C se pasa primero por una intermedia en frío. En un tubo de 15 ml se ponen unos 5ml del medio de cultivo caliente y se añade el volumen del

¹⁷ Es un crioprotector. Permite la conservación de las células aunque es tóxico a temperatura ambiente.

vial una vez descongelado para que se mezclen los 2 líquidos y se diluya enseguida el DMSO y se centrifuga el tubo a 47G durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante sin apurar el depósito de células y éste se resuspende con medio nuevo -5 ml a 37°C¹⁸-. Se pone en una p60 y se espera 24h para que las células se adhieran y se renueve el medio de cultivo de forma asidua -cuando se vea que está empobrecido a los 2 o 3 días-.

2.6-Determinación de la viabilidad celular sometida a la inducción farmacológica

Con la obtención de un número suficiente de fibroblastos de ambas líneas celulares -tejido sano y AG- de encía humana, se estudia el efecto de los 3 fármacos sobre la viabilidad celular para saber si su acción produce algún cambio proliferativo en las poblaciones celulares que justifique la patogenia del AGIF por hiperplasia fibroblástica -Ver C-Hipótesis de trabajo y Objetivos-.

Se utiliza el método del MTT¹⁹ -Mosmann 1983- -figura 4- que cuantifica por colorimetría la viabilidad celular durante el proceso de proliferación celular, fase en la que el metabolismo es más activo.

En una placa de 96 pocillos se ponen 10³ células en 100µl de medio de cultivo por pocillo, procedentes de placas de cultivo p100, y se incuba 24 h a 37°C y 5% de CO₂. En los pocillos exteriores de todo el perímetro de la placa se pone medio sin células ya que en los extremos de la placa siempre se corre el riesgo de que el medio se evapore, secándose por consiguiente las células -filas A y H y columnas 1 y 12-. En las columnas de los controles -2 y 11- se pone medio de cultivo con células pero sin tratamiento.

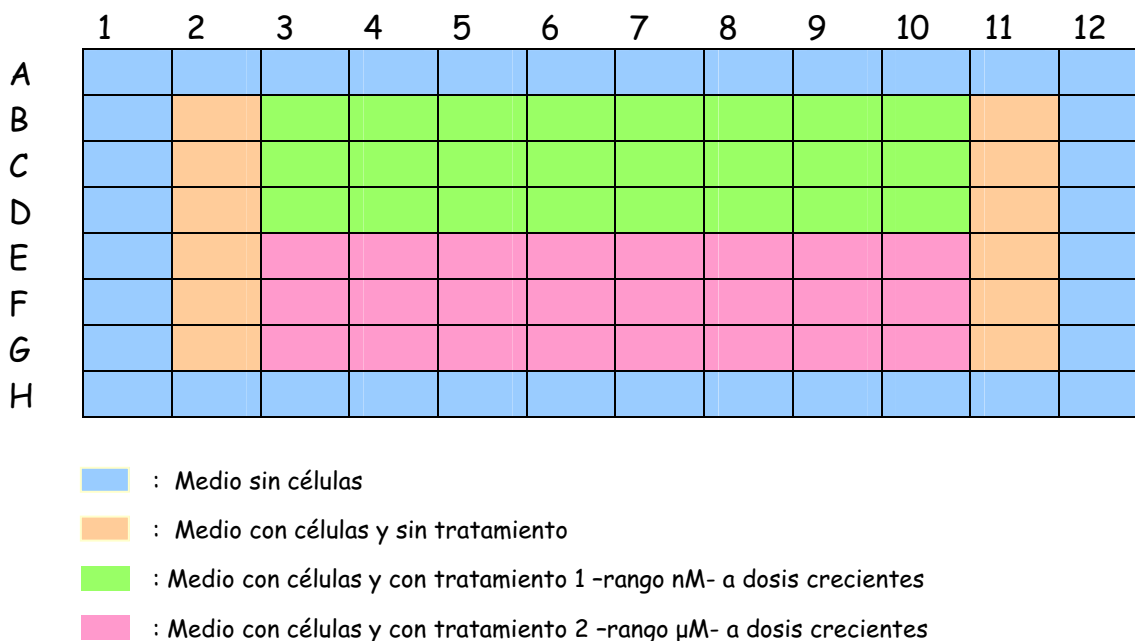
A las 24 h se considera que en cada pozo hay 2x10³ fibroblastos. Se cambia el medio de cada pocillo y se ponen los fármacos a diferentes dosis -total 8 y crecientes, en 2 rangos distintos- desde la columna 3 a la 10. Se pueden realizar 2 viabilidades por placa: una en las filas B-D y otra en las filas E-G. Cada viabilidad permite tres réplicas por condición -figura 4-. Los fibroblastos son sometidos a esas dosis de fármacos durante 24h y a las condiciones habituales -37°C y 5% de CO₂-.

¹⁸ Con este procedimiento ya se ha eliminado todo el DMSO

¹⁹ Sal MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyltetrazodium, bromide: sal de tetrazolium

MATERIAL Y MÉTODOS

Las dosis aplicadas de los fármacos son las más utilizadas en la mayoría de investigaciones consultadas.



-figura 4: Esquema de una placa de 96 pocillos micro titter para el ensayo del MTT-

Las fuentes celulares son las procedentes de ratón NIH3T3, las de banco celular y las de cultivos primarios de fibroblastos de encía humana: sana y AG. En todos los estudios de viabilidad se toman grupos de células que no reciben tratamiento farmacológico y que actúan como controles -tabla XIX- - Comparar con figura 4-:

Pasado este tiempo se ponen 10μ l de MTT y se deja en el incubador durante 4 h para conseguir la reacción en todas aquellas células que están vivas. El MTT se reduce por NADH de la cadena respiratoria (sistema de la succinato-tetrazolium reductasa) y por tanto es activo sólo en células viables²⁰. Se obtiene formazán que cristaliza de forma insoluble en agua con cristales de color lila, pero sí son solubles en DMSO que se pone en los pocillos - 100μ l en cada pocillo- una vez que se retira el medio²¹.

²⁰ La reducción de MTT no se considera únicamente como un proceso mitocondrial, también se produce una reducción citoplasmática en la que interviene el nucleótido piridina y los cofactores NADH- NADPH.

²¹ DMSO o el isopropanol diluyen los cristales de formazán y tiñen la solución que se podrá leer. Se produce la muerte de estas células.

MATERIAL Y MÉTODOS

Finalmente se lee la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA. El color es estable durante 1 h. La viabilidad celular se expresa en forma de porcentaje: n° cels. viables/n° cels.población. El valor de 100% de viabilidad corresponde a la absorbancia de las células control y es proporcional al número de células metabólicamente activas.

Fenitoína (PHT)

columnas	3	4	5	6	7	8	9	10
rango nM	1	5	10	15	20	25	30	35

1ª viabilidad y por triplicado (filas B-D)

columnas	3	4	5	6	7	8	9	10
rango µM	1	5	10	15	20	25	30	35

2ª viabilidad y por triplicado (filas E-G)

Nifedipina (Nf)

columnas	3	4	5	6	7	8	9	10
rango nM	10	20	30	40	50	60	70	80

1ª viabilidad y por triplicado (filas B-D)

columnas	3	4	5	6	7	8	9	10
rango µM	0,1	0,3	0,6	1	3	6	10	13

2ª viabilidad y por triplicado (Filas E-G)

Ciclosporina (Cs)

columnas	3	4	5	6	7	8	9	10
ng/ml	50	100	200	300	400	500	600	700

1 viabilidad y por triplicado

-tabla XIX: Dosis de los fármacos inductores con las que se realiza el estudio de viabilidad-

2.7-Técnica de extracción de proteínas

Se preparan unas placas con medio y se siembran fibroblastos: 4 placas para fenitoína y nifedipina, y 2 para ciclosporina. Para los 2 primeros se distinguen 2 rangos de medida distintos -1 para 2 placas-. En cada placa se ponen: 10^6 células/20ml. Pasadas 24h se cambia el medio de cultivo por medio nuevo sin SFB²² y se añaden los fármacos -tabla XX-.

	p nM		p μ M		p control
	1ª	2ª	1ª	2ª	
PHT	15	35	15	35	-
Nf	40	80	1	13	-
Cs	1ª p: 300ng/ml 2ª p: 700ng/ml				-

-tabla XX: Dosis de los fármacos para cada placa. Son las mismas que se han utilizado para todo el experimento desde las viabilidades-

A las 72h -tiempo de tratamiento- se pasa el medio de cultivo de cada placa junto con las células -se desenganchan con un rascador- a un tubo de 50 ml. Se centrifugan los tubos a 270G²³ durante 5 min y se hacen un par de lavados del *pellet* -poso- de células con PBS 1x. Finalmente se añade el tampón de lisis -tabla XXI-.

85 mM Tris pH 6,8
2% SDS
100 μ M PMSF
0,3 μ M Aprotinina
1 μ M Leupeptina

-tabla XXI: Composición del tampón de lisis, se asocia un detergente con inhibidores de proteasas-

²² Interesa que no influyan factores de crecimiento ni otras moléculas, sólo los fármacos inductores.

²³ 270G= 1200rpm

El depósito de células se disgrega con el tampón de lisis y se incuba 15 min en hielo. Seguidamente se centrifuga 10min a 10000G²⁴ a 4°C y se pasa el sobrenadante -proteínas totales- a un vial nuevo. Se calientan las muestras 10min a 93°C y se guardan a -20°C.

3-Electroforesis

Mediante la electroforesis se consigue la separación de las proteínas según su peso molecular -1 dimensión- según la técnica SDS-PAGE²⁵. Según la concentración del gel de acrilamida varía el tamaño de los espacios y por consiguiente la permeabilidad al paso de las proteínas: la concentración más frecuente que se utiliza oscila entre 5-12%. En este protocolo se utiliza el 15% porque la proteína que se estudia es de bajo peso molecular -- siempre en condiciones reductoras. Todas las proteínas se cargan negativamente por acción del SDS -detergente aniónico- que estira las proteínas y que forma parte del tampón de carga desnaturizante; las más pequeñas reciben menos carga a diferencia de las mayores. Para producir el movimiento de las proteínas se crea un campo eléctrico para el desplazamiento hacia el polo positivo, siendo la movilidad proteica función lineal del logaritmo del peso molecular de las proteínas. Hay una escala estándar de peso molecular para la localización de la proteína.

El gel de acrilamida se compone de:

- **gel resolutivo** -tampón lower- de pH 8,8 zona de distribución de las proteínas después del desplazamiento -gel resolving-:

15% acrilamida
354 mM Tris HCl pH 8,8
0,1% SDS
0,05% TEMED²⁶
0,05% persulfato amónico (PSA)²⁷

Se sitúa en la parte inferior. En cuanto está polimerizado se añade el siguiente gel:

²⁴ 10000G= 11500rpm

²⁵ SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*.

²⁶ TEMED: Iniciador de la reacción.

²⁷ PSA: Catalizador de la reacción.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **gel empilador** -tampón upper- de pH 6,8 donde las proteínas se preparan para el desplazamiento -gel stacking-:

3% acrilamida
0,08% bis-acrilamida
125 mM Tris-HCl pH 6,8
0,1% SDS
0,1% TEMED
0,15% persulfato amónico

Antes de cargar las muestras en el gel se tratan con tampón de carga -tabla XXII-. Se hierven las muestras 5 min a 95°C y se cargan en el gel. Se corre el gel a 100V durante 1h 30min -después de haber solidificado el primer gel y haber puesto el peine antes de solidificar el gel empilador-. El peine sirve para marcar las vías de recorrido de las proteínas para cada dosis y se corre la electroforesis.

Tris HCl	250 mM pH 6.8	0.6 g
SDS	8%	4 g
Glicerol	40%	12 g
Azul de bromofenol	0.05%	10 mg
BME (2mercapto-etanol)		2 ml
H ₂ O dd		25 ml

-tabla XXII: Composición del tampón de carga 4X para proteínas-

3.1-Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF

Después de la electroforesis las proteínas son electrotransferidas mediante la creación de otro campo eléctrico a una membrana de PVDF -Immobilon-P®, Millipore-, durante 30min a 20 voltios y 2h a 60v, a 4°C en tampón de transferencia 1X -tabla XXIII-:

25 mM Tris
192 mM glicina
0,02% SDS
20% metanol

-tabla XXIII: Composición del tampón de transferencia 1X-

También a 20v toda la noche y a 60v 30min.

Realizada la transferencia se realizan 2 comprobaciones:

- 1- Misma cantidad de proteínas en todas las muestras: las membranas se tiñeron con Ponceau S durante 5min -0,5% Ponceau S y 1% de ácido acético- y se destiñen con TBS-T -50mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1% Tween 20-.
- 2- Transferencia correcta, mediante la tinción de los geles con solución de Coomassie -0,25% azul de Coomassie G-250, 45% metanol y 10% ácido acético- durante 10min que después se destiñeron con solución desteñidora -5% metanol y 7,5% ácido acético-.

A partir de este momento los geles ya no tienen ninguna función y en cambio la membrana de transferencia va a permitir la identificación de las proteínas mediante los anticuerpos específicos -tabla XXIV- para las proteínas de estudio.

Acs primarios:

Colágeno $\alpha 1$ tipo I: Ac policlonal hecho en cabra. La dilución de trabajo es 1:100 en 5% LP/TBS-T (Santa Cruz Biotechnology)

TGF β_1 : Ac policlonal hecho en cabra. La dilución de trabajo es 1:100 en 5% LP/TBS-T (Santa Cruz Biotechnology)

Actina: Ac policlonal hecho en cabra. La dilución de trabajo es 1:100 en 5% LP/TBS-T (Santa Cruz Biotechnology)

Acs secundarios:

Rabbit anti-goat-HRP: dilución de trabajo 1:1000 en 5% LP/TBS-T (DAKO)

-tabla XXIV: Acs utilizados en la membrana del Western-Blott. Para los Acs secundarios se suelen emplear Acs obtenidos inoculando en la especie productora Ig de la especie a detectar: Acs-antiespecie o fragmentos Fab₂. En ocasiones las proteínas A y G se utilizan como Acs secundarios, se obtienen de la pared celular de las bacterias y se unen a la región Fc de los Acs-

3.2-Western Blot

Se procede al estudio de la expresión de estas proteínas que participan de una forma importante en la patogenia del AGIF. Se elige el colágeno para observar los efectos de la inducción farmacológica a nivel de proteína.

Se realiza una extracción proteica después del tratamiento de los fibroblastos con distintas dosis de los 3 fármacos inductores para el estudio de un Western-Blot utilizando Acs específicos para el colágeno. Esta técnica requiere Acs que se unirán a las proteínas después de la transferencia a la membrana. La membrana es previamente bloqueada²⁸ con 5% de leche en polvo disuelta²⁹ en TBS-T (5%LP/TBS-T) durante 1h a temperatura ambiente y después se deja incubando con el Ac 1° diluido en 5%LP/TBS-T durante toda la noche a 4°C. Tras lavar la membrana 3 veces con 5%LP/TBS-T, se incubó con el Ac 2° correspondiente conjugado con peroxidasa (HRP)³⁰ y de mayor sensibilidad, diluido 1000 veces en 5%LP/TBS-T, durante 1h a temperatura ambiente. A continuación se lavó la membrana 3 veces con TBS-T y se reveló con ECL -tabla XXIV-.

4-Cuantificación de la expresión del mRNA de colágeno, TGFβ y colagenasa mediante PCR a tiempo real (Real Time-PCR)

Con la detección del mRNA se observa la transcripción génica para la posterior traducción en proteínas³¹. Mediante la PCR a tiempo real -RT-PCR- y utilizando *primers* específicos se detecta la presencia y cantidad de las mRNAs que participan de forma específica en el desarrollo del AGIF: TGF-β, colágeno y colagenasa.

²⁸ El *bloqueo* es necesario para evitar la unión no específica a la membrana en la inmunodetección con la aparición de falsos positivos.

²⁹ Leche desnatada al 5% en TBS, es económica y se deteriora con rapidez.

³⁰ HRP: Peroxidasa de rábano.

³¹ Se distinguen 2 RT-PCR: la primera permite una transcripción inversa de tal modo que a partir de RNA se obtenga DNA. Este DNA -cDNA- tiene la característica de disponer en toda su secuencia de información genética y no aparecen zonas sin información -"intrones"- a diferencia de lo que ocurre en el DNA genómico. La segunda, conocida como PCR cuantitativa -Real Time PCR-, tiene la función de cuantificar el cDNA mediante la amplificación de la primera copia para poder detectarlo. Cada amplificación coincide con un ciclo a una temperatura determinada. La detección se realiza por fluorescencia, de tal modo que cuantos más ciclos mayor será la fluorescencia y en consecuencia más exactitud en la cuantificación. Aproximadamente hasta el ciclo n° 20 no se llega a valorar con precisión la cantidad.

Los elementos necesarios para la transcripción inversa y la amplificación del cDNA son DNA polimerasas y *primers* específicos.

4.1-Preparación de las placas

Se preparan 11 placas de 150 mm de diámetro con 500.000 células/20 ml para realizar diferentes tratamientos a las células para su posterior análisis por RT-PCR. A las 24 horas se retira el medio de cultivo y se añade medio sin SFB. Se ponen diferentes condiciones de estudio en cada placa durante 72 horas -tabla XXV-:

placas	
1.	sin inducción
2.	PHT 15 nM
3.	PHT 35 nM
4.	PHT 15 μ M
5.	PHT 35 μ M
6.	Nf 40 nM
7.	Nf 80 nM
8.	Nf 1 μ M
9.	Nf 13 μ M
10.	Cs 300 ng/ml
11.	Cs 700 ng/ml

-tabla XXV: Condiciones de dosis de cada placa-

4.2-Extracción del RNA

Pasadas las 72 horas se aspira el medio de las placas y se añade 1 ml de trizol en cada una. Se desenganchan las células de las placas con rascadores y se pasan a un eppendorf. A continuación se añaden 200 μ l de cloroformo y se agita vigorosamente -trizol y cloroformo permiten la desadherencia y la extracción del RNA-. Se deja reposar 2-3 minutos y se centrifuga a 10000G durante 30 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se forman 2 fases: se toma la que queda en la parte superior como sobrenadante y se pasa a un eppendorf nuevo. Se añaden 500 μ l de isopropanol³² y se deja que precipite el RNA a -80°C durante 10h.

³² El isopropanol precipitará el RNA.

A las 24h se centrifuga a 10000G durante 30 minutos a 4°C. Se resuspende el *pellet* de células -RNA total- con 1 ml de etanol al 70%-DePC-H₂O³³ y se vuelve a centrifugar a 10000G durante 15 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se deja secar el *pellet*. Una vez seco se añaden 20-30µl de DePC-H₂O y se guardan las muestras en la nevera a -20°C.

4.3-Cuantificación del RNA

De cada muestra se prepara una dilución 1/500 en H₂O y se mide la absorbancia a 260nm en el espectrofotómetro. Para calcular la concentración de RNA se aplica la siguiente fórmula:

$$[\text{RNA}] = \text{Abs}_{260} \times \text{factor de dilución} \times 10^{-3} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4.4-Visualización de la calidad del RNA mediante gel de agarosa

Mediante este gel se comprueba la calidad del RNA obtenido en la extracción. Se añaden 0,5 g de agarosa en 41,2 ml de H₂O autoclavada y se calienta en microondas hasta que hierva. En agitación se añaden 5 ml de MOPS³⁴ 10X y 3,75 ml de 12,3M formaldehído. Se pone en el molde para hacer el gel, se coloca el peine y se deja que se solidifique. Una vez solidificado se saca el peine y se coloca el gel en la cubeta de electroforesis con tampón MOPS 1X.

Para la preparación de las muestras se necesita 1µg de RNA. Se añadirá tampón de carga 5X que contiene bromuro de etidio³⁵. Se añade H₂O hasta un volumen final de 10µl. Calentamos las muestras a 70°C durante 5 minutos y después se ponen en hielo 1 minuto. Se cargan las muestras en el gel y se corre a 80V durante 2 horas -tabla XXVI-.

³³ H₂O contenida en el etanol está tratada en DePC para evitar la contaminación de las RNAsas.

³⁴ MOPS: 3-(N-Morpholino) propanesulfonic ácido.

³⁵ Se intercala entre las bases del RNA. Sirve para que el RNA se visualice bajo la luz ultravioleta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Solución acuosa saturada de azul de bromofenol	3.2 μ l
0.5 M EDTA pH 8.0	16 μ l
Formaldehído 37%	144 μ l
Glicerol 100%	400 μ l
Formamida	616.8 μ l
10X MOPS	800 μ l
DePC-H ₂ O	20 μ l
Bromuro de etidio	10-20 μ l

-tabla XXVI: Composición del tampón de carga 5X para RNA-

4.5-Transcripción inversa -RT-

Para cada muestra se prepara -tabla XXVII-:

50 mM MgCl ₂ ³⁶	1.5 μ l
Tampón 10X	5.0 μ l
2.5 mM dNTP ³⁷	4.0 μ
50 μ M <i>Random hexamers</i> ³⁸	2.5 μ l
MuLV transcriptasa inversa ³⁹	1.0 μ l
H ₂ O	26.0 μ l
Muestra	10 μ l

-tabla XXVII: Componentes de la reacción de retrotranscripción (RT)-

A 1 μ g de RNA se añadirá H₂O hasta un volumen final de 10 μ l. Debe estar desnaturalizado calentándolo a 65°C durante 5 minutos y después se deja en hielo 1 min -desnaturalización del RNA-.

Una vez preparadas las muestras, se colocan en el termociclador con las siguientes condiciones: 42°C 25 min, 94°C 5 min y 4°C mínimo 5 min. Después se guardan las muestras a -20°C.

³⁶ MgCl₂: Actúa con la polimerasa para la reacción en cadena.

³⁷ NTP: Nucleótidos para constituir la cadena de DNA.

³⁸ De forma randomizada acoplan secuencias de nucleótidos.

³⁹ Polimerasa inversa para la síntesis.

4.6-Control de la reacción de retrotranscripción

Para comprobar si la reacción de retrotranscripción se ha realizado correctamente se hace una PCR para amplificar el gen *GAPDH*. Para cada muestra se prepara -tabla XXVIII-:

50 mM MgCl ₂	1.5 µl
Tampón 10X	5.0 µl
2.5 mM dNTP	4.0 µl
10 µM <i>primer forward</i> ⁴⁰ (sentido)	1.0 µl
10 µM <i>primer revers</i> (antisentido)	1.0 µl
Taq polimerasa	0.5 µl
H ₂ O	32.0 µl
cDNA	5.0 µl

-tabla XXVIII: Composición para la muestra control-

El programa de la PCR en este caso es:

94°C	1 minuto	} 30 ciclos
94°C	1 minuto	
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	
4°C		

Con el resultado de la PCR se corre un gel de agarosa al 1% en TAE⁴¹ para comprobar que se ha producido la amplificación de la *GAPDH*, y por tanto, que la reacción de retrotranscripción ha funcionado.

4.7-PCR cuantitativa RT-PCR

Se utilizan los *assays on demand* (aod) -A. Biosystems que contiene los *primers* y sonda específica de cada gen de estudio- de colágeno I, TGF-β1, colagenasa I y *GAPDH* -que se utiliza como control-. Para cada uno de los *assays* se preparan:

⁴⁰ Son *primers* específicos.

⁴¹ TAE: 0,04M Tris-acetato/0,001M EDTA pH 8,0.

MATERIAL Y MÉTODOS

	<u>1 reacción</u> ⁴²
25X Universal Master Mix ⁴³	25 μ l
20X <i>assay on demand</i> ⁴⁴	2.5 μ l
-colágeno I: HS 00233958_M1	
-GAPDH: HS 99999905_M1	
-colagenasa: HS 00164004_M1	
-TGF β : HS 00164004_M1	
H ₂ O	19.5 μ l

Para rellenar la placa de 96 pocillos:

Se reparten 47 μ l de la mezcla que contiene el *assay on demand* del gen de interés -colágeno I- en los doce pocillos de la fila A. Se añaden 3 μ l de cDNA en cada pocillo en el siguiente orden -tabla XXIX, figura 5-:

columnas	
1. Sin inducción	= aod + muestra DNA
2. PHT 15 nM	} aod+muestra+fármaco
3. PHT 35 nM	
4. PHT 15 μ M	
5. PHT 35 μ M	
6. Nf 20 nM	
7. Nf 40 nM	
8. Nf 1 μ M	
9. Nf 13 μ M	
10. Cs 300 ng/ml	
11. Cs 700 ng/ml	
12. H ₂ O	= aod + H ₂ O

-tabla XXIX: Distribución de los fármacos por rangos y dosis según la placa de RT-PCR-

De los 50 μ l totales que se tienen en cada pocillo, se pasan 25 al pocillo de la fila B, para tener los resultados por duplicado.

Se realiza el mismo proceso con el resto de mezclas, colocando el *assay on demand* de TGF- β 1 en las filas C y D, colagenasa en las filas E y F, y GAPDH en las filas G y H.

⁴² Se multiplican estos valores por el número de muestras: Hay 11 muestras y un control negativo en el que se pondrá H₂O.

⁴³ Contiene MgCl₂, tampón y nucleótidos.

⁴⁴ También contiene la DNA polimerasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I
B	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I	colágeno I
C	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1
D	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1	TGF- β 1
E	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-
F	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-	MMP-1 -colagenasa-
G	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH
H	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH

-figura 5: Placa de RT-PCR para los diferentes genes: colágeno I, TGF- β ₁, MMP-1 y el gen normalizador GAPDH-

- colágeno I
- TGF- β 1
- MMP-1 -colagenasa-
- GAPDH

Finalmente, se tapa la placa con un film y se centrifuga antes de introducirla en el termociclador. El programa que se utiliza es:

-10 min a 95°C
-40 ciclos: 15 sg 95°C
1 min 60°C

5-Análisis estadístico

Aplicación del test de Wilcoxon para el estudio comparativo de las muestras pareadas en la viabilidad celular. La prueba de la U de Mann-Whitney la utilizamos en la comparación de los resultados de la PCR en la transcripción génica. Se aplica el programa SPSS por windows versión 13 con licencia UB. El nivel de significación considerado es que $p \leq 0.05$.

F-RESULTADOS

RESULTADOS

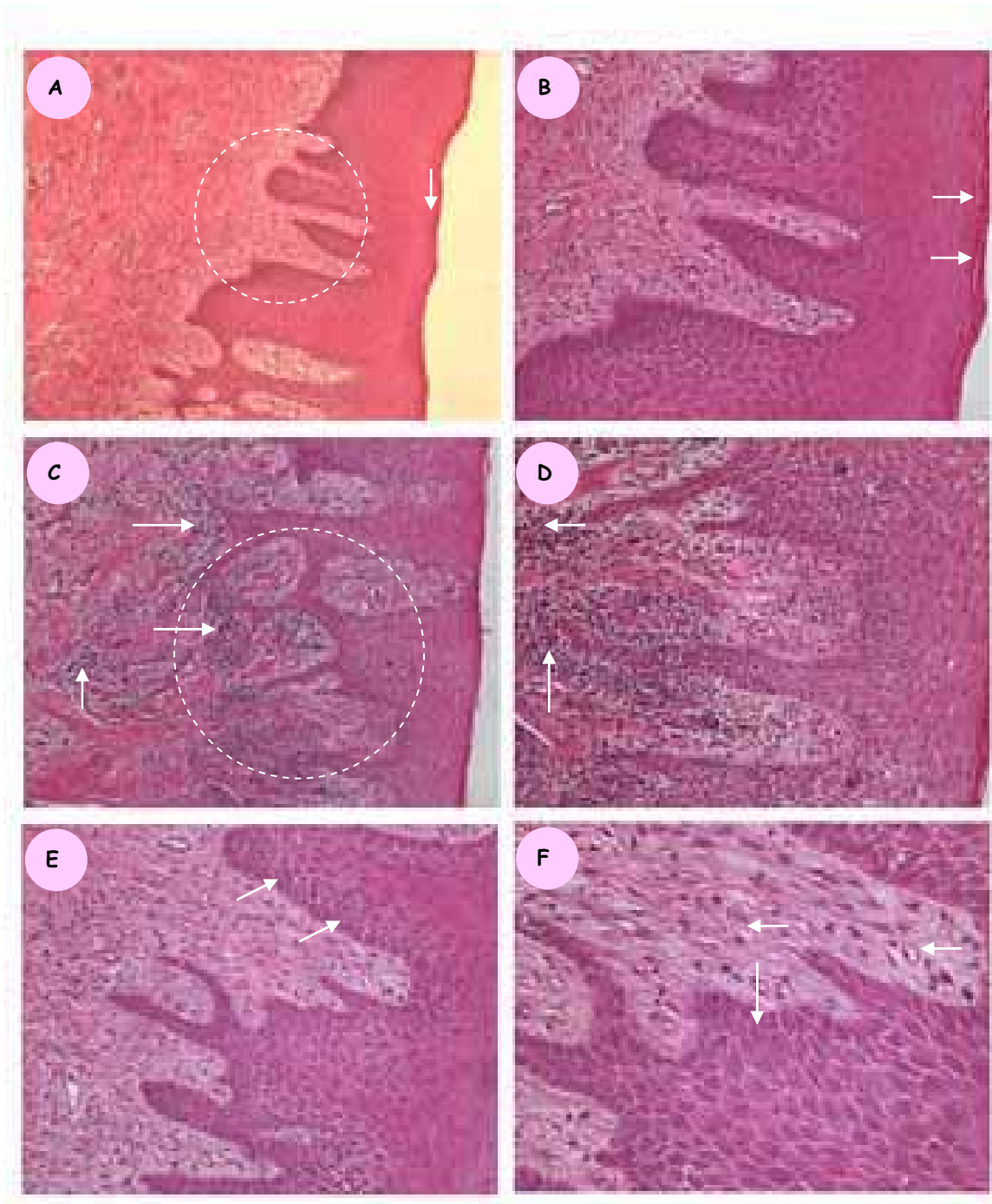
Se estructuran los resultados del estudio en función de los objetivos señalados y según el desarrollo correlativo de los procesos realizados en el laboratorio a partir de las muestras gingivales. La exposición se inicia con la descripción histológica del tejido gingival. En el primer apartado se examinan las secciones de la muestra de encía sana -figura 1- y posteriormente se describen las características morfológicas de la muestra del Agrandamiento gingival -figura 2-.

A continuación se analiza el establecimiento y propagación del cultivo primario por los fibroblastos de las muestras -figura 3-, los resultados de las viabilidades de los fibroblastos sometidos a los fármacos inductores -figuras 4-12 y tablas XXX-XXXVIII, la transcripción génica de las proteínas TGF β , colágeno y colagenasa -figuras 13-15 y tablas XXXIX-XLI- y finalmente la traducción proteica del colágeno -figura 16- estos procesos también por influencia de la inducción farmacológica.

1-Estudio histológico de muestras de encía humana

Las secciones de encía humana correspondientes a las muestras de encía sana no sometida a ningún tratamiento farmacológico y sin ninguna patología, fueron fijadas en formaldehído al 4%, deshidratadas e incluidas en parafina. En ellas se puede apreciar una queratosis discreta observada en la capa córnea con algunos núcleos celulares -zonas de paraqueratinización- - figura 1 imágenes A, B-. El estrato basal presenta poca interdigitación con la lámina propia; y las crestas epiteliales que aparecen son cortas y no tan homogéneas como la imagen histopatológica del Agrandamiento gingival (AG) -figura 1 imágenes A, C; figura 2 imágenes A, C, E-. El infiltrado inflamatorio es denso - figura 1 imágenes C, D- con la presencia de linfocitos -figura 1 imagen F-. Estas características no corresponden a una muestra de encía sana en su totalidad debido a su grado de inflamación, aunque sí destacan de las imágenes de la muestra del AG -figura 2-. Las células basales tienen un aspecto poliédrico o cuboide por encima de la membrana basal -figura 1 imágenes E, F-.

RESULTADOS

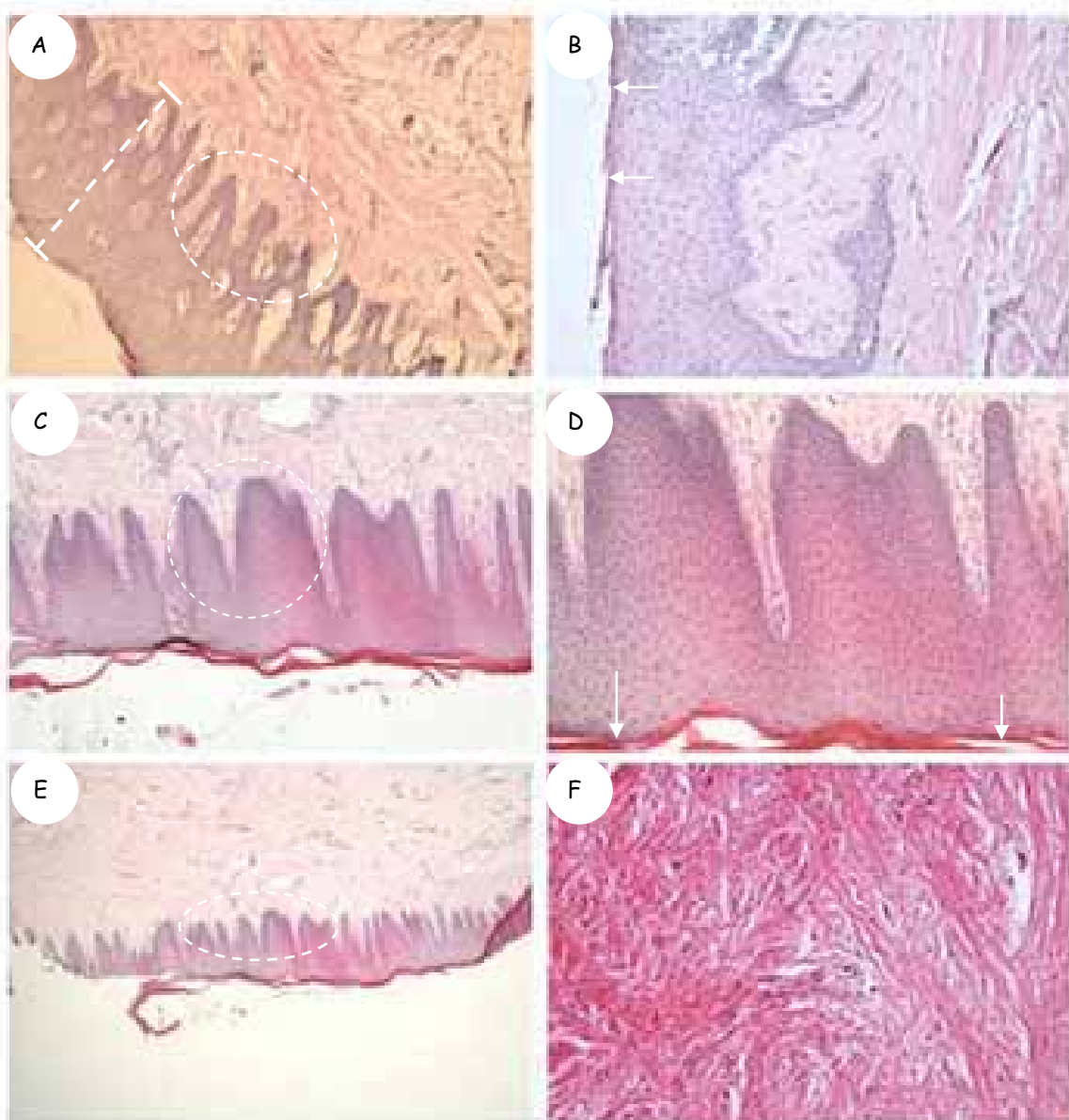


-figura 1: Imágenes de microscopía óptica de la muestra de encía humana sana **A**: Se observan las características generales del epitelio y del conectivo. X100. **B**: Detalle de A en el que se aprecian núcleos celulares y las crestas epiteliales que se interdigitan en el conectivo. X200. **C**: Otra zona del tejido donde se visualiza la interdigitación -círculo- y células inflamatorias. X100. **D**: Detalle de C, con infiltrado inflamatorio más evidente -flechas-. X200. **E**: Se observa el límite de los 2 tejidos y las células basales cuboides del epitelio. X200. **F**: Detalle de E donde se aprecian las características celulares del estrato basal y de la sustancia intercelular con linfocitos en la lámina propia. X400. Todos los aumentos de las secciones son originales-

RESULTADOS

Las imágenes histopatológicas de la muestra de AG corresponden a secciones de entre 3-5 μ m, fijada en formaldehído al 4%, deshidratada y montada en parafina. Presentan un patrón típico de AG: acantosis con paraqueratosis epitelial -figura 2 imágenes A, B, C- al observar un epitelio de mayor grosor con núcleos celulares en la capa córnea; crestas epiteliales más elongadas y estrechas en el conectivo quedando una morfología más homogénea en la sinuosidad -figura 2 imágenes A, C, D, E- y fibrosis colagénica más acentuada -figura 2 imágenes C, D, E, F- que las secciones observadas de la muestra de encía sana. No se aprecian diferencias en el número y tamaño de los fibroblastos ni un infiltrado inflamatorio evidente en el conectivo.

RESULTADOS



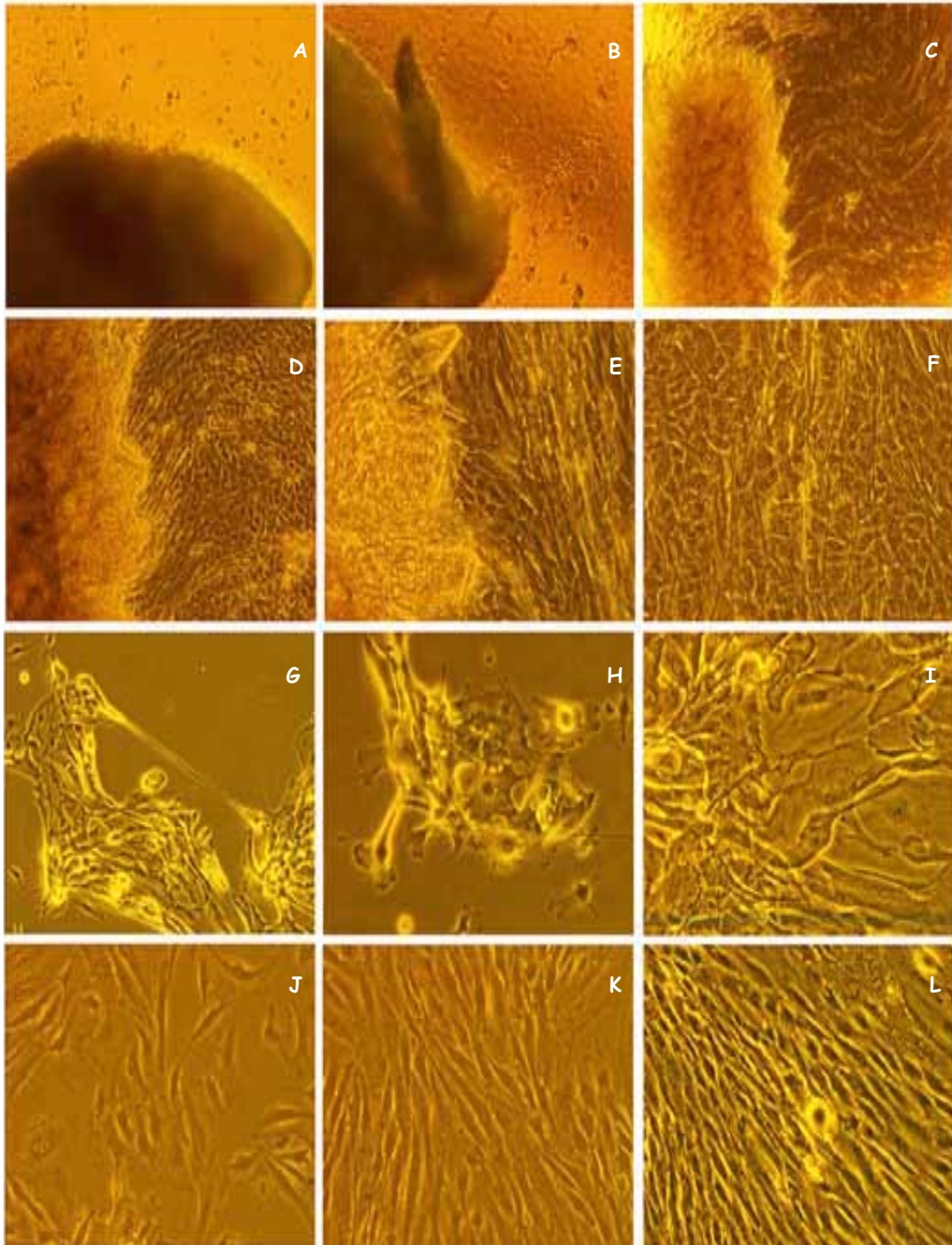
-figura 2: Imágenes de microscopía óptica de encía de paciente sometido a terapia con ciclosporina
A: Aspecto general de la histología de la encía. X100. **B:** Se destaca que el epitelio estratificado muestra unas crestas epiteliales alargadas que se interdigitan con las papilas conectivas de la lámina propia y que son un signo de agrandamiento gingival. X200. **C:** Epitelio acantótico con la capa córnea queratinizada, unas crestas epiteliales muy profundas y un conectivo con fibras conectivas. X100. **D:** Detalle de la imagen anterior a mayor número de aumentos. X200. **E:** Imagen general de sección en la que se observan las invaginaciones de la capa basal del epitelio en contacto con el conectivo subyacente. X40. **F:** Se aprecia el elevado componente fibroso de la lámina propia, muy característico del AG y que probablemente son haces de fibras de colágeno. X200. Todos los aumentos de las secciones son originales-

2-Establecimiento de cultivos primarios a partir de muestras de encía humana

Entre ambos orígenes de fibroblastos -tejido gingival sano y AG- -figura 3- no se apreciaron diferencias sustanciales en el comportamiento y crecimiento celular entre ambos cultivos.

Las primeras células en migrar del tejido fueron las epiteliales, durante los primeros 2-3 días, en cuanto el tejido tuvo adherencia. Posteriormente los fibroblastos siguieron la migración hacia otras zonas de la placa, también para adherirse y proliferar. Su crecimiento era lento con una morfología muy variada. En días sucesivos se observaba mayor número de fibroblastos adheridos con una propagación más uniforme en todo el fondo de la placa y configurando una sola capa celular. La proliferación celular permitió el aumento de densidad de la población con mayor proximidad celular hasta llegar al contacto de las membranas. A partir de esta confluencia se produciría la diferenciación con una morfología de los fibroblastos más uniforme. Sobre el 20º día de cultivo, la confluencia celular en las placas se acercaba al 100%, y se procedió a congelar una fracción de fibroblastos; la otra fracción se utilizó para el estudio de las viabilidades celulares, sometiendo a los fibroblastos a los fármacos inductores fenitoína, nifedipina y ciclosporina.

RESULTADOS



-figura 3: Fibroblastos y células epiteliales procedentes del explante de encía de paciente sometido a tratamiento con ciclosporina. **A, B:** En los tres primeros días se observa una migración de las células epiteliales a partir de la adherencia del tejido en el fondo de la placa. **C, D, E:** En días sucesivos siguen los fibroblastos del explante a separarse y migrar hacia otras zonas de la placa para adherirse e iniciar el proceso de relación con el entorno. **F, G, H, I:** Cambios morfológicos, diferenciación, proliferación y confluencia con otros fibroblastos -día 15-. **J, K, L:** Los fibroblastos confluentes son capaces de diferenciarse y mantenerse en monocapa habiendo duplicado su número a las 24 h -día 20-

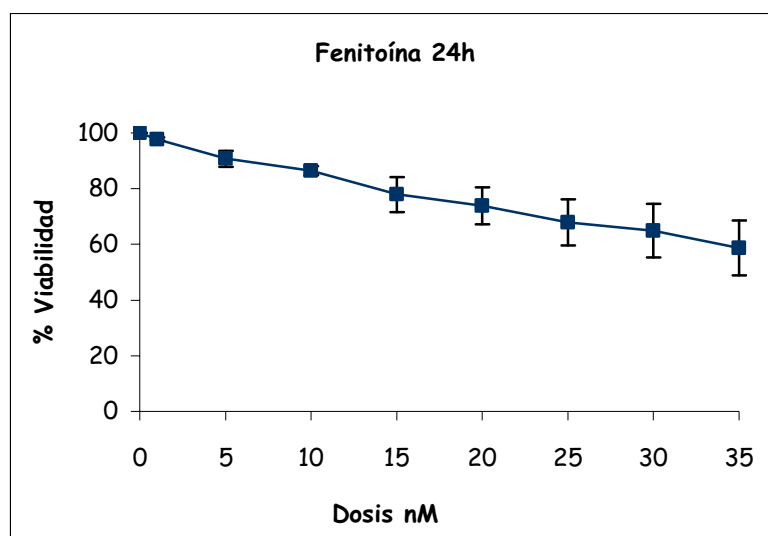
RESULTADOS

3-Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la viabilidad celular de cultivos primarios obtenidos a partir de muestras de encía humana

Se exponen primero los resultados de los fibroblastos de encía humana sana y a continuación los correspondientes a encía humana con AG en los rangos de dosis establecidas.

3.1-Inducción de fenitoína en fibroblastos de encía sana

La viabilidad de los fibroblastos fue disminuyendo al ir aumentando las dosis nM de fenitoína -figura 4A y tabla XXXA-:



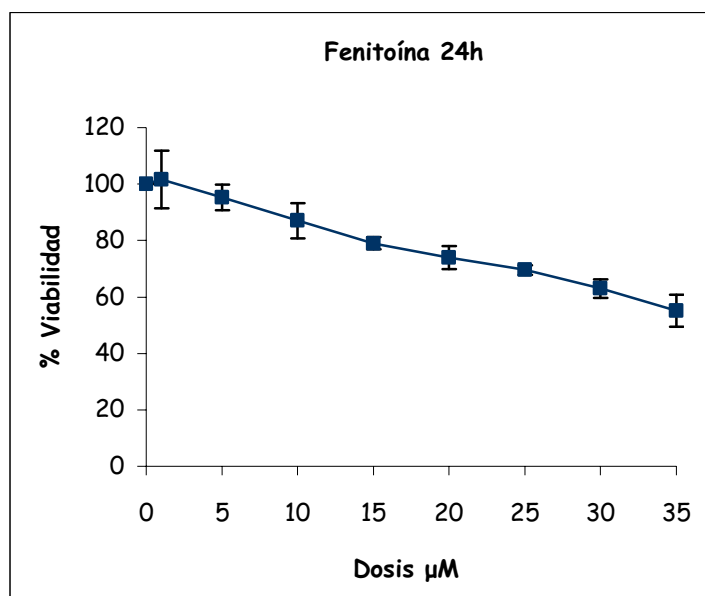
-figura 4A: Diagrama del efecto de la fenitoína sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. Desviaciones estandar con su margen de variabilidad para cada dato-

nM	0	1	5	10	15	20	25	30	35
V	100.0	97.74	90.78	86.50	77.88	73.91	67.92	64.90	58.75
δ	0.00	0.56	2.86	1.62	6.36	6.67	8.29	9.62	9.79

-tabla XXXA: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango nM especificadas por columnas. Se observan también los valores de las desviaciones estandar (δ)-

RESULTADOS

También la administración de fenitoína a un rango de dosificación μM permitió un descenso de la viabilidad directamente proporcional al aumento progresivo de las dosis -figura 4B y tabla XXXB-.



-figura 4B: Diagrama del efecto de la fenitoína sobre la proliferación de fibroblastos en célula humana. En abscisas las dosis en rango μM , en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. Desviaciones estandar con su margen de variabilidad para cada dato-

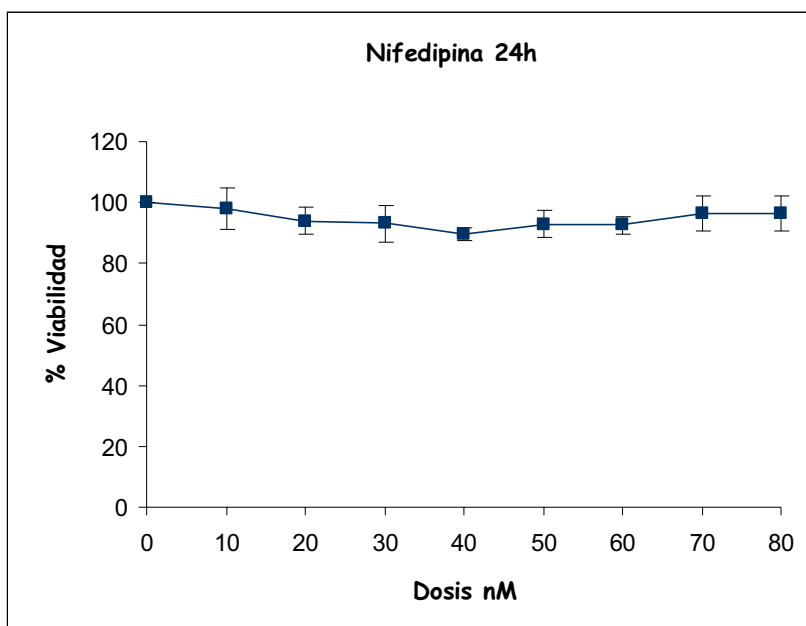
μM	0	1	5	10	15	20	25	30	35
V	100.0	101.66	95.33	87.01	79.02	74.02	69.58	62.96	55.02
δ	0.00	10.13	4.51	6.29	2.21	4.08	1.68	3.26	5.66

-tabla XXXB: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango μM especificadas por columnas. Se observan también los valores de las desviaciones estandar (δ)-

RESULTADOS

3.2-Inducción de nifedipina en fibroblastos de encía sana

Con la administración de nifedipina en el medio de cultivo no se observó a las 24h ninguna variación significativa en la proliferación celular en el rango de dosis nM en relación con el aumento de las dosis del fármaco -figura 5A y tabla XXXIA-.



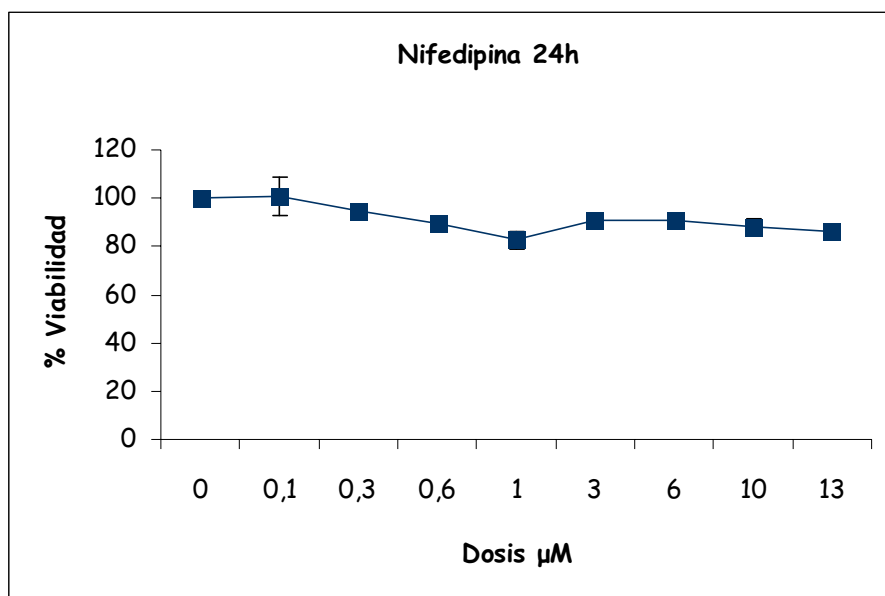
-figura 5A: Diagrama del efecto de nifedipina sobre la proliferación de fibroblastos de encía humana. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. Desviaciones estandar con su margen de variabilidad para cada dato-

nM	0	10	20	30	40	50	60	70	80
V	100.00	97.75	93.94	93.09	89.64	92.91	92.51	96.59	96.40
δ	0.00	6.82	4.43	5.91	1.90	4.55	2.81	5.76	5.99

-tabla XXXIA: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de nifedipina a unas dosis de rango nM especificadas por columnas. Se observan también los valores de las desviaciones estandar (δ)-

RESULTADOS

Con el rango de dosis μM de nifedipina a las 24h se observó una discreta variación en la viabilidad celular del cultivo con tendencia a la reducción de la proliferación al aumentar las dosis -figura 5B y tabla XXXIB-:



-figura 5B: Diagrama del efecto de nifedipina sobre la proliferación de fibroblastos de encía humana. En abscisas las dosis en rango μM , en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. Desviaciones estandar con su margen de variabilidad para cada dato-

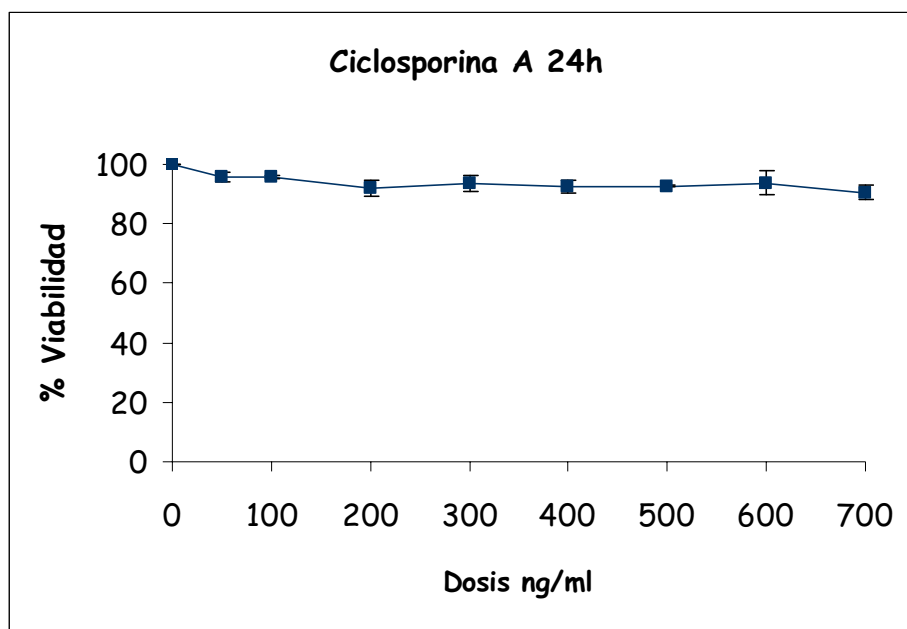
μM	0	0.1	0.3	0.6	1	3	6	10	13
V	100	100.8	94.50	89.42	82.81	90.97	90.73	88.11	85.90
δ	0.00	8.08	2.59	3.01	3.60	0.40	0.99	3.16	1.71

-tabla XXXIB: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de nifedipina a unas dosis de rango μM especificadas por columnas. Se observan también los valores de las desviaciones estandar (δ)-

RESULTADOS

3.3-Inducción de ciclosporina en fibroblastos de encía sana

Finalmente la administración de ciclosporina tampoco produjo cambios significativos en la viabilidad celular en todo el espectro de variación de dosis crecientes progresivas -figura 6 y tabla XXXII-:



-figura 6: Diagrama del efecto de ciclosporina sobre la proliferación de fibroblastos de encía humana. En abscisas las dosis en ng/ml, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. Desviaciones estandar con su margen de variabilidad para cada dato-

ng/ml	0	50	100	200	300	400	500	600	700
V	100.0	95.56	95.68	92.15	93.31	92.42	92.68	93.68	90.57
δ	0.00	1.50	0.76	2.74	2.66	2.05	0.17	4.07	2.50

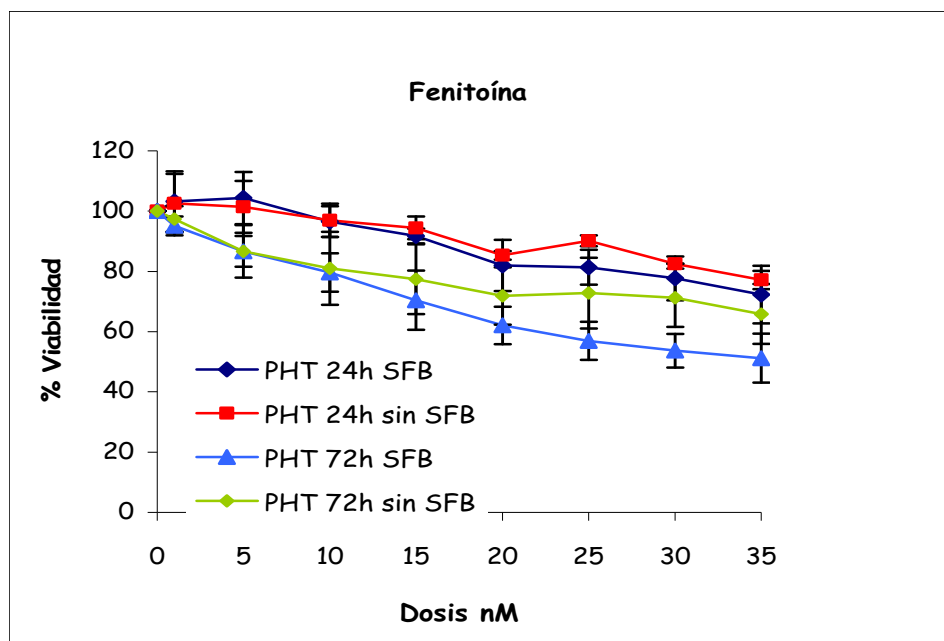
-tabla XXXII: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de ciclosporina a unas dosis de ng/ml especificadas por columnas. Se observan también los valores de las desviaciones estandar (δ)--

La proliferación de los fibroblastos del paciente que ha mostrado ser sensible a la acción de ciclosporina y estudiada mediante la técnica de MTT no mostró tampoco un aumento mayor del 100% al inducir con los 3 fármacos *in vitro*.

RESULTADOS

3.4-Inducción de fenitoína en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival

Se comprobaron las viabilidades de los fibroblastos en 2 rangos distintos de dosis nM y μ M. Se distinguieron 4 condiciones según el tiempo de inducción -24h y 72h- y si había presencia de suero fetal bovino (SFB) como fuente de factores de crecimiento -figura 7A, y tabla XXXIIIA-:



-figura 7A: Diagrama del efecto de fenitoína (PHT) sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana en 4 condiciones. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis-

nM	0	1	5	10	15	20	25	30	35
24h SFB	100.0	103.1	104.3	96.50	91.75	81.94	81.38	77.69	72.34
δ	0	10.02	8.63	5.1	2.45	8.5	5.8	7.23	9.55
24h noSFB	100.0	102.61	101.3	96.99	94.44	85.35	90.18	82.53	77.16
δ	0	9.71	8.61	5.52	3.79	1.41	1.82	0.06	2.99
72h SFB	100.0	95.14	86.67	79.65	70.43	62.11	56.94	53.71	51.23
δ	0	3.13	5.13	6.41	9.84	6.22	6.31	5.56	8.12
72h noSFB	100.0	97.39	86.63	81.04	77.43	71.86	72.81	71.21	65.87
δ	0	4.22	8.73	12.08	11.57	9.53	11.71	9.66	9.92

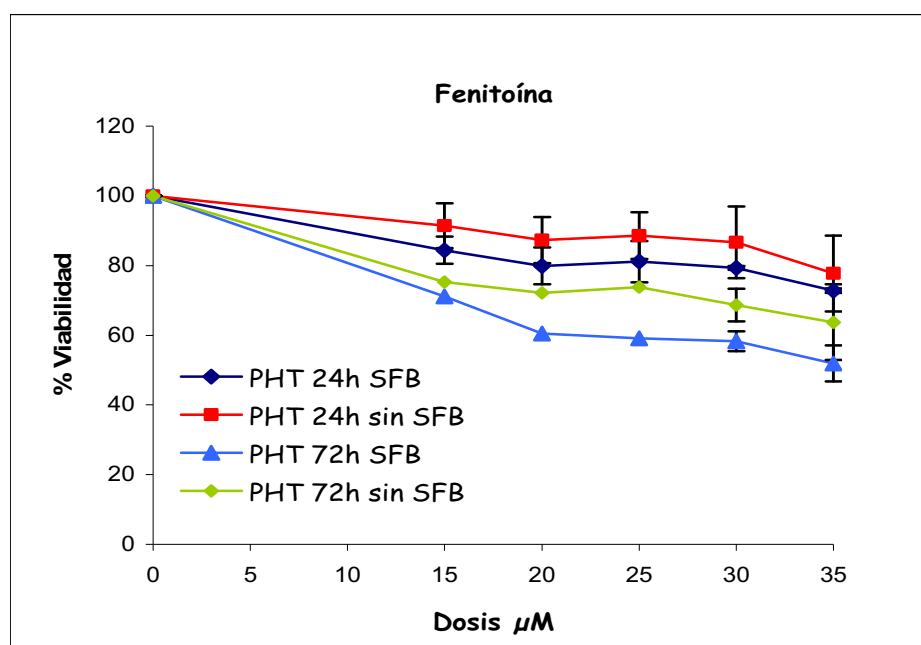
-tabla XXXIIIA: Valores de viabilidad sobre el 100% de los fibroblastos, obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango nM especificadas por columnas y sometidos a las 4 condiciones. Se contemplan las desviaciones estandar (δ) de cada media de viabilidad a las dosis establecidas-

En el rango nM, el aumento progresivo de las dosis provocaba una disminución continuada significativa del porcentaje de viabilidad (24h

RESULTADOS

p=0,008, test de Wilcoxon) que fue más intensa en el mayor tiempo de exposición -72h- y en presencia de SFB (72h p=0,008, test de Wilcoxon). En la condición de tiempo de inducción y dosis de fenitoína, la presencia de SFB se asoció a una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa a las 72h (p=0,017).

Los valores de las viabilidades celulares obtenidas para el rango μM reflejaron un descenso continuado significativo, de la replicación celular por aumento progresivo de las dosis en las condiciones consideradas de tiempo de inducción (24h p=0,028 y 72h p=0,028, test de Wilcoxon) con independencia de la presencia de SFB -figura 7B y tabla XXXIIIB-:



-figura 7B: Diagrama del efecto de fenitoína (PHT) sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana en 4 condiciones. En abscisas las dosis en rango μM , en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis-

μM	0	15	20	25	30	35
24h SFB	100	84.41	79.91	81.12	79.3	72.83
δ	0	3.92	5.26	5.93	0.54	0.62
24h noSFB	100	91.44	87.32	88.59	86.68	77.74
δ	0	6.45	6.62	6.7	10.27	10.9
72h SFB	100	71.19	60.51	59.09	58.33	51.91
δ	0				2.86	5.18
72h noSFB	100	75.32	72.17	73.79	68.68	63.74
δ	0				4.72	10.9

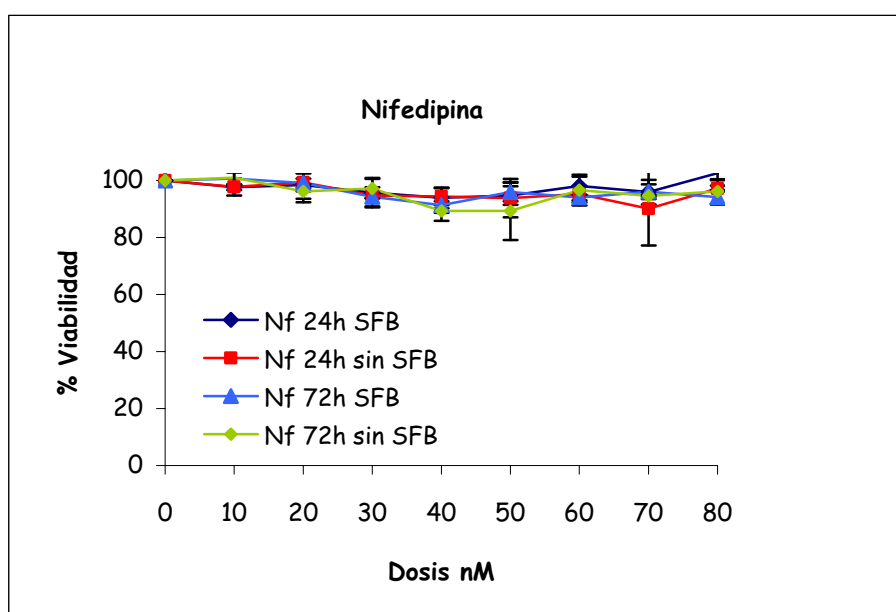
-tabla XXXIIIB: Valores de viabilidad sobre el 100% de los fibroblastos, obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango μM especificadas por columnas y sometidos a las 4 condiciones. Se contemplan las desviaciones estandar (δ) de cada media de viabilidad a las dosis establecidas-

RESULTADOS

De las condiciones, la que produjo mayor reducción de viabilidad celular fue un tiempo de inducción de 72h con SFB ($p=0,043$, test de Wilcoxon).

3.5-Inducción de nifedipina en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival

Para el rango de dosis nM, el efecto inductivo produjo una estabilidad en la proliferación celular de alrededor del 100%, sin cambios sustanciales en ninguna condición y con independencia de las dosis en las condiciones consideradas -figura 8A y tabla XXXIVA-:



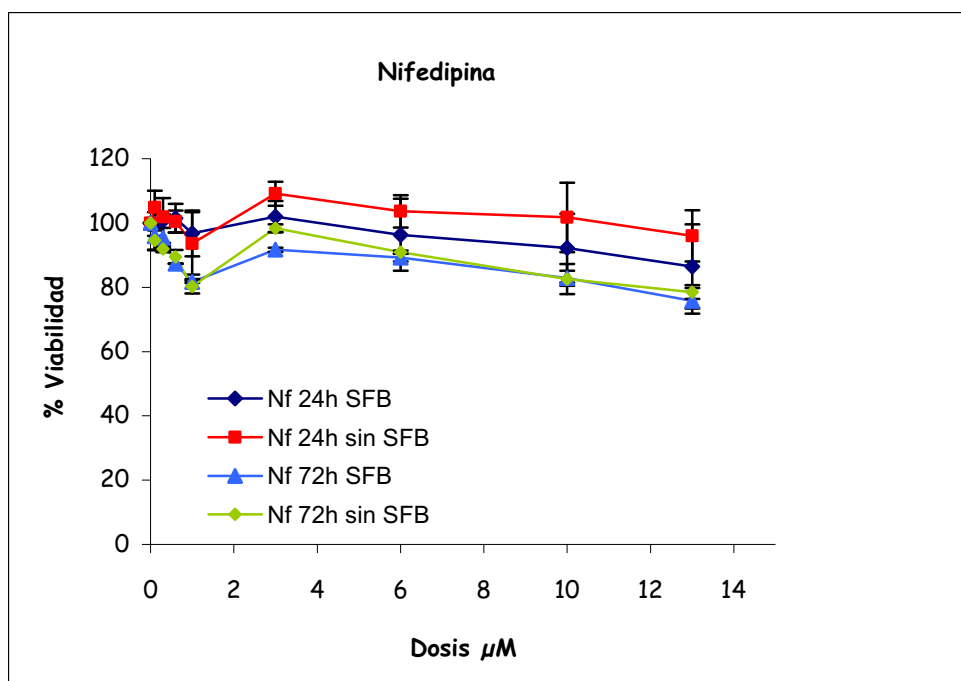
-figura 8A: Diagrama del efecto de nifedipina (Nf) sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana en 4 condiciones. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis-

nM	0	10	20	30	40	50	60	70	80
24h SFB	100	97.62	98.39	95.75	93.91	94.71	98.12	95.92	102.5
δ	0	0.95	6.01	5.15	3.63	3.26	3.27	4.33	2.42
24h noSFB	100	97.73	99.32	94.68	94.36	93.83	95.26	90.15	97.21
δ	0	2.98	3.19	0.83	2.97	6.77	2.88	13	0.98
72h SFB	100	100.6	99.05	94.28	91.36	95.94	94.06	96.04	94.11
δ	0	2.07	1.65	3.33	2.67	3.25	1.01	2.56	2.5
72h noSFB	100	101.0	96.16	97.15	89.27	89.28	96.61	94.6	96.19
δ	0	2.88	2.62	3.45	3.44	10.16	5.43	0.3	4.24

-tabla XXXIVA: Valores de viabilidad sobre el 100% de los fibroblastos, obtenidos con la inducción de nifedipina a unas dosis de rango nM especificadas por columnas y sometidos a las 4 condiciones. Se contemplan las desviaciones estandar (δ) de cada media de viabilidad a las dosis establecidas. SFB: Suero fetal bovino-

RESULTADOS

La gráfica con los valores de las viabilidades celulares obtenidas con nifedipina para el rango μM no manifestaron cambios sustanciales a dosis bajas salvo las que experimentaban una inducción de 72h con descenso máximo a dosis $1\mu\text{M}$. En dosis superiores se mantuvieron las viabilidades alrededor del 100% en las 4 condiciones con un descenso progresivo a partir de $3\mu\text{M}$ -figura 8B y tabla XXXIVB:



-figura 8B: Diagrama del efecto de nifedipina (Nf) sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana en las 4 condiciones establecidas. En abscisas las dosis en rango μM , en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis-

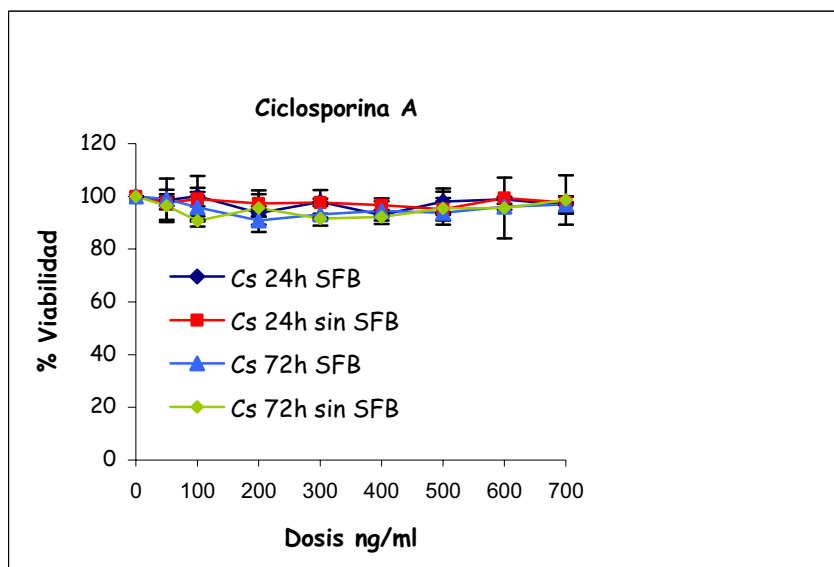
μM	0	0.1	0.3	0.6	1	3	6	10	13
24h SFB	100	99.66	100.7	101.4	96.76	102.0	96.34	92.18	86.48
δ	0	3.66	6.94	4.49	7.11	4.86	11.2	10.73	13.1
24h noSFB	100	104.8	101.8	100.5	93.64	109.1	103.6	101.7	96.02
δ	0	5.16	0.82	3.39	9.7	3.72	5.01	10.8	7.96
72h SFB	100	95.93	95.36	87.37	81.7	91.69	89.23	82.83	75.8
δ	0	4.26	3.15	0.04	0.38	0.63	1.18	2.33	3.98
72h noSFB	100	94.6	91.92	89.43	80.31	98.35	90.94	82.54	78.51
δ	0	3.1	0.96	2.16	2.28	1.27	0.49	4.67	2.11

-tabla XXXIVB: Valores de viabilidad sobre el 100% de los fibroblastos, obtenidos con la inducción de nifedipina a unas dosis de rango μM especificadas por columnas y sometidos a las 4 condiciones. Se contemplan las desviaciones estandar (δ) de cada media de viabilidad a las dosis establecidas-

RESULTADOS

3.6-Inducción de ciclosporina en fibroblastos de encía con Agrandamiento gingival

No se observaron cambios significativos en la viabilidad de los fibroblastos con el rango de dosis al que se sometieron en las distintas condiciones de tiempo -24h, 72h- y medio sin/con suero fetal bovino y los valores se encontraban próximos al 100% -figura 9 y tabla XXXV-.



-figura 9: Diagrama del efecto de ciclosporina (Cs) sobre la proliferación de fibroblastos en encía humana en las 4 condiciones. En abscisas las dosis en ng/ml, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células-

ng/ml	0	50	100	200	300	400	500	600	700
24h SFB	100	98.54	100.1	93.64	97.87	92.9	98.04	98.81	96.71
δ	0	2.26	7.65	7.21	4.47	0.71	4.99	0.1	3.3
24h noSFB	100	97.47	98.95	97.28	97.7	96.72	95.13	99.38	97.71
δ	0	2.4	2.72	4.93	1.43	2.55	4.28	0.49	0
72h SFB	100	98.96	95.87	90.82	93.14	94.49	93.76	96.08	96.91
δ	0	7.81	7.36	1.57	4.18	3.69	0.08	1.05	3.03
72h noSFB	100	96.38	90.76	95.62	91.6	92.24	95.52	95.6	98.63
δ	0	6.16	0.29	0.62	0.33	2.67	6.21	11.55	9.33

-tabla XXXV: Valores de viabilidad sobre el 100% de los fibroblastos, obtenidos con la inducción de ciclosporina a unas dosis de ng/ml especificadas por columnas y sometidos a las 4 condiciones. Se contemplan las desviaciones estandar (δ) de cada media de viabilidad a las dosis establecidas. SFB: Suero fetal bovino-

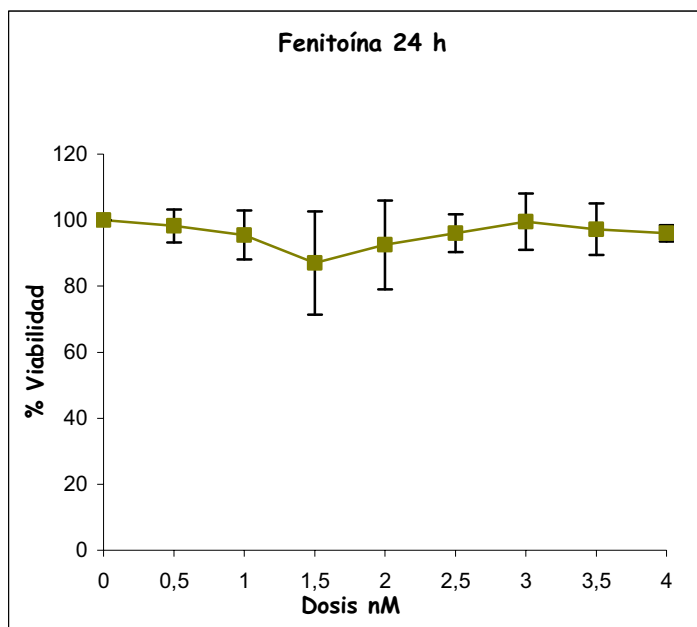
RESULTADOS

4-Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la viabilidad celular de la línea NIH3T3 de ratón

Todos los resultados de la línea NIH3T3 de ratón se observaron a las 24h. En todos los estudios de viabilidad se tomaron grupos de células que no recibieron tratamiento farmacológico y que actuaron como controles.

4.1-Inducción de fenitoína

Viabilidad de los fibroblastos en el rango de dosis nM de fenitoína no permitió observar cambios significativos al aumentar las dosis y la proliferación se mantuvo alrededor del 100%. sin cambios valorables -figura 10A y tabla XXXVIA-.



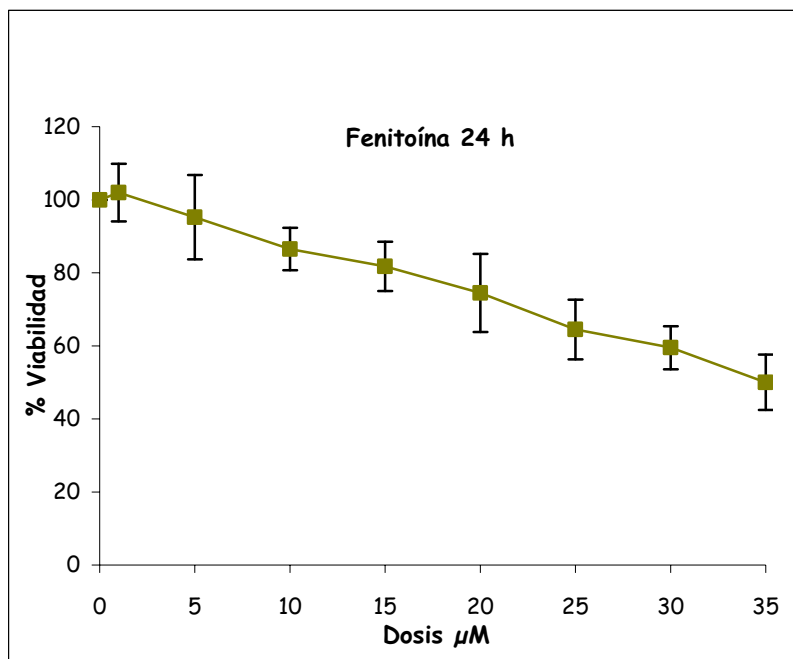
-figura 10A: Diagrama del efecto de la fenitoína sobre la proliferación de fibroblastos de encía de ratón. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis con su margen de variabilidad-

nM	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
V	100.0	98.25	95.50	87.00	92.50	96.00	99.50	97.25	96.00
δ	0.00	4.99	7.42	15.64	13.48	5.72	8.54	7.80	2.45

-tabla XXXVIA: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango nM especificadas por columnas. En la fila inferior se contemplan las desviaciones estandar de cada media de viabilidad-

RESULTADOS

En el rango μM de inducción por fenitoína se produjo un descenso continuado de la replicación celular por aumento progresivo de las dosis, con una IC_{50}^{45} de $34 \mu\text{M}$ -figura 10B y tabla XXXVIB-:



-figura 10B: Diagrama del efecto de fenitoína sobre la proliferación de fibroblastos de encía de ratón. En abscisas las dosis en rango μM , en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estándar de cada dosis con su margen de variabilidad-

μM	0	1	5	10	15	20	25	30	35
V	100	102	95.25	86.50	81.75	74.50	64.50	59.50	50.00
δ	0.00	7.87	11.56	5.80	6.70	10.66	8.19	5.92	7.55

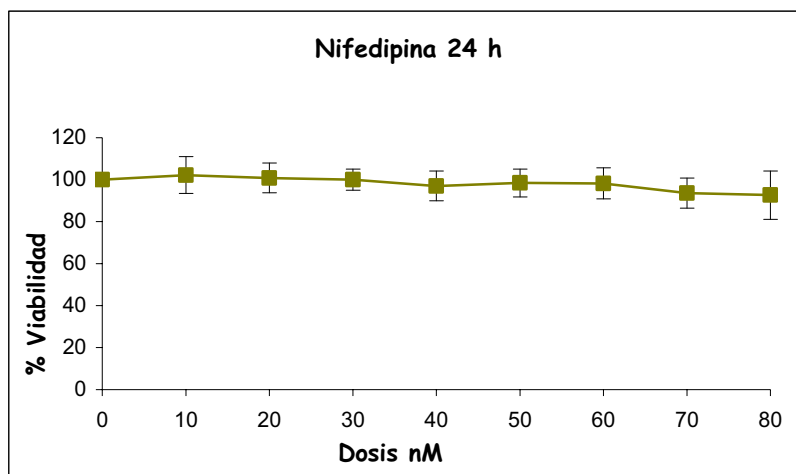
-tabla XXXVIB: Valores de viabilidad -V- sobre el 100% obtenidos con la inducción de fenitoína a unas dosis de rango μM especificadas por columnas. En la fila inferior se contemplan las desviaciones estándar de cada media de viabilidad-

⁴⁵ IC_{50} : Dosis en la que un 50% de las células sobreviven

RESULTADOS

4.2-Inducción de nifedipina

Al observar los resultados de las viabilidades de los fibroblastos con la inducción de dosis progresivas de nifedipina -rango nM- no se observaron cambios valorables en la proliferación celular, y con dosis máximas -80 nM- seguía habiendo una replicación próxima al 100% -figura 11 y tabla XXXVII-. Esta prueba sólo se realizó con rango de dosis nM.



-figura 11: Diagrama del efecto de nifedipina sobre la proliferación de fibroblastos de encía de ratón. En abscisas las dosis en rango nM, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis con su margen de variabilidad-

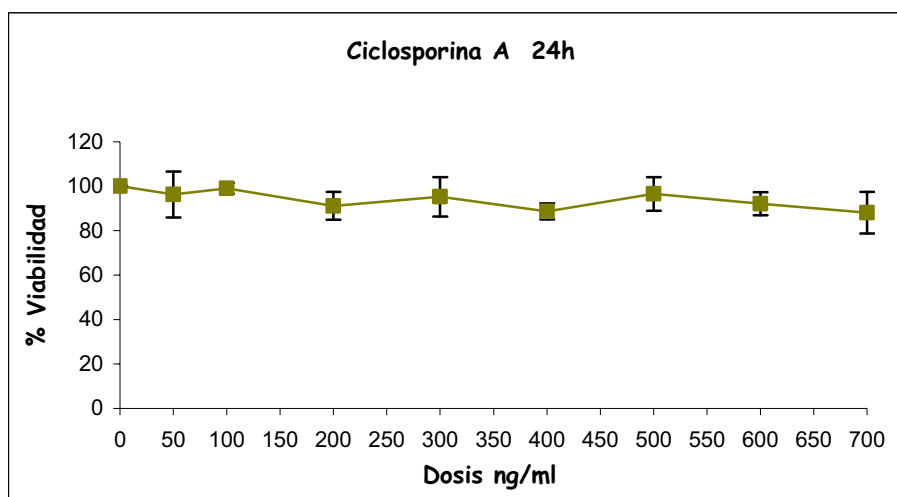
nM	0	10	20	30	40	50	60	70	80
V	100.0	102.2	100.8	100.0	97.00	98.40	98.20	93.60	92.60
δ	0.00	8.81	7.12	5.1	7.07	6.58	7.43	7.23	11.46

-tabla XXXVII: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de nifedipina a unas dosis de rango nM especificadas por columnas. En la fila inferior se contemplan las desviaciones estandar de cada media de viabilidad a las dosis establecidas-

RESULTADOS

4.3-Inducción de ciclosporina

En presencia de ciclosporina también se apreciaron pocos cambios en el cultivo a las 24h de su acción sin ser significativos y la proliferación se mantuvo próxima al 100% -figura 12 y tabla XXXVIII-.



-figura 12: Diagrama del efecto de ciclosporina sobre la proliferación de fibroblastos de encía de ratón. En abscisas las dosis en ng/ml, en ordenadas el porcentaje de viabilidad de las células. También se expresan las desviaciones estandar de cada dosis con su margen de variabilidad-

ng/ml	0	50	100	200	300	400	500	600	700
V	100.0	96.31	98.94	91.15	95.25	88.68	96.51	92.04	88.04
δ	0.00	10.36	2.46	6.25	8.85	3.60	7.57	5.17	9.35

-tabla XXXVIII: Valores de viabilidad -V- sobre el 100%, obtenidos con la inducción de ciclosporina a unas dosis de ng/ml especificadas por columnas. En la fila inferior se contemplan las desviaciones estandar de cada media de viabilidad a las dosis establecidas. No se observó ninguna relación con el aumento de las dosis-

Los resultados de proliferación obtenidos con la línea celular del banco en el cultivo -ref. CRL-2014 ATCC- no permitieron el estudio para la viabilidad por problema en la velocidad de replicación. En consecuencia hubo una falta de un número mínimo de células para la extracción proteica.

RESULTADOS

5-Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la transcripción del colágeno, del TGFβ y de la colagenasa

Los resultados obtenidos en la expresión de mRNA de las 3 proteínas que participan en la composición y secreción de la matriz extracelular: TGFβ, colágeno y colagenasa, con la inducción farmacológica, proporcionan más información sobre el AG. Para los análisis de la PCR cuantitativa no se consideraron las dosis D₂ del rango μM para los fármacos fenitoína y nifedipina porque los resultados aparecieron desproporcionados con la sospecha de ser consecuencia de un artefacto en los valores de respuesta obtenidos tal vez por algún problema de pipeteado.

Se administraron determinadas dosis de los fármacos las mismas que las empleadas para la extracción de proteínas a excepción de D₂ μM:

$$\text{PHT} \left\{ \begin{array}{l} \text{nM: } \frac{D_1 \dots 15 \quad D_2 \dots 35}{} \\ \text{μM: } D_1 \dots 15 \end{array} \right. \quad \text{Nf} \left\{ \begin{array}{l} \text{nM: } \frac{D_1 \dots 40 \quad D_2 \dots 80}{} \\ \text{μM: } D_1 \dots 1 \end{array} \right. \quad \text{Cs} \left\{ \begin{array}{l} \frac{D_1 \dots 300 \text{ng/ml}}{\phantom{D_1 \dots 300 \text{ng/ml}}} \\ D_2 \dots 700 \text{ng/ml} \end{array} \right.$$

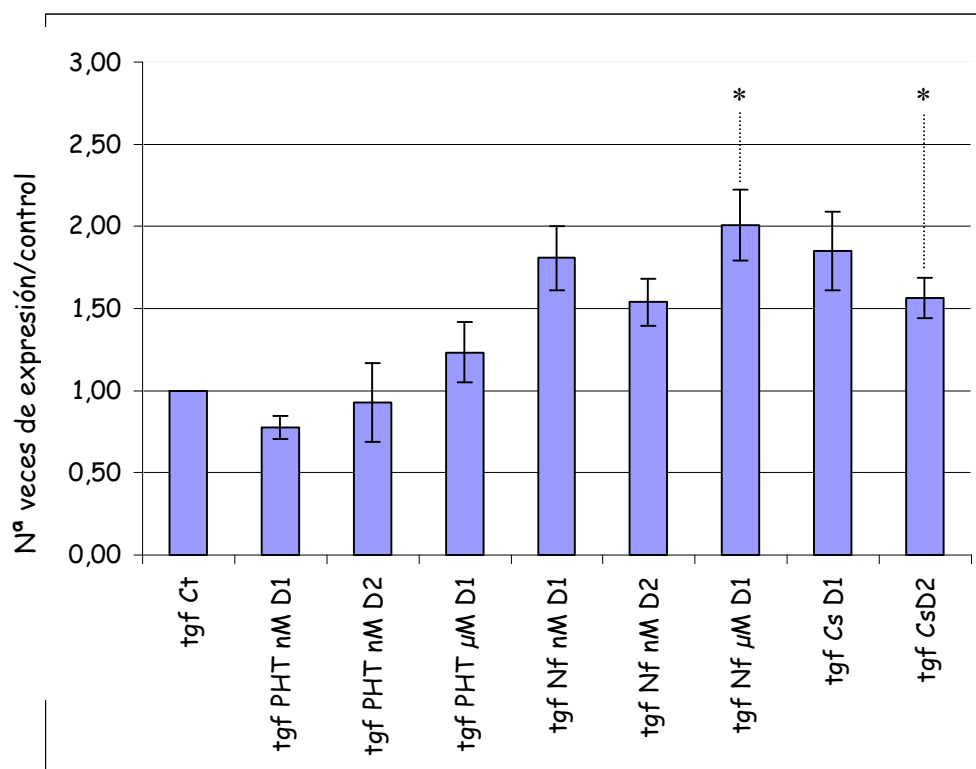
PHT: fenitoína,

Nf: nifedipina

Cs: ciclosporina

Para mRNA-TGFβ no se apreciaron cambios importantes en su inducción por fenitoína. Bajo la acción de nifedipina esta proteína experimentó un aumento significativo para la dosis D₁μM (p=0,048). Al aplicar ciclosporina también hubo una respuesta significativa en la transcripción de este factor de crecimiento en la D₂ (p=0,047) -figura 13 y tablas XXXIXA, B-.

RESULTADOS



-figura 13: Diagrama de barras en el que se representa la inducción de los fármacos sobre la transcripción génica de TGFβ. En abscisas se especifican las dosis empleadas de fenitoína (PHT), nifedipina (Nf) y ciclosporina (Cs), en ordenadas aparece la frecuencia de expresión del mRNA TGFβ con respecto al control. *: inducción significativa-

TGFβ	Ct	PHT D ₁ nM	PHT D ₂ nM	PHT D ₁ μM	Nf D ₁ nM	Nf D ₂ nM	Nf D ₁ μM	Cs D ₁ ng/ml	Cs D ₂ ng/ml
media expresión	1.00	0.78	0.93	1.23	1.81	1.54	2.01*	1.85	1.57*
δ	0.00	0.07	0.24	0.19	0.19	0.14	0.22	0.24	0.12

-tabla XXXIXA: Valores de media de expresión génica de TGFβ a las dosis establecidas de los fármacos inductores y especificadas por columnas en relación con el control -Ct- sin inducción farmacológica. Se reflejan también los valores de las desviaciones estandar (δ). *: inducción significativa.

PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

RESULTADOS

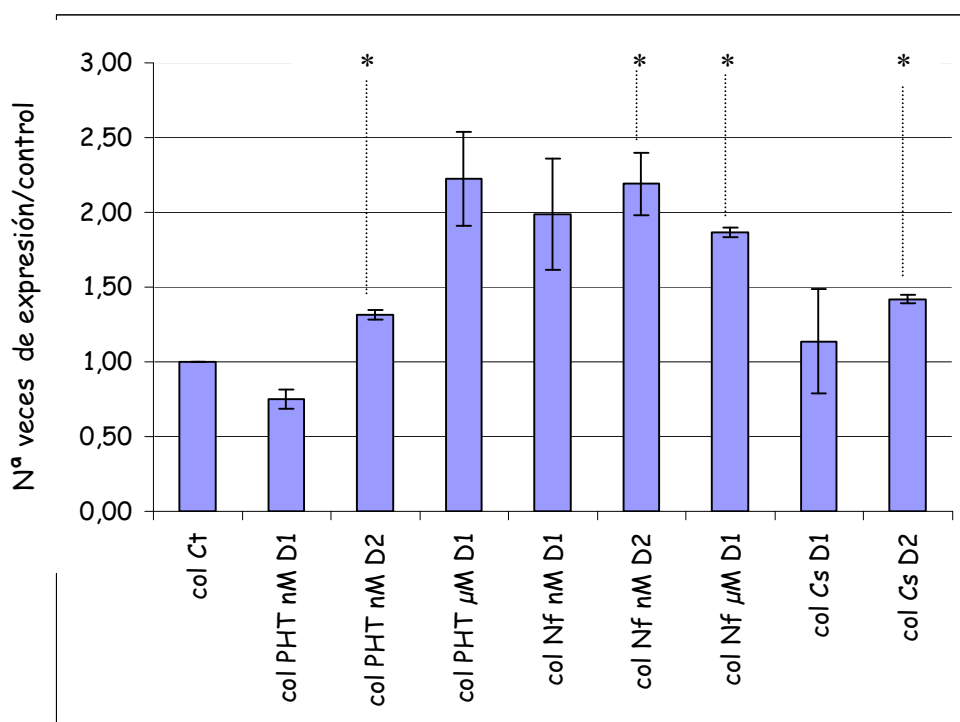
TGFβ	PHT D₁nM	PHT D₂nM	PHT D₁μM
expresión 1	0,83	0,76	1,1
expresión 2	0,73	1,1	1,37
	p=0,0711	p=0,3756	p=0,1659
	Nf D₁nM	Nf D₂nM	Nf D₁μM
expresión 1	1,67	1,44	1,85
expresión 2	1,95	1,64	2,16
	p=0,0544	p=0,05828	p=0,04870*
	Cs D₁ng/ml	Cs D₂ng/ml	
expresión 1	1,68	1,48	
expresión 2	2,02	1,65	
	p=0,0628	p=0,0475*	

-tabla XXXIXB: Valores de frecuencia de la expresión génica de TGFβ con la inducción de los fármacos a las dosis estudiadas en 2 muestras de valores de expresión -1, 2-. Se observan resultados significativos ante la inducción de nifedipina en el rango μM para D₁ y para ciclosporina en su 2ª dosis al comparar con el control -p≤0.05-. Ambos resaltados -*-

PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

Con respecto a la expresión del mRNA del colágeno para la inducción de fenitoína: llegó a aumentar en dosis crecientes de tal modo que en la D₂ del rango nM se apreció un aumento significativo con respecto al control (p=0,025). Nifedipina indujo también un aumento estadísticamente significativo en las dosis D₂nM y D₁μM (p=0,039 y p=0,007 respectivamente) siendo el doble en la D₂ del rango nM cuando se comparó con el control -sin administración del fármaco-. Ciclosporina también indujo una variación significativa en la cantidad de mRNA-colágeno con respecto a la muestra no inducida -control- en D₂ (p=0,047) -figura 14 y tablas XLA, B-. Se presentan los resultados reflejados en la gráfica y las tablas de los valores de expresión y los datos significativos:

RESULTADOS



-figura 14: Diagrama de barras en el que se representa la inducción de los fármacos sobre la transcripción génica del colágeno. En abscisas se especifican las dosis empleadas de fenitoína (PHT), nifedipina (Nf) y ciclosporina (Cs), en ordenadas aparece la frecuencia de expresión del mRNA colágeno con respecto al control.*: inducción significativa-

COL	Ct	PHT D ₁ nM	PHT D ₂ nM	PHT D ₁ µM	Nf D ₁ nM	Nf D ₂ nM	Nf D ₁ µM	Cs D ₁ ng/ml	Cs D ₂ ng/ml
media expresión	1.00	0.75	1.32*	2.22	1.99	2.19*	1.87*	1.14	1.42*
δ	0.00	0.06	0.03	0.31	0.37	0.21	0.03	0.35	0.03

-tabla XLA: Valores de media de expresión génica de colágeno a las dosis establecidas de los fármacos inductores y especificadas por columnas en relación con el control -Ct- sin inducción farmacológica. Se reflejan también los valores de las desviaciones estandar (δ). *: inducción significativa.

PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

RESULTADOS

COL	PHT D₁nM	PHT D₂nM	PHT D₁μM
expresión 1	0,8	1,34	2,45
expresión 2	0,71	1,29	2
	p=0,0578	p=0,025*	p=0,0578

	Nf D₁nM	Nf D₂nM	Nf D₁μM
expresión 1	1,72	2,34	1,85
expresión 2	2,25	2,04	1,89
	p=0,0836	p=0,0399*	p=0,0073*

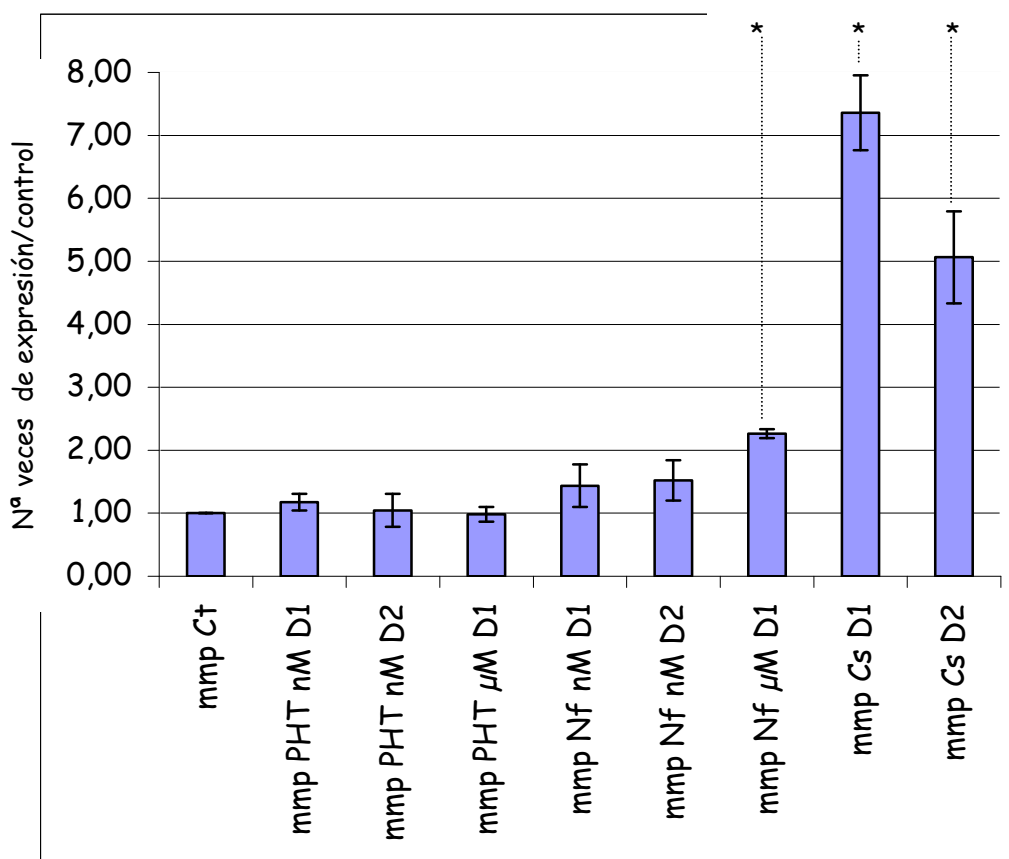
	Cs D₁ng/ml	Cs D₂ng/ml	
expresión 1	0,89	1,44	
expresión 2	1,39	1,4	
	p=0,337506	p=0,01514*	

-tabla XLB: Valores de frecuencia de la expresión génica de colágeno con la inducción de los fármacos a las dosis estudiadas en 2 muestras de valores de expresión -1, 2-. Se observan resultados significativos de su expresión en presencia de fenitoína en el rango de dosis nM -* y de nifedipina en las dosis D₂nM, D₁μM -*-. Ciclosporina también en su 2ª dosis -*permitió un aumento significativo de mRNAcolágeno con respecto al control. p≤0.05-

PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

MMP1 -colagenasa- no experimentó ningún cambio significativo en su transcripción por la inducción con fenitoína. Sí se apreciaba un cambio sustancial con nifedipina en D₁μM -casi el doble- (p=0,012), después de un aumento creciente de las dosis la expresión era directamente proporcional. Con respecto a la inducción de ciclosporina fue llamativa la respuesta exagerada en la cantidad de la expresión de mRNAcolagenasa ante ambas dosis, la primera dosis indujo hasta un aumento de entre 7-8 veces la cantidad del control (p=0,020) y la segunda de 5 (p=0,040) -figura 15 y tablas XLIA,B-.

RESULTADOS



-figura 15: Diagrama de barras en el que se representa la inducción de los fármacos sobre la transcripción génica de la colagenasa. En abscisas se especifican las dosis empleadas de fenitoína (PHT), nifedipina (Nf) y ciclosporina (Cs), en ordenadas aparece la frecuencia de expresión del mRNA colagenasa con respecto al control.*: inducción significativa-

MMP	Ct	PHT D ₁ nM	PHT D ₂ nM	PHT D ₁ µM	Nf D ₁ nM	Nf D ₂ nM	Nf D ₁ µM	Cs D ₁ ng/ml	Cs D ₂ ng/ml
media expresión	1.00	1.17	1.04	0.98	1.44	1.52	2.26*	7.36*	5.06*
δ	0.00	0.13	0.26	0.12	0.34	0.32	0.07	0.59	0.73

-tabla XLIA: Valores de media de expresión génica de colagenasa a las dosis establecidas de los fármacos inductores y especificadas por columnas en relación con el control -Ct- sin inducción farmacológica. Se reflejan también los valores de las desviaciones estandar (δ). *: inducción significativa. PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

RESULTADOS

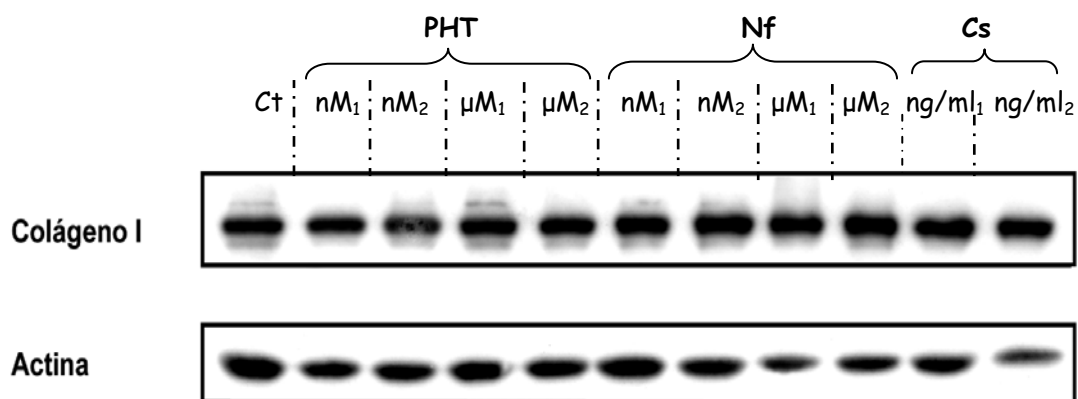
COLAGENASA	PHT D₁nM	PHT D₂nM	PHT D₁μM
expresión 1	1,08	0,86	0,9
expresión 2	1,27	1,23	1,07
	p=0,158	p=0,42404	p=0,4444
	=====	=====	=====
	Nf D₁nM	Nf D₂nM	Nf D₁μM
expresión 1	1,2	1,29	2,21
expresión 2	1,68	1,75	2,31
	p=0,1589	p=0,1325	p=0,01262*
	=====	=====	=====
	Cs D₁ng/ml	Cs D₂ng/ml	
expresión 1	6,94	5,58	
expresión 2	7,78	4,55	
	p=0,0209*	p=0,04011*	

-tabla XLIB: Valores de frecuencia de la expresión génica de colagenasa con la inducción de los fármacos a las dosis estudiadas en 2 muestras de valores de expresión -1, 2-. Se observan resultados significativos de su expresión en presencia de nifedipina en la dosis μM -*-. Ciclosporina en ambas dosis permitió un aumento significativo de mRNAcolagenasa con respecto al control -*- p≤0.05-. PHT: fenitoína, Nf: nifedipina, Cs: ciclosporina-

RESULTADOS

6-Efecto de fenitoína, nifedipina y ciclosporina sobre la expresión del colágeno y del TGF β en los cultivos primarios

La traducción proteica de esta proteína no permitió obtener resultados significativos en los fibroblastos *responder* con la inducción farmacológica - figura 16-.



Dosis:

PHT -nM₁=15, nM₂=35, μM₁=15, μM₂=35- Cs -₁=300ng/ml, ₂=700ng/ml-

Nf -nM₁=40, nM₂=80, μM₁=1, μM₂=13-

-figura 16: Resultados de Western Blot para el colágeno. No se observan cambios evidentes al comparar con el control de actina-

No se observó que el colágeno tuviera modificada su expresión proteica en presencia de ninguno de los 3 fármacos inductores de Agrandamiento gingival.

Para TGF β no se obtuvo ningún resultado valorable.

G-DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El Agrandamiento gingival (AG) presenta etiologías distintas a la farmacológica, y así se ha reflejado en la clasificación del sobrecrecimiento gingival con clínica y semiología variables pero con una histopatología similar. Por este motivo, los datos aportados por múltiples estudios científicos referentes a la patogenia del AG farmacológico, se podrían confrontar con los obtenidos del trabajo experimental; fundamentalmente a nivel de los cambios cuantitativos de las proteínas que tienen una implicación más específica en el desarrollo de esta clase de AG -colágeno, colagenasa y TGFβ- y justificar el comportamiento fibroblástico ante la inducción farmacológica en el fenotipo reactivo de los fibroblastos -responder- con interacción en la matriz extracelular del tejido gingival.

1-Morfología tisular en el análisis microscópico

La observación estructural a microscopía óptica de la muestra de AG inducido por ciclosporina ha permitido contemplar las características histopatológicas de la lesión de AG y se han podido diferenciar de la observación de la muestra no sometida a ninguna influencia farmacológica aunque no corresponda a un patrón patognomónico: -se apreciaban epitelios paraqueratósicos en ambas muestras y crestas epiteliales elongadas con grados de interdigitación variable con las papilas conectivas de la lámina propia pero más marcada en la muestra del AG. En ésta la acumulación de fibras colágenas era mayor -fibrosis- siendo el detalle más evidente en comparación con la muestra de encía sana. No se observó una densidad alta de fibroblastos en el conectivo como se podía esperar -ver figuras 1 y 2 en F-Resultados-. Mc.Gaw y Porter 1988 en su estudio ultraestructural comparativo entre muestras: AG por ciclosporina, control con inflamación y control sin inflamación, tampoco observaron diferencias en la densidad numérica de fibroblastos. Esta observación en cuanto al número podría depender de la fase de desarrollo en el que se produce la lesión según observaron en su estudio en modelo de gato Hassell y cols.1982 en el que se comprobó que la proporción "célula/matriz" bajo terapia de fenitoína en lesiones de AG se mantenía a los 3 meses igual que al inicio después de un primer período de 6-8 semanas de aumento temporal del número celular sin reversibilidad y con crecimiento posterior de la matriz en la lesión madura.

Coincidiendo con estas observaciones se pueden citar otros estudios descriptivos de histopatología en los que se reseñan hallazgos similares a los

DISCUSIÓN

resultados observados: Lucas y cols.1985 realizaron un estudio muy detallado de las características histoquímicas de unas muestras de encía agrandada por nifedipina y su observación a microscopía óptica y electrónica; sus conclusiones fueron que el patrón patológico estructural era semejante a muestras gingivales afectadas por fenitoína de otros estudios: aumento de la sustancia fundamental y de las fibras colagénicas con un epitelio más engrosado que interdigita en el conectivo subyacente un gran número de crestas epiteliales. Coincidieron Barak y cols.1987 en sus conclusiones al estudiar también 34 muestras de encía reactiva a nifedipina con microscopía óptica: en el epitelio engrosado a expensas de la capa espinosa, destacaba una moderada hiperqueratosis y un conectivo más rico en fibras colágenas, fibroblastos y crestas epiteliales más numerosas. Deliliers y cols.1986 observaron también por microscopía electrónica en muestras de encía correspondientes a pacientes que habían recibido ciclosporina, una morfología tisular que concordaba con cualquier AG inducido por fármacos, se observaban también unos focos localizados de células plasmáticas diseminadas en el estroma extracelular. Pernu y cols.1989 observaron estas características histológicas en una muestra de encía correspondiente a una mujer que recibía verapamil por problemas cardíacos desde hacía unos 2 años, en este caso la cantidad de colágeno estaba disminuida con respecto al control. Lombardi y cols.1991 describieron en su estudio histológico la morfología de una muestra de encía procedente de un paciente que recibía felodipina y coincidían también con lo observado anteriormente, en este caso en el conectivo había un aumento de fibroblastos y de trama conectiva con infiltrado de linfocitos y células plasmáticas también. Nishikawa y cols.1991 observaron con microscopía óptica, en muestras de AG por nifedipina, las mismas características estructurales que las de especímenes gingivales de AG inducidos por fenitoína. Bonnaure-Mallet y cols.1995 realizaron un estudio comparativo de 12 muestras gingivales afectadas por cada uno de los fármacos inductores en las que concluyeron una semejanza en el patrón histopatológico con ligeras diferencias en las proporciones de los elementos estructurales a nivel de la matriz extracelular. Wondimu y cols.1995 en su estudio estructural de muestras de pacientes sometidos a transplante renal en tratamiento con ciclosporina, observaron un predominio de engrosamiento epitelial, acentuación de la trama vascular y aumento de volumen de la matriz no colagénica a expensas de reducción del colágeno.

DISCUSIÓN

Es difícil encontrar una muestra de encía sana clínica sin que histológicamente pueda aparecer alguna célula inflamatoria tal como reconocen algunos autores -Genco y cols.1990, Lindhe y cols.2005--ver 1.6 Salud clínica en Anatomía del periodonto-, y no es real el tipo de encía perfecta, sin ningún elemento inflamatorio, que sería un modelo teórico de encía, no sometido a las influencias ambientales ni sistémicas. La muestra de encía sin antecedentes de AG ni tratamiento farmacológico aportada en este trabajo experimental presentaba, en algunas imágenes, un infiltrado inflamatorio con linfocitos y vasos de microcirculación.

2-Cultivos primarios de los fibroblastos

En los fibroblastos de las muestras de este estudio, las células epiteliales no eran viables en cultivo en el primer pase o recambio. Con diferencia, los fibroblastos de los cultivos primarios eran más resistentes, aunque muy lentos en el crecimiento y en la diferenciación. La propagación -extensión de las células adheridas en el fondo del flascón- de estas líneas celulares fibroblásticas permitió un crecimiento poblacional más activo en las primeras generaciones, pautadas por los pases, al comparar con los últimos. La proliferación celular de los cultivos presenta propiedades más puras de la estirpe en origen al principio de la propagación; en cambio las generaciones posteriores *in vitro* adquieren unas condiciones selectivas de supervivencia con eliminación de clones celulares no adaptados. Esta diferencia producía una alteración fenotípica celular con la aparición de alguna característica distinta a la generación celular de origen -Grünheid y Zentner 2005-. Por eso en investigación con cultivos primarios es importante el trabajo experimental en las primeras generaciones celulares. Destacan estas características al comparar con la línea celular procedente de banco -cultivo no primario- cuyo comportamiento fue distinto con una idiosincrasia diferente en el fenotipo propio de los fibroblastos: situación de quiescencia sin proliferación ni crecimiento. Es posible que estas líneas celulares de banco estén pretratadas en unas condiciones que provoquen la pérdida de propiedades vitales de relación, con riesgo de mutaciones si el número de replicaciones es elevado. Aunque es cierto que hay una especificidad tisular diversa de los fibroblastos que se observa clínicamente en cuadros patológicos y que se traduce en un comportamiento fenotípico particular manifestado *in vitro* -Nimni y Harkness 1988-. Por eso se pueden estudiar y reproducir en el laboratorio las características diferenciales de fibroblastos procedentes de AG y de encía normal como se hizo en este trabajo experimental.

DISCUSIÓN

La forma celular es diversa y su presentación puede ser fusiforme redondeada o estrellada. Su disposición ordenada, cuando presentan una conformación fusiforme, es consecuencia de una situación de estrés y esa orientación es paralela a la tensión establecida. Los cultivos del presente trabajo permitieron observar estos cambios morfológicos durante el tiempo de crecimiento y desarrollo de los fibroblastos. Los primeros días ante poca densidad celular en el medio predominaban las formas estrelladas con muchas prolongaciones citoplasmáticas -ver F-Resultados, figura 3 imágenes G y H-, y también aparecían algunas formas redondeadas, picnóticas sin adhesión al fondo, correspondientes a fibroblastos muertos o inviables. Al ir progresando la madurez del cultivo y la replicación celular, la densidad iba aumentando hasta conseguir una saturación fibroblástica en el medio, con morfología fusiforme y contactos intercelulares -ver F-Resultados, figura 3 imágenes K, L-. Se ha comprobado en investigaciones *in vitro* previas que para la síntesis celular de proteínas se precisa primero un contacto de la superficie celular -confluencia-, y lo que afecta a las funciones del núcleo depende de la forma celular del fibroblasto ya adherido -Modéer y cols.1988-.

Los fibroblastos además son células de morfología grande y para conseguir un gran número para la obtención de proteínas en nuestro trabajo, se requería más tiempo del previsto -de 4 a 6 semanas- por su crecimiento lento y la utilización de flascos de mayor capacidad -150cm²-, por eso el trabajo experimental se prolongó, sin contar con algún incidente ocurrido como una infección por hongos en una fase del cultivo que obligó a empezar de nuevo.

En cambio los fibroblastos correspondientes a las líneas celulares -NIH3T3 de ratón- presentaron mayor velocidad de replicación. Salvo esta diferencia el comportamiento celular en el medio también fue similar.

En este trabajo experimental no se apreciaron diferencias morfológicas entre los fibroblastos procedentes del AG y los de encía sin inducción farmacológica conocida; el comportamiento en los cultivos fue también similar. Esta apreciación coincide con otros estudios *in vitro* en los que se compararon fibroblastos *responder* y *non responder* y se observó una homogeneidad en las pruebas de citometría de flujo -Fujii y cols.1994-. James y cols.1998 observaron también el mismo comportamiento entre los 2 tipos de fibroblastos en cultivos monocapa al someterlos a la influencia de ciclosporina y TGFβ. Aunque hay que tener presente que la muestra de encía

DISCUSIÓN

sana que se sometió a este estudio, a pesar de no haber recibido *in vivo* ningún tratamiento farmacológico inductor de AG, se desconocía si los fibroblastos podían ser *responder*. Según otros investigadores, se ha experimentado en el establecimiento de cultivos, que los fibroblastos de AG inducidos por fenitoína tienen mayor capacidad de adhesión que fibroblastos de encía normal, condición indispensable para el crecimiento y desarrollo de la población. Esta propiedad dependería de la producción de una matriz específica *in vivo* con capacidad de regular la adherencia y propagación celulares en el AG provocado por fenitoína -Modéer y cols.1988-.

Con respecto a la secreción de la matriz extracelular, ha sido aportado por la literatura científica que la estimulación mecánica con una fuerza discontinua podría provocar una tensión fibroblástica con un cambio en el patrón de secreción proteica de esta matriz. Esta modificación se considera como un fenotipo selectivo con distinta capacidad de síntesis y secreción y estaría también marcado por la variabilidad genética de los fibroblastos en su respuesta a la estimulación física y según el tipo de colágeno a secretar. La traducción clínica de estimulación intermitente estaría en las funciones fisiológicas del lenguaje oral, masticación, respiración bucal, en la inflamación gingival, en el tratamiento ortodóncico y por supuesto en la inducción farmacológica -Grünheid y Zentner 2005-. No fue objetivo de nuestro trabajo el estudio funcional mecánico ni la composición de la matriz por limitaciones técnicas, y por ello tampoco se estudiaron las interacciones entre fibroblastos y éstos con la matriz extracelular.

Estas líneas celulares de cultivos primarios o de banco celular se adherían en monocapa en el fondo del frasco y cuando eran confluentes dejaban de proliferar -inhibición por contacto- a diferencia de las células cancerosas con adherencia en multicapa y proliferación rápida y sin relación con la confluencia como límite de crecimiento.

Existen sistemas de cultivos celulares en 3 dimensiones -3D collagen gel- para conseguir un volumen de matriz extracelular y simular de forma más aproximada lo que ocurre *in vivo*. Este tipo de cultivos presentan una síntesis de colágeno mucho más alta que los cultivos en monocapa -James y cols.1995- y éstos mayor que en el tejido *in vivo*. A diferencia de lo que ocurría en cultivos monocapa, la inducción de TGF β provocó aumento de síntesis proteica y de colágeno en fibroblastos de AG por ciclosporina y no en los de origen de encía humana sana -James y cols.1998-. Los distintos tipos de colágeno

en el sistema de 3 dimensiones empiezan a observarse en el interior del citoplasma de los fibroblastos: el tipo I a partir del 2º día de cultivo y a las 3 semanas ya se vería dispuesto en fibras gruesas sin orientación regular, los otros tipos III, V y VI presentan una distribución reticular de fibras finas y también aparecen pronto -Hillmann y cols.1999-. El cultivo que realizamos tiene las características de monocapa: ambiente que no es homogéneo por la diferencia entre ambos lados de la capa celular -en su parte superior medio de crecimiento y en su parte inferior el fondo del recipiente al que está adherido- y el crecimiento hasta la confluencia celular, a diferencia de los cultivos en tres dimensiones similares a las situaciones *in vivo* -Nimni y Harkness 1988-. Por este motivo, en todos los hallazgos *in vitro* obtenidos en la tesis, y los revisados en la literatura, hay que reconocer que el comportamiento celular es distinto al comparar con la situación y ambiente *in vivo*. Algunos estudios ponen en evidencia estas diferencias: Seibel y cols.1989c observaron aumentos de colágeno y proteína global en cultivos de fibroblastos gingivales procedentes de perros *beagle* sometidos a terapia con ciclosporina a dosis de 25 mg/Kg/día durante 8 semanas, en cambio si eran fibroblastos gingivales sin pretratamiento y sometidos en el cultivo a ciclosporina a dosis de 400 ng/ml al comprobar la síntesis de proteínas y de colágeno no se apreciaban cambios al comparar antes y después de la inducción. También se pueden citar las influencias que *in vivo* existen con respecto a la modulación que ejerce la respuesta inflamatoria en el comportamiento y la interacción con las actividades de los fibroblastos -ver 2-Inflamación gingival y respuesta adaptativa inmunitaria y 4.4-Patogenia-. En concreto los efectos de los fármacos en los cultivos serían de acción directa por la simplicidad del diseño del cultivo.

3-Proliferación de los fibroblastos y pruebas de viabilidad

En el proceso de replicación celular puede influir el carácter reactivo - responder- del fibroblasto. Así ocurre en la fibromatosis gingival hereditaria (FGH) en la que Coletta y cols.1998 observaron un aumento de la proliferación de fibroblastos reactivos al comparar con fibroblastos de encía normal.

Por consiguiente la procedencia y calificación de los fibroblastos -responder o no- que inician el cultivo es importante para prever el resultado de los efectos de la inducción farmacológica. En este trabajo experimental en el

DISCUSIÓN

que se cultivan fibroblastos *responder* procedentes de AG por inducción de ciclosporina, no se llega a comprobar si *in vitro* mantienen su característica de *responder* ante la inducción por otros fármacos inductores -fenitoína y nifedipina- aunque en teoría es un fenotipo que se espera obtener. Matsumoto y cols.2001 realizaron un estudio comparativo y cruzado de muestras de encía de pacientes que recibían nifedipina, nicardipina y nisoldipina, que eran *responder*, y las sometieron *in vitro* a fármacos también antagonistas del Ca -nifedipina, diltiazem, verapamil y nicardipina-, tomando como control positivo a fenitoína. Los resultados fueron de reactividad para los fibroblastos procedentes de encía *responder* a nifedipina y a nicardipina y de *non responder* para los procedentes de encía reactiva a nisoldipina.

Al estudiar la viabilidad celular sometida a la acción farmacológica, tampoco se observó un cambio importante en su forma celular con la administración de los fármacos.

Las dosis empleadas para las viabilidades de los fibroblastos se tomaron de las que emplean la mayoría de trabajos experimentales *in vitro* aportados en la literatura científica. Sus valores estaban dentro de los rangos de medida que permiten obtener unos efectos en la replicación fibroblástica y compararlos.

En nuestros resultados la viabilidad de los fibroblastos fue la misma para cada una de las 2 procedencias de fibroblastos -encía sana y AG- y se observó reducción de la proliferación celular -para fenitoína- y de estabilidad en el crecimiento fibroblástico para la inducción de los otros 2 fármacos: nifedipina y ciclosporina. Estos resultados también coinciden con el estudio de viabilidad realizado con fibroblastos de encía de ratón

NIH3T3, aunque en este apartado experimental la inducción de fenitoína a rango nM tampoco permitió ninguna variación en la replicación fibroblástica.

En consecuencia, no se podía considerar que hubiera hiperplasia fibroblástica en las células procedentes de las muestras gingivales porque el porcentaje de replicación se mantenía las 24h, para nifedipina y ciclosporina y disminuía para fenitoína, en ausencia de suero fetal bovino -que aporta factores de crecimiento- incluso aumentando las dosis de los fármacos. Hay que considerar la fisiopatología del AG farmacológico en otros componentes

DISCUSIÓN

estructurales que podrían ser responsables del sobrecrecimiento clínico como se ha visto en el capítulo de la patogenia.

Estos efectos obtenidos sobre la proliferación de los fibroblastos de nuestro trabajo contradicen lo aportado por algunos autores y asimismo coincide con otros en sus aportaciones experimentales. Esta variabilidad en la respuesta de las poblaciones de fibroblastos puede ser consecuencia de la acusada sensibilidad de las células del tejido conectivo -Cockey y cols.1986-, aunque también hay factores variables en el procedimiento experimental que influyen en los resultados.

Coley y cols.1986 comprobaron que ciclosporina a 400ng/ml provocó un aumento ligero de la proliferación al final del periodo de observación de 10 días mientras que se producía una inhibición de la síntesis de proteína y colágeno al aumentar progresivamente la dosis de ciclosporina de 100 a 400ng/ml. Zebrowski y cols.1986,1988 observaron un aumento de síntesis de DNA en los fibroblastos dosis-dependientes para los tres fármacos inductores y mayores efectos para ciclosporina -250-500ng/ml- y permitieron un crecimiento celular evidente a los 12 días de cultivo. También Bartold 1989 estudió el comportamiento de un cultivo de fibroblastos sometido a ciclosporina y comprobó un incremento en la síntesis de DNA con máximo efecto a 10ng/ml aunque esta estimulación de crecimiento no afectó la producción de glicosaminoglicanos ni de proteínas en general. El mismo resultado obtuvieron Willershausen-Zonnchen y cols.1992 en una población de fibroblastos cultivados durante 72h con ciclosporina a una dosis de 1µg/ml con un resultado dosis-dependiente y sin alteración de la síntesis de proteoglicanos de la matriz. Cuando la incubación se produjo en un período largo -6 semanas- los resultados fueron altos al comparar con controles en la replicación celular y en la síntesis de proteínas y colágeno. En un estudio similar de los mismos autores en 1994 con inducción de nifedipina en una población de fibroblastos cultivados durante 72h con a una dosis de 10µg/ml y a 6 semanas a una dosis de 1µg/ml observaron también un incremento significativo - $p < 0.001$ - y sin alteración de la síntesis de proteoglicanos de la matriz. Mariotti y cols.1998 comprobaron que ciclosporina y M17 -su metabolito- indujeron un aumento de proliferación celular de 23,2% -a dosis de 400ng/ml- y 36,7% -100ng/ml- respectivamente con respecto a los controles.

Moy y cols.1985 observaron un perfil de respuesta variable según la concentración del fármaco y el período de incubación sobre la replicación

DISCUSIÓN

celular, similar al que hemos obtenido ante una incubación corta -3h- de la población de fibroblastos sometida a concentraciones bajas de fenitoína -5µg/ml-, en cambio la respuesta proliferativa se mantenía alta durante un período largo de incubación -48h- con unas dosis altas de fenitoína-50µg/ml-.

Otros autores han observado, coincidiendo con nuestros resultados, reducciones evidentes de la proliferación fibroblástica o una ausencia de cambios, al estar sometido el cultivo a los diversos fármacos:

Fan y Scott 1989 comprobaron que ciclosporina en un rango de dosificación amplio -200-800ng/ml- no aumentó la proliferación celular. Sobhani y cols.1989 observaron que ciclosporina inhibió la proliferación de las 9 cepas de fibroblastos gingivales humanos a distintas concentraciones -100, 400 y 1000ng/ml- en 72h de incubación y los efectos inhibitorios fueron dependientes de la dosis. Barber y cols.1992 comprobaron que fibroblastos procedentes de AG inducido por ciclosporina sintetizaron menos DNA al comparar con fibroblastos de encía sana o de pulmón fetal a unas concentraciones normales plasmáticas - 10^{-12} g/ml-; si esta concentración aumentaba hasta 10^{-6} g/ml se producía una inhibición significativa. Schincaglia y cols.1992 tampoco observaron ningún efecto de ciclosporina sobre la síntesis de DNA.

También otros autores han observado un efecto inhibitorio de la proliferación de fibroblastos *in vitro* al administrar a un cultivo monocapa y en tres dimensiones altas concentraciones de ciclosporina - 10^{-5} g/ml- con resultados significativos -James y cols.1995-. Pistorius y cols.2003 estudiaron fibroblastos de encía humana sometidos a distintos inmunosupresores y comprobaron que en un período de incubación de 6h la proliferación celular disminuyó en todos los cultivos bajo la acción de los fármacos con respecto al control -78,2% para ciclosporina, 70,7% para azathioprina, 64% para tacrolimus-.

Referente a la inducción de fenitoína para la proliferación fibroblástica, Modéer y cols.1982 comprobaron que explantes tomados de niños que recibían el fármaco experimentaban una reducción de la proliferación del 20-25% al estar en contacto con el metabolito -p-HPPH- y comparar con los fibroblastos que no estaban sometidos a esta inducción. La síntesis de proteínas y la de DNA se mantenían sin cambios.

DISCUSIÓN

La misma ausencia de inducción se obtuvo con fenitoína y nifedipina a distintas concentraciones -5-10µg/ml y 100-200ng/ml respectivamente- en un cultivo de fibroblastos procedente de encía sana -Salo y cols.1990-. Kato y cols.2005 en sus experimentos con fibroblastos gingivales humanos observaron que al someterlos a la inducción de fenitoína no se produjo ningún efecto significativo sobre la proliferación celular a unas concentraciones de 5, 10 y 20µg/ml durante 20 días de incubación.

Otros estudios con antagonistas del calcio también han aportado reducciones en la tasa de proliferación fibroblástica, conviene citar a Pernu y cols.1989 en su estudio con verapamil en el que observaron este efecto al comparar con fibroblastos control de encía sana a los 18 días de incubación. En el estudio de Hassell y cols.1991 se comprobó que nifedipina no tuvo ninguna acción a concentraciones proporcionales fisiológicas. En otro estudio *in vitro* con fibroblastos de encía humana sometidos a la acción de nifedipina no se observó ningún efecto en la proliferación celular a una concentración fisiológica del fármaco - 1×10^{-8} a 1×10^{-6} M-, al aumentar esta concentración - 1×10^{-5} M- ya se produjo una inhibición significativa - $p < 0.005$ - de la replicación -Nishikawa y cols.1991-. Fujii y cols.1994 tampoco obtuvieron un aumento significativo de la población de fibroblastos de AG sometidos a antagonistas del calcio al comparar con fibroblastos no reactivos. Coincide con otros estudios *in vitro* realizados con fibroblastos procedentes de una fibromatosis gingival hereditaria en los que se observa una disminución de la velocidad de replicación celular si se compara con controles y la causa se establece en un posible defecto de los fibroblastos -Johnson y cols.1986, Shirasuna y cols.1989-.

En nuestro estudio consideramos que esta reducción no indica muerte celular ya que no se observó a microscopía ningún signo de muerte en los pocillos coincidiendo con la hipótesis de Modéer y cols.1982. Se podría considerar que habría una desaceleración en la replicación celular -parada del ciclo celular- por la acción de los fármacos inductores en ambas líneas celulares como consecuencia de citotoxicidad a partir de una dosis determinada y para los 3 grupos de fármacos y que pudiera afectar en alguna de las fases de la mitosis de los fibroblastos.

También es interesante observar que los fibroblastos que se sometieron al medio rico con factores de crecimiento -suero fetal bovino (SFB)- experimentaron menor proliferación que aquéllos que crecieron sin su presencia o no se observaron cambios en la replicación. Incluso en contra de

lo que se esperaba, redujeron el porcentaje de viabilidad con más intensidad en el mayor tiempo de exposición -72h-, y con el aumento creciente de dosis especialmente cuando estaban sometidos a la acción de fenitoína. Este efecto contradictorio se podría entender como un conflicto de competencia no específica entre los factores de crecimiento endógenos que contiene SFB y los fármacos inductores en la afectación del comportamiento de los fibroblastos en el cultivo. Tal vez habría que reducir la concentración de SFB a un valor que permitiera un crecimiento fibroblástico continuado del cultivo. Según James y cols.1995 esta concentración máxima de SFB sería de 2,5% y en nuestro estudio la proporción recomendada y administrada en el medio de cultivo fue de 10% sin variar en ninguna condición. En los trabajos *in vitro* de Fujii y cols.1994 y Matsumoto y cols.2001 la presencia mínima de SFB aplicada en el medio de cultivo fue de 1% para prevenir la proliferación celular y mantener las células en la fase S del ciclo celular, adecuado para el estudio de la síntesis de DNA y de colágeno, o como mínimo sincronizadas en la misma fase del ciclo celular -Grünheid y Zentner 2005-. En el estudio de Anderson y cols.1998, ya se observó que la proliferación de fibroblastos era mayor en los casos en los que el medio estaba libre de SFB y la respuesta celular dependía exclusivamente de los factores de crecimiento exógenos: PDGF y TGFβ. En los casos en que el medio contenía SFB se producía al parecer una modulación de los factores exógenos con capacidad saturable, sin sumación de efectos.

4-La transcripción de TGFβ, colágeno y colagenasa

A partir de los resultados de las viabilidades la experimentación se realizó sólo con la muestra que presentaba el AG para el estudio de la transcripción y traducción proteicas ante la respuesta más rápida y esperada de los fibroblastos *responder*.

Los resultados obtenidos en la *Real Time*-PCR sorprenden al comparar con otros de la literatura y en lo que cabría esperar en la patogenia del AG por la disminución de la degradación del colágeno: Obtuvimos unos valores aumentados y significativos en los referentes a la expresión de mRNA-colagenasa ante la inducción con ciclosporina a dosis de 300ng/ml y 700ng/ml. También con nifedipina -1μM- hubo un aumento significativo para mRNA-colagenasa. Posiblemente el origen de la muestra de encía en el paciente transplantado bajo la administración crónica de ciclosporina

DISCUSIÓN

también correspondiera a un diagnóstico de enfermedad periodontal de gravedad moderada con un componente destructivo en la inserción conectiva que justificara los niveles altos de mRNA-colagenasa. Aunque estos resultados corresponden a la expresión génica del mRNA del enzima y habría que esperar el correspondiente a su traducción como proteína en su cantidad y en su actividad funcional enzimática de lo que se desconoce.

El grado de significación estadística de las barras en sus resultados no dependería de su valor absoluto sólo sino también del grado de dispersión de los valores, por eso poca expresión de mRNA de proteína en alguna dosis de fármaco era significativa si presentaba poca dispersión de valores como la inducción de TGF β por la dosis 2 de ciclosporina o la correspondiente al colágeno por la dosis 2 nM de fenitoína.

En el estudio de Lohi y cols.1994 *in vitro* con fibroblastos humanos de la dermis se observó que ciclosporina aumentaba la expresión de la colagenasa o bien la inducía a través de citocinas -IL1 β , TNF α - y agentes procolagenasa -ésteres de forbol-, y este dato coincidiría con el resultado obtenido en la RT-PCR de nuestra muestra en la que se observaba una transcripción génica muy elevada de la colagenasa de 5 y 7 veces de expresión del mRNA por la inducción de las dosis de ciclosporina. También en el estudio de Grünheid y Zentner 2005 un par de cepas de fibroblastos expresaron un aumento de colagenasa que se correspondería con un incremento previo de su transcripción génica, aunque en unas condiciones de estimulación mecánica.

Por el contrario, otros autores han observado una disminución de la expresión mRNA-colagenasa:

Bolzani y cols.2000 comprobaron en estudios *in vitro* que la adición de ciclosporina en cultivos de fibroblastos humanos provocaba una disminución de los niveles de colagenasa y estromelysina. Yamada y cols.2000 observaron que ciclosporina y fenitoína suprimían o disminuían la expresión de la mRNA-colagenasa y de mRNA-catepsina L que es una cisteín proteinasa de los lisosomas que degrada componentes de la matriz extracelular. En el estudio de Gagliano y cols.2004 con fibroblastos gingivales humanos, la acumulación de colágeno que se producía por la inducción de ciclosporina en el cultivo era consecuencia de una disminución de la degradación por disminución no significativa de la transcripción de la colagenasa y también de su actividad enzimática. Kato y cols.2005

DISCUSIÓN

comprobaron en su estudio con fibroblastos gingivales humanos incubados a distintas concentraciones de fenitoína -5, 10 y 20µg/ml- durante 2, 4 y 8h una supresión dosis-dependiente de la expresión de mRNA-colagenasa. También se asoció una reducción de la endocitosis del colágeno confirmada por citometría y RTPCR de las expresiones de las proteínas de membrana integrinas.

En un estudio con modelo de rata, en el que se sometió a un grupo de ratas a una dieta con suplemento de ciclosporina, con controles sin fármaco con observación los días 0, 3, 8, 15, 30 y 55, se comprobó una reducción de mRNA-colagenasa, asociada a una actividad fagocítica disminuida -Kataoka y cols.2000-.

La transcripción del colágeno en nuestro estudio experimental aumentó en su expresión en casi todas las condiciones, pero de forma significativa para la inducción de fenitoína a 35nM, con nifedipina a 80nM y 1µM y con ciclosporina a 700ng/ml, por lo que hubiera sido posible esperar una traducción proteica similar. Otros estudios de autores confirman o contraponen estos resultados:

Shikata y cols.1993 observaron un incremento de la expresión génica de colágeno tipo VI en fibroblastos sometidos a la acción de fenitoína y nifedipina. En cambio, Salo y cols.1990 observaron que la presencia de fenitoína y nifedipina en un cultivo de fibroblastos gingivales humanos provocaba un decrecimiento de la expresión de mRNA-colágeno tipo I. En estudios con modelo de rata, Kataoka y cols.2001 observaron una reducción de mRNA-colágeno I en los fibroblastos gingivales después de someter a las ratas a una dieta con nifedipina -125mg/Kg en la 1ª semana y 250mg/Kg el resto de días- y se sacrificaron los días 0, 3, 15, 30 y 55. Los controles no recibieron el suplemento de nifedipina. En el estudio de la fagocitosis del colágeno I se observó una disminución de esta actividad por lo que aumentó el volumen neto de colágeno. El mismo resultado se obtuvo en el estudio experimental de los mismos autores administrando como fármaco ciclosporina: disminución de la transcripción de colágeno por RTPCR -Kataoka y cols.2000-.

Con respecto a la proteína TGFβ, nuestro trabajo experimental permitió obtener un aumento generalizado de su expresión de mRNA con resultados significativos para 1 µM de nifedipina y 700ng/ml de ciclosporina.

DISCUSIÓN

Podría haber un reconocimiento celular de los fibroblastos más evidente hacia la expresión de mRNA de las tres proteínas por ciclosporina y nifedipina -estos 2 fármacos permiten en las tres gráficas resultados significativos- tal vez porque el paciente fuera más reactivo *in vivo* durante años con esta terapia ante su patología y trasplante renal.

5-La traducción del colágeno

Los resultados obtenidos en la traducción proteica de colágeno por inducción de los fármacos fueron indiferentes en la variación concreta de su síntesis aunque es cierto que otros autores han mostrado en sus observaciones *in vitro* la misma ausencia de cambios en la síntesis de colágeno y proteínas en general también en sistema de cultivo en monocapa - James y cols.1995-. Hassell y cols.1991 observaron una falta de influencia *in vitro* de nifedipina sobre la síntesis proteica de fibroblastos de AG humano sometidos a nifedipina al comparar con los procedentes de encías humana sana ($p > 0.05$).

Nishikawa y cols.1991 observaron la misma falta de respuesta en muestras de AG por nifedipina a concentraciones de 1×10^{-7} M, si aumentaban a 1×10^{-5} M se inhibían ambas de forma significativa. No se puede descartar la supuesta falta de reconocimiento del Ac utilizado para el tipo I de colágeno ante un posible cambio de síntesis de tipo de esta proteína en el cultivo debido a una alteración ambiental en el medio -por aumento de densidad celular y confluencia, por acción de SFB o por los productos de deshecho celular...-. Willershausen-Zönnchen y cols.1992, Mariotti y cols.1998 comprobaron una inhibición de la síntesis de colágeno sin afectarse la producción del resto de proteínas en un cultivo de fibroblastos sometidos a ciclosporina y a su principal metabolito M17 a dosis de 400ng/ml y a 100ng/ml respectivamente. Grünheid y Zentner 2005 en su estudio con distintas cepas de fibroblastos sometidas a estimulación tensional obtuvieron resultados distintos en la producción de colágeno: el tipo I sin diferencias significativas, el tipo III con aumento, reducción y sin cambios en diversas cepas y el tipo V con aumento y sin cambios.

En el estudio de Zebrowski y cols.1986 se obtuvo un aumento significativo en la producción de colágeno a altas dosis de ciclosporina y fenitoína - ~500ng/ml y ~ 10^3 ng/ml respectivamente- y en cambio disminuyó su síntesis

DISCUSIÓN

en presencia de dosis bajas de nifedipina $\sim 100\text{ng/ml}$. Schincaglia y cols.1992 observaron que ciclosporina permitió el aumento de forma directa de la síntesis de procolágeno I a las 24h de inducción. Otros autores obtuvieron en muestras de AG sometidas a antagonistas del calcio y a fenitoína aumentos significativos de la síntesis de colágeno y de DNA -Fujii y cols.1994-. Gagliano y cols.2004 en un estudio *in vitro* con ciclosporina como fármaco inductor aportaron un aumento del depósito de colágeno pero de forma indirecta: por reducción de los niveles de colagenasa.

Por el contrario, para verapamil como inductor, se produjo una reducción estadísticamente significativa de la síntesis de colágeno y de proteínas en general en un estudio *in vitro* -Pernu y cols.1989-.

En muestras de AG inducido por ciclosporina si el sistema de cultivo era en tres dimensiones se producía un aumento estadísticamente significativo en la síntesis de colágeno y proteínas -James y cols.1995-.

En un estudio con modelo de perro *beagle* se observó que tanto *in vivo* -al administrar 25mg/Kg/día de ciclosporina durante 8 semanas- como en laboratorio 400ng/ml durante 72h- se producía una elevación de la síntesis de colágeno. La síntesis de proteínas también se incrementó con la administración oral -Seibel y cols.1989c-.

En nuestro modelo experimental podía haber sucedido una afectación del Ac que no reconoció a TGF β , resultados que no aparecieron objetivados de ningún modo a pesar de que se repitió varias veces el procedimiento.

La actividad colagenolítica no se pudo valorar ante la ausencia de datos concluyentes por lo menos en cuanto a la traducción proteica de la colagenasa aunque se obtuviera una cantidad de colágeno invariable después de la inducción farmacológica y una transcripción previa de mRNA de ambas proteínas con resultados distintos para cada inducción. Zebrowski y cols.1988 estudiaron la actividad colagenolítica sobre la degradación del colágeno C^{14} en un cultivo de fibroblastos sometido a los 3 fármacos inductores. Fue máxima a los 3 días a partir de los cuales descendió por la influencia de fenitoína y resultó invariable para ciclosporina, en cambio nifedipina provocó un aumento de la misma, con efectos dosis-dependientes para fenitoína y nifedipina. Tampoco se pudo valorar la vía degradativa del

DISCUSIÓN

colágeno en su actividad fagocítica porque no se realizó ninguna técnica de reconocimiento de receptores de membrana del colágeno ni un estudio ultraestructural que permitiera observar fagosomas citoplasmáticos conteniendo colágeno ni características morfológicas que reconocieran un aumento de actividad metabólica sintética -aumento del retículo endoplasmático, mitocondrias, complejo de Golgi,...

La ciclosporina es capaz de aumentar los depósitos de glicosaminoglicanos (GAG) por síntesis de fibroblastos en cultivos sometidos a ciclosporina pero sólo cuando el cultivo era de baja densidad y/o de poca confluencia -Newell y Irwin 1997-. Una regulación por aumento -*Up regulation*- en la síntesis de GAG por fibroblastos en respuesta a ciclosporina puede ser una posible patogénesis de AG provocado por ciclosporina. Según Zebrowski y cols.1994 puede influir la presión osmótica coloidal tisular que al aumentar provocaría edema tisular que al asociarse con la acumulación de GAG no sulfatados favorecería el AG. La fenitoína también se ha visto capaz de influir en la síntesis y secreción de GAG y colágeno y modificar el fenotipo de los fibroblastos que pertenecen a poblaciones heterogéneas: así en un estudio de Bosi y cols.1998 sobre el comportamiento de fibroblastos de paladar hendido se observó que tienen mayor capacidad de sintetizar GAG y colágeno que fibroblastos normales y la administración de fenitoína modificó esta producción con reducción de colágeno y especialmente de GAG en fibroblastos normales mientras que no se alteró la secreción de GAG en los fibroblastos de paladar hendido. Vernillo y Schwartz 1986 ya comprobaron en células mesenquimales de pollo que fenitoína era capaz de modificar la acción de la colagenasa para aumentar la cantidad de colágeno así como la concentración de GAG, aproximadamente de 1,5 a 2 veces los niveles iniciales. Barber y cols.1992 en su estudio comparativo de cultivos de fibroblastos de diferentes orígenes: AG por ciclosporina, encía sana y pulmón fetal observaron una respuesta estadísticamente significativa menor en la síntesis de GAG en la muestra procedente de AG.

En nuestro trabajo experimental, no se realizó el estudio del sobrenadante *in vitro* para el análisis de los GAG y de niveles de proteínas extracelulares en general por la complejidad de la técnica y la limitación de recursos.

Los resultados precarios en la expresión del colágeno no invalidan su sentido ya que se ha estudiado el colágeno intracelular que tiene una vía de secreción al exterior para la composición de la matriz extracelular y donde

DISCUSIÓN

será metabolizado por la colagenasa. Por consiguiente no sorprende encontrar poca variación en los niveles de colágeno intracelular acumulado y con el ámbito extracelular sin estar estudiado.

La falta de correlación entre los resultados de la expresión del mRNA del colágeno y su traducción en lo que sería de esperar también un aumento significativo de proteína, podría obedecer a alguna afectación transcripcional o modificación en el proceso de eliminación de las secuencias de intrones.

Ante la interpretación de los resultados obtenidos, se podría afirmar que el aumento cuantitativo del mRNA-colágeno y del mRNA-TGF β al comparar, con el control sin inducción, estaría en lo admisible de Agrandamiento Gingival por aumento de la matriz extracelular.

Cabría la determinación de investigar con mayor número de muestras, y llegar a la traducción de TGF β y de colagenasa. Estudiar la actividad funcional de la colagenasa y comprobar su acción enzimática, independiente de su cantidad y que en la muestra estudiada podía estar reducida y no ser activa totalmente en su capacidad de degradación.

Se podría considerar el efecto indeseable del Agrandamiento gingival por la administración del fármaco, como un efecto terapéutico en casos de pérdida de la papila interdientaria... La investigación siempre queda abierta para la aplicación de nuevos conocimientos científicos en el tratamiento de las enfermedades.

H-CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los fibroblastos gingivales de cultivos primarios son sensibles a fármacos inductores de Agrandamiento gingival -fenitoína, nifedipina y ciclosporina- .
2. Los fármacos inductores de Agrandamiento gingival no provocan hiperplasia gingival secundaria a la proliferación celular de fibroblastos.
3. Los fármacos inductores provocan un incremento significativo de la transcripción del TGF β , colágeno y colagenasa.
4. Los fármacos inductores no producen un incremento de la traducción del colágeno, con repercusión en la matriz extracelular.

I-BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aarli JA. Phenytoin-induced depression of salivary IgA and gingival hyperplasia. *Epilepsia* 1976a, 17:283-291

Aarli JA. Drug-induced IgA deficiency in epileptic patients. *Arch Neurol* 1976b, 33:296-299

Aarli JA. Changes in serum immunoglobulin levels during phenytoin treatment of epilepsy. *Acta Neurol Scand* 1976c, 54:423-430

Abbas AK, Lichtman A. *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición en español 2004. Ed. Elsevier

Abbas AK, Lichtman A. *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición en español 2004. Ed. Elsevier

Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears. *Index Farmacològic*, 5ª edició 2000, 79-115

ADA -American Dental Association-. *Terapéutica dental*, versión española 2003 de la segunda edición inglesa 2002. Ed. Masson SA

Adams D, Davies G. Gingival hyperplasia associated with cyclosporin A: a report of 2 cases. *Brit Dent J* 1984, 157:89-90

Addy V, Mc Elnay JC, Eyre DG, Campbell N, D'Arcy PF. Risk factors in phenytoin-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1983, 54:373-377

Afonso M, de Oliveira VB, Shibli JA, Sposto MR. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Periodontol* 2003, 74:51-56

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*, Ed. Omega, 1996, 3ª edición. 667-668, 813

Allman SD, McWhorter AG, Seale NS. Evaluation of cyclosporin-induced gingival overgrowth in the pediatric transplant patient. *Pediatr Dent* 1994, 16:36-40

BIBLIOGRAFÍA

Anderson TJ, Lapp CA, Billman MA, Schuster GS. Effects of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serum-containing and serum free-medium. *J Clin Periodontol* 1998, 25:48-55

Angelopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972, 34:898-906

Armijo JA, Herranz JL. Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos. En: Florez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología humana*; Masson 2003, 4ª ed. Reimpresión 2004, 517-541

Ayanoglou CM, Lesty C. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. *J Periodont Res* 1999, 34:7-15

Backman N, Holm AK, Hanstrom L, Blomquist HK, Heijbel J, Safstrom G. Folate treatment of diphenylhydantoin-induced gingival hyperplasia. *Scand J Dent Res* 1989, 97:222-232

Bader HI. Use of lasers in periodontics. *Dent Clin North Am* 2000, 44:779-791

Ball DE, Mc Laughlin WS, Seymour RA, Kamali F. Plasma and saliva concentrations of phenytoin and 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in relation to the incidence and severity of phenytoin-induced gingival overgrowth in epileptic patients. *J Periodontol* 1996, 67:597-602

Baños JE, Farré M. *Principios de Farmacología Clínica. Bases científicas de la utilización de medicamentos*. Ed. Masson, 2002

Barak S, Engelberg IS, Hiss J. Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings. *J Periodontol* 1987, 58:639-642

Barber MT, Savage NW, Seymour GJ. The effect of cyclosporin and lipopolysaccharide on fibroblasts: implications for cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1992, 63:397-404

BIBLIOGRAFÍA

Barclay S, Thomason JM, Idle JR, Seymour RA. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1992, 19:311-314

Bartold PM. The effect of interleukin 1 beta on proteoglycans synthesized by human gingival fibroblasts in vitro. *Connect Tissue Res* 1988, 17:287-304

Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodont Res* 1989, 24:314-321

Bartold PM, Harkin DG, Bignold LP. Proteoglycans synthesized by human polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Immunol Cell Biol* 1989a, 67:9-17

Bartold PM, Haynes DR, Vernon-Roberts B. Effect of mitogen and lymphokine stimulation on proteoglycan synthesis by lymphocytes. *J Cell Physiol* 1989b, 140:82-90

Bartold PM, Hay S, Vernon-Roberts B. Effect of cyclosporine-A on connective tissue deposition in experimental inflammatory lesions. *Matrix* 1989c, 9:293-300

Bartold PM, Haynes DR. IL6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1991, 26:339-345

Bartold PM, Narayanan AS, Page RC. Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *J Periodont Res* 1992, 27:499-505

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Atlas en color y texto de Anatomía Oral. Histología y Embriología. 1977, 2ª edición 1992, Mosby/Doyma libros: 199-212

Bermejo F, del Ser T, Muñoz D, Estenoz J, Calandre L. La deficiencia de ácido fólico originada por el tratamiento anticomicial crónico. Análisis en una serie de 100 pacientes epilépticos. *Med Clin* 1985, 85:6-12

Bitu CC, Sobral LM, Kellermann MG, Martelli-Junior H, Zecchin KG, Graner E, Colletta RD. Heterogeneous presence of myofibroblasts in hereditary gingival fibromatosis. *J Clin Periodontol* 2006; 33:393-400

BIBLIOGRAFÍA

Bökenkamp A, Bohnhorst B, Beier C, Albers N, Offner G, Brodehl J. Nifedipine aggravates cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. *Pediatr Nephrol* 1994, 8:181-185

Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int* 1999, 30:775-783

Bolzani G, Coletta RD, Martelli-Junior H, Graner E. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 2000, 35:51-58

Bonnaure-Mallet M, Tricot-Doleux S, Godeau GJ. Changes in extracellular matrix macromolecules in human gingiva after treatment with drugs inducing gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* 1995, 40:393-400

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994, 331:1286-1293

Bosi G, Evangelisti R, Valeno V, Carinci F, Pezzetti F, Calastrini C, Bodo M, Carinci P. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. *J Dent Res* 1998, 77:1613-1621

Bostanci N, Ilgenli T, Pirhan DC, Clarke FM, Marcenes W, Atilla G, Hughes FJ, Mckay IJ. Relationship between IL-1 α polymorphisms and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving cyclosporin A. *J Clin Periodontol* 2006, 33:771-778

Bowman JM, Levy BA, Grubb RV. Gingival overgrowth induced by diltiazem. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988, 65:183-185

Brown RS, Sein P, Corio R, Bottomley WK. Nitrendipine-induced gingival hyperplasia: First case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990, 70:593-596

Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK. On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 1991a, 20:201-209

BIBLIOGRAFÍA

Brown RS, Di Stanislao PT, Beaver WT, Bottomley WK. The administration of folic acid to institutionalized epileptic adults with phenytoin-induced gingival hyperplasia. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991b, 71:565-568

Brunet LI, Miranda J, Roset P, Berini L, Farré M, Mendieta C. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with anticonvulsivant drugs. *Eur J Clin Invest* 2001, 31:781-788

Brunius G, Modéer T. Effect of phenytoin on intracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 1989, 18:485-489

Bulut S, Ozdemir BH, Alaaddinoglu EE, Oduncuoglu FB, Bulut OE, Demirhan B. Effect of cyclosporine A on apoptosis and expression of p53 and bcl-2 proteins in the gingiva of renal transplant patients. *J Periodontol* 2005, 76:691-695

Bustos DA, Grenon MS, Benitez M, de Boccardo G, Pavan JV, Gendelman H. Human papillomavirus infection in cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal allograft recipients. *J Periodontol* 2001, 72: 741-744

Butler M. *Animal cell culture and technology. The Basics.* Irl Press at Oxford University press. 1996

Capoglu I, Yilmaz AB, Unuvar N, Orbak R, Aksoy H, Yesilyurt H. Gingival enlargement in acromegaly. *Endocrine* 2002, 18:207-210

Casal M, Liébana J. Relación hospedador-bacteria (II). Resistencia inespecífica a la infección. En: Liébana J, *Microbiología oral*, ed. Interamericana, Mc Graw-Hill 1995, 102-113

Cebeci I, Kantarci A, Firatli E, Aygun S, Tanyeri H, Aydin AE, Carin M, Guc U, Tuncer O. Evaluation of the frequency of HLA determinants in patients with gingival overgrowth induced by cyclosporine-A. *J Clin Periodontol* 1996a, 23:737-742

Cebeci I, Kantarci A, Firatli E, Carin M, Tuncer O. The effect of verapamil on the prevalence and severity of cyclosporine-induced gingival overgrowth in renal allograft recipients. *J Periodontol* 1996b, 67:1201-1205

BIBLIOGRAFÍA

Chabria D, Weintraub RG, Kilpatrick NM. Mechanisms and management of gingival overgrowth in paediatric transplant recipients: a review. *Internat J Paediatric Dent* 2003, 13:220-229

Chand DH, Quattrocchi J, Poe SA, Terezhalmay GT, Strife CF, Cunningham RJ. Trial of metronidazole vs. azithromycin for treatment of cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Pediatric Transplantation* 2004, 8:60

Chee WW, Jansen CE. Phenytoin hyperplasia occurring in relation to titanium implants: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994, 9:107-109

Chiu HC, Fu E, Chiang CY, Liu D. Does nifedipine aggravate cyclosporin-induced gingival overgrowth? An experiment in rats. *J Periodontol* 2001, 72:532-537

Ciantar M. Nifedipine-induced gingival overgrowth: remission following non-surgical therapy. *Dent Update* 1996, 23:374-377

Cochran DL, Griff D, Wisner LA. Effects of growth regulators on protein synthesis in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1989, 68:361. 1438

Cockey G, Maguire J, Hassell TM, Provenza D. Effects of the methylcatechol metabolite of phenytoin on human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1986, 65:353. 1657

Cockey G, Boughman J, Hassell TM. Phenytoin response of gingival fibroblasts from human twins. *J Dent Res* 1987, 66(Special issue):320. 1711

Coletta RD, Almeida OP, Graner E, Page RC, Bozzo L. Differential proliferation of fibroblasts cultured from hereditary gingival fibromatosis and normal gingiva. *J Periodont Res* 1998, 33:469-475

Coletta RD, Almeida OP, Reynolds MA, Sauk JJ. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- β 1 autocrine stimulation. *J Periodont Res* 1999, 34:457-463

Coley C, Jarvis K, Hassell T. Effect of cyclosporine-A on human gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1986, 65:353. 1658

BIBLIOGRAFÍA

Colombani PM, Robb A, Hess AD. Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. *Sciences* 1985, 228:337-339

Consejo General de Colegios Oficiales de farmaceuticos. Guía de prescripción 1994. 7ª ed. Edición y distribución: Consejo General de Colegios Oficiales de farmaceuticos;

Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)- β 1 autocrine stimulation. *J Periodontol* 2002, 73:1313-1322

Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor β 1. *J Periodontol* 2003, 74:1625-1633

Czuszak CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E₂ potentiates interleukin-1 β induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1996, 23:635-640

Dabbous M, Tipton D, Babu J, Haney L, Stricklin G. Collagenolytic activity in gingival hyperplasia. *J Dent Res* 1986, 65:331. 1460

Dahllöf G, Modéer T. The effect of a plaque control program on the development of phenytoin-induced gingival overgrowth. A 2-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 1986, 13:845-849

Dahllöf G, Otteskog P, Modéer T. Phenytoin potentiates accessory cell dependent DNA-synthesis in human lymphocytes in vitro. *Scand J Dent Res* 1986a, 94:202-207

Dahllöf G, Modéer T, Reinholt FP, Wikström B, Hjerpe A. Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 1986b, 21:13-21

Dahllöf G, Hjerpe A. Synthesis of sulfated glycosaminoglycans by human gingival fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth in vitro. *Scand J Dent Res* 1987, 95:250-255

BIBLIOGRAFÍA

Dahllöf G, Axio E, Modéer T. Regression of phenytoin-induced gingival overgrowth after withdrawal of medication. *J Swed Dent* 1991, 15:139-143

Daley TD, Wysocki GP. Cyclosporine therapy. Its significance to the periodontist. *J Periodontol* 1984, 55:708-712

Daley TD, Wysocki GP, Day C. Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986, 62:417-421

Daly CG. Resolution of cyclosporin A (CsA)-induced gingival enlargement following reduction in CsA dosage. *J Clin Periodontol* 1992, 19:143-145

Das SJ, Olsen I. Keratinocyte growth factor is upregulated by the hyperplasia-inducing drug nifedipine. *Cytokine* 2000, 12:1566-1569

Das SJ, Olsen I. Up-regulation of keratinocyte growth factor and receptor: a possible mechanism of action of phenytoin in wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 282:875-881

Das SJ, Parkar MH, Olsen I. Up-regulation of keratinocyte growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001, 72: 745-752

De Oliveira Costa F, Diniz Ferreira S, de Miranda Cota LO, da Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens. *J Periodontol* 2006, 77:969-975

Del-Nero G, Del-Nero MO, Del-Nero I, Del-Nero MJ, Sarmiento L. El periodonto como huésped -Periodontium as a host- un concepto clínicamente útil -a clinical useful concept-. Editorial MIC SL 1998

Deliliers GL, Santoro F, Polli N, Bruno E, Fumagalli L, Risciotti E. Light and electron microscopic study of cyclosporin-A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1986, 57:771-775

BIBLIOGRAFÍA

Dill RE, Miller EK, Weil T, Lesley S, Farmer GR, Iacopino AM. Phenytoin increases gene expression for platelet-derived growth factor B chain in macrophages and monocytes. *J Periodontol* 1993, 64:169-173

Dill RE, Iacopino AM. Myofibroblasts in phenytoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J Periodontol* 1997, 68:375-380

Dogan A, Tunca Y, Ozdemir A, Sengul A, Imirzalioglu N. The effects of folic acid application on IL-1 beta levels of human gingival fibroblasts stimulated by phenytoin and TNF alpha in vitro: a preliminary study. *J Oral Sci* 2001, 43:255-260

Domeij H, Modèer T, Yucel-Lindberg T. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblasts: the role of protein kinase C. *J Periodont Res* 2004, 39:308-314

Dongari A, McDonnell HT, Langlais RP. Drug-induced gingival overgrowth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993, 76:543-548

Drew H, Vogel R. Effect of folic acid on phenytoin induced gingival hyperplasia. *J Dent Res* 1986, 65:331. 1459

Dreyer WP, Thomas CJ. Diphenylhydantoinate-induced hyperplasia of the masticatory mucosa in an edentulous epileptic patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978, 45:701-706

Ellis JS, Seymour RA, Monkman SC, Idle JR. Gingival sequestration of nifedipine in nifedipine-induced gingival overgrowth. *Lancet* 1992, 339:1382-1383

Ellis JS, Seymour RA, Thomason JM, Monkman SC, Idle JR. Gingival sequestration of amlodipine and amlodipine-induced gingival overgrowth (letter). *Lancet* 1993a, 341:1102-1103

Ellis JS, Seymour RA, Monkman SC, Idle JR. Disposition of nifedipine in plasma and gingival crevicular fluid in relation to drug-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 1993b, 28:373-378

BIBLIOGRAFÍA

Ellis JS, Seymour RA, Thomason JM, Butler TJ, Idle JR. Periodontal variables affecting nifedipine sequestration in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1995, 30:272-276

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

Ellis JS, Seymour RA, Taylor JJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. *J Clin Periodontol* 2004a, 31:126-131

Ellis JS, Morgan CL, Kirby JA, Taylor JJ, Thomason JM. Plasma TGF-beta 1 as risk factor for gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2004b, 31:863-868

Fan XF, Scott PG. Cyclosporin effects on gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1989, 68:288. 854

Friskopp J, Klintmalm, G. Gingival enlargement. A comparison between cyclosporine and azathioprine treated renal allograft recipients. *Swed Dent J* 1986, 10:85-92

Fu E, Nieh S, Wikesjö UM, Lin FG, Shen EC. Gingival overgrowth and dental alveolar alterations: possible mechanisms of cyclosporine-induced tooth migration. An experimental study in the rat. *J Periodontol* 1997, 68:1231-1236

Fujii A, Matsumoto H, Nakro S, Teshigawara H, Akimoto Y. Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non responders. *Arch Oral Biol* 1994, 39:99-104

Fujimori Y, Maeda S, Saeki M, Morisaki I, Kamisaki Y. Inhibition by nifedipine of adherence- and activated macrophage-induced death of human gingival fibroblasts. *European J Pharmacol* 2001, 415:95-103

BIBLIOGRAFÍA

Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF, Gioia M. Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother* 2004, 58:231-238

Gagliano N, Moscheni C, Torri C, Dellavia C, Stabellini G, Ferrario VF, Gioia M. Differential effect of cyclosporin A and FK506 on SPARC mRNA expression by human gingival fibroblasts. *Biomed Pharmacother* 2005, 59:249-252

García AG, Gálvez-Música MA, Abad-Santos F. Fármacos antagonistas del calcio. En: Florez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología humana*; Masson 4ª ed. 2003, Reimpresión 2004, 665-674

García CR, Seoane RP, Aguilera AG, Regueiro BG. Relación hospedador-bacteria (I). En: Liébana J, *Microbiología oral*, 1ª ed. Interamericana, Mc Graw-Hill 1995, 90-99

Gartner LP, Hiatt JL. *Histología, texto y atlas*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana 1997: 66-69

Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. *Periodoncia* 1990. 1ª edición español 1993. Ed. Interamericana, McGraw-Hill

Genco RJ. Host responses in Periodontal diseases: Current concepts. *J Periodontol* 1992, 63:338-355

Gilhus NE, Aarli JA. The reversibility of phenytoin-induced IgA deficiency. *J Neurol* 1981, 226:53-61

Gizgis SS, Staple PH, Miller WA, Sedranks N, Thompson T. Dental root abnormalities and gingival overgrowth in epileptic patients receiving anti-convulsant therapy. *J Periodontol* 1980, 51:474-482

Gnoatto N, Lotufo RFM, Toffoletto O, Marquezini MV. Gene expression of extracellular matrix proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2003, 74:1747-1753

BIBLIOGRAFÍA

Gornstein RA, Lapp CA, Bustos-Valdés SM, Zamorano P. Androgens modulate interleukin-6 production by gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1999, 70:604-609

Grünheid T, Zentner A. Extracellular matrix synthesis, proliferation and death in mechanically stimulated human gingival fibroblasts in vitro. *Clin Oral Invest* 2005, 9:124-130

Günham O, Gardner DG, Bostanci H, Günham M. Familial gingival fibromatosis with unusual histologic findings. *J Periodontol* 1995, 66:1008-1011

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología médica*. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana 9ª edición 1996, 2ª reimpresión 1999, 609-629

Hall BK, Squire CA. Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin induced gingival overgrowth in the ferret. *J Dent Res* 1982, 61:942-952

Hancock RH, Swan RH. Nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1992, 19:12-14

Harel-Raviv M, Eckler M, Lalani K, Raviv E, Gornitsky M. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A comprehensive review and analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995, 79:715-722

Hasan AA, Ciancio S. Relationship between amphetamine ingestion and gingival enlargement. *Pediatr Dent* 2004, 26:396-400

Hassell TM, Page RC, Narayanan AS, Cooper CG. Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: Drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73:2909-2912

Hassell Tm, Page RC, Lindhe J. Histologic evidence for impaired growth control in diphenylhydantoin gingival overgrowth in man. *Arch Oral Biol* 1978, 23:381-384

Hassell TM. Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae. *J Oral Pathol* 1982, 11:310-317

BIBLIOGRAFÍA

Hassell TM, Roebuck S, Page RC, Wray SH. Quantitative histopathologic assessment of developing phenytoin-induced gingival overgrowth in the cat. *J Clin Periodontol* 1982, 9:365-372

Hassell T, O'Donnell J, Pearlman J, Tesini D, Best H, Murphy T. Salivary phenytoin levels in institutionalized epileptics. *J Chronic Dis* 1983, 36:899-906

Hassell TM, Gilbert GH. Phenytoin sensitivity of fibroblasts is the basis for susceptibility to gingival enlargement. *Am J Pathol* 1983, 112:218-223

Hassell TM, Stanek EJ 3rd. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch Oral Biol* 1983, 28:617-625

Hassell T, O'Donnell J, Pearlman J, Tesini D, Murphy T, Best H. Phenytoin induced gingival overgrowth in institutionalized epileptics. *J Clin Periodontol* 1984, 11:242-253

Hassell TM, Romberg E, Sobhani S, Lesko L, Douglas R. Lymphocyte-mediated effects of cyclosporine on human fibroblasts. *Transplant Proc* 1988, 20:993-1002

Hassell TM, Thompson S, Burks J. Functional phenotype of fibroblasts from normal and dihydropyridine-enlarged human gingiva. *J Dent Res* 1991, 70:470. 1636

Hassell TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991, 2:103-137

Hefti AF, Eshenaur AE, Hassell TM, Stone C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. *J Periodontol* 1994, 65:744-749

Heiji L, Sundin Y. Nitrendipine-induced gingival overgrowth in dogs. *J Periodontol* 1988, 60:104-112

Hernández G, Arriba L, Lucas M, de Andrés A. Reduction of severe gingival overgrowth in a kidney transplant patient by replacing cyclosporin A with tacrolimus. *J Periodontol* 2000, 71:1630-1636

BIBLIOGRAFÍA

Hernández G, Arriba L, Frías MC, de la Macorra JC, de Vicente JC, Jiménez C, de Andrés A, Moreno E. Conversion from cyclosporin A to tacrolimus as a non-surgical alternative to reduce gingival enlargement: a preliminary case series. *J Periodontol* 2003, 74:1816-1823

Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W. Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Science* 1999, 112:2823-2832

Hormia M, Willberg J, Ruokonen H, Syrjanen S. Marginal periodontium as a potential reservoir of human papillomavirus in oral mucosa. *J Periodontol* 2005, 76:358-363

Hosey MT, Gordon G, Kelly DA, Shaw L. Oral findings in children with liver transplants. *Int J Paediatr Dent* 1995, 5:29-34

Hosey MT, Davison SM, Gordon G, Shaw L, Kelly DA. Cytomegalovirus and cyclosporin-induced gingival overgrowth in children with liver grafts. *Int J Paediatr Dent* 2002, 12:236-243

Huang JS, Ho KY, Kaohsiung YMW. Co-occurrence of gingival fibromatosis and hypertrichosis. *J Dent Res* 1986, 65:331. 1461

Huey J, Narayanan AS, Jones K, Page RC. Effect of epidermal growth factor on the synthetic activity of human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1980, 632:227-233

Iacopino AM, Doxey D, Cutler CW, Nares S, Stoeber K, Fojt J, Gonzales A, Dill RE. Phenytoin and cyclosporine A specifically regulate macrophage phenotype and expression of platelet-derived growth factor and interleukin-1 "in vitro" and "in vivo": possible molecular mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1997, 68:73-83

Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. Review. *Oral Dis* 1998, 4:43-47

Ishida H, Kondoh T, Kataoka M, Nishikawa S, Nakagawa T, Morisaki I, Kido J, Oka T, Nagata T. Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol* 1995, 66:345-350

BIBLIOGRAFÍA

James JA, Irwin CR, Linden GJ. The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblasts to cyclosporin A. *J Periodontol* 1995, 66:339-344

James JA, Irwin CR, Linden GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporine A and transforming growth factor beta 1. *J Periodont Res* 1998, 33:40-48

James JA, Marley JJ, Jamal S, Campbell BA, Short CD, Johnson RW, Hull PS, Spratt H, Irwin CR, Boomer S, Maxwell AP, Linden GJ. The calcium channel blocker used with cyclosporin has an effect on gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2000a, 27:109-115

James JA, Boomer S, Maxwell AP, Hull PS, Short CD, Campbell BA, Johnson RW, Irwin CR, Marley JJ, Spratt H, Linden GJ. Reduction in gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. *J Clin Periodontol* 2000b, 27:144-148

Johnson BD, El-Guindy M, Ammons WF, Narayanan S, Page RC. A defect in fibroblasts from an unidentified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J Periodont Res* 1986, 21:403-413

Johnson BD, Narayanan AS, Pieters HP, Page RC. Effect of cell donor age on the synthetic properties of fibroblasts from phenytoin-induced gingival hyperplasia. *J Periodont Res* 1990, 25:74-80

Johnson RB, Zebrowski EJ, Dai X. Synergistic enhancement of collagenous protein synthesis by human gingival fibroblasts exposed to nifedipine and interleukin-1-beta in vitro. *J Oral Pathol Med* 2000, 29:8-12

Jorgensen M. Prevalence of amlodipine-related gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1997, 68:676-678

Juncadella E, Fandos JM, Alba J, Descarrega R. Hiperplasia gingival inducida por amlodipino. *Med Clin (Barcelona)* 1994, 103:358-359

Kähäri VM, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor beta 1 up-regulates biglycan (PGI) and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1991, 266:10608-10615

BIBLIOGRAFÍA

Kamali F, McLaughlin WS, Ball DE, Seymour RA. The effect of multiple anticonvulsant therapy on the expression of phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1999, 26:802-805

Kantarci A, Cebeci I, Tuncer O, Çarın M, Firatlı E. Clinical effects of periodontal therapy on the severity of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1999, 70:587-593

Kantor ML, Hassell TM. Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Dent Res* 1983, 62:383-387

Karpinia KA, Matt M, Fennell RS 3rd, Hefti AF. Factors affecting cyclosporine-induced gingival overgrowth in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Dent* 1996, 18:450-455

Kasasa SC, Soory M. The synthesis of 5-alpha-dihydrotestosterone from androgens by human gingival tissues and fibroblasts in culture in response to TGF-beta and PDGF. *J Periodont Res* 1996, 31:313-322

Kasasa SC, Soory M. The effect of PDGF, TGF- β , and IGF in combination on androgen metabolism by fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1998, 25:640-646

Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, Morisaki I, Ohsaki Y, Kido JI, Nagata T. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 2000, 182:351-358

Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Azuma H, Sawa T, Kido J, Nagata T. Nifedipine induces gingival overgrowth through a reduction collagen phagocytosis by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2001, 72:1078-1083

Kato T, Okahashi N, Kawai S, Kato T, Inaba H, Morisaki I, Amano A. Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. *J Periodontol* 2005, 76:941-950

Katz J, Rotstein I, Ben Yehuda A, Barak S. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. *Ann Dent* 1992, Summer 51:5-7

BIBLIOGRAFÍA

Katz J, Givol N, Chaushu G, Taicher S, Shemer J. Vigabatrin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1997, 24:180-182

Kaufman AY. An oral contraceptive as an aetiological factor in producing hyperplastic gingivitis and a neoplasm of the pregnancy tumour type. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969, 28:666-670

Kaur J, Singh P, Levine D. Cytomegalovirus-induced gingival hyperplasia. *Clin Infect Dis* 2003, 37:44-46

Khoori AH, Einollahi B, Ansari G, Moozeh MB. The effect of cyclosporine with and without nifedipine on gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Can Dent Assoc* 2003, 69:236-241

Kilpatrick NM, Weintraub RG, Lucas JO, Shipp A, Byrt T, Wilkinson JL. Gingival overgrowth in pediatric heart and heart lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1997, 16:1231-1237

Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Interacciones entre el huésped y el parásito en la enfermedad periodontal. En: Lindhe J, Karring T, Lang N. *Periodontología clínica e Implantología odontológica*, Editorial Médica Panamericana 4ª edición 2005:157-187

King GN, Fullinfaw R, Higgins TJ, Walker RG, Francis DMA and Wiesenfeld D. Gingival hyperplasia in renal allograft recipients receiving cyclosporin-A and calcium antagonists. *J Clin Periodontol* 1993, 20:286-293

Koh JT, Kim OJ, Park YS, Kim SH, Kim WJ, Chung HJ, Lee SE, Jeong BC, Jung JY, Kim KK. Decreased expressions of thrombospondin 2 in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 2004, 39:93-100

Kudlacek S, Zlabinger GJ, Pohanka E, Hamilton G, Rosenmayr A, Kovarik J. Insensitivity to cyclosporine may explain the HLA-DRw6 recipient effect. *Transpl Int* 1992, 5 Suppl 1:556-558

Laskaris G. *Atlas de enfermedades orales*. Ed Masson 2005

Leung WK, Yau JY, Jin LJ, Chan AW, Chu FC, Tsang CS, Chan TM. Subgingival microbiota of renal transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol* 2003, 18:3-44

BIBLIOGRAFÍA

Liébana JU, Castillo AMP, García AM. Determinantes ecológicos orales. En: *Microbiología Oral*, Mc Graw-Hill. Interamericana de España, 1ª edición 1995, 410-427

Liébana JU, Baca PG. *Microbiología de las placas dentales*. En: *Microbiología Oral*. Mc Graw-Hill. Interamericana de España, 1ª edición 1995, 430-445

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Anatomía del Periodonto. En: Lindhe J, Karring T, Lang N. *Periodontología clínica e Implantología odontológica*, ed. Panamericana, 4ª edición 2005, 3-50

Little TM, Girgis SS, Masotti RE. Diphenylhydantoin-induced gingival hyperplasia: its response to changes in drug dosage. *Dev Med Child Neurol* 1975, 17:421-424

Löe H, Listgarten MA, Terranova VP. La encía, estructura y función. En: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. *Periodoncia*, ed. Interamericana, Mc Graw-Hill, edición 1993 en español, 3-31

Lohi J, Kähäri VM, Keski-Oja J. Cyclosporin A enhances cytokine and phorbol ester-induced fibroblast collagenase expression. *J Invest Dermatol* 1994, 102:938-944

Lombardi T, Fiore-Donno G, Belser U, Di Felice R. Felodipine-induced gingival hyperplasia: a clinical and histologic study. *J Oral Pathol Med* 1991, 20:89-92

Lowry LY, Welbury RR, Seymour RA, Waterhouse PJ, Hamilton JR. Gingival overgrowth in paediatric cardiac transplant patients: a study of 19 patients aged between 2 and 16 years. *Int J Paediatric Dent* 1995, 5:217-222

Lozano JA, Galindo JD, Garcia-Borrón JC, Martínez Liarte JH, Peñafiel R, Solano F. Inmunoquímica, en *Bioquímica para ciencias de la salud*, 1995 1ª edición en español. McGraw-Hill-Interamericana en España: 443-459

Lucas RM, Howell LP, Wall BA. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study. *J Periodontol* 1985, 56:211-215

BIBLIOGRAFÍA

Maguire J, Greenwood R, Lewis D, Hassell T. Phenytoin -induced gingival overgrowth incidence is dependent on comedication. *J Dent Res* 1986, 65:249-714

Majola MP, Mc Fadyen ML, Connoly C, Nair YP, Govender M, Laher MH. Factors influencing phenytoin-induced gingival enlargement. *J Clin Periodontol* 2000, 27:506-512

Margiotta V, Pizzo I, Pizzo G, Barbaro A. Cyclosporin-and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA-antigens. *J Oral Pathol Med* 1996, 25:128-134

Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Bergamini L, Calastrini F, Stabellini G. Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1996, 67:21-27

Mariani G, Calastrini C, Aleotti A, Carnevale E, Stabellini G. Ultrastructural changes in Langerhans cells in gingival overgrowth in cyclosporin A-treated renal transplant patients. *Pathology* 2004, 36:242-246

Mariotti A, Hassell T, Jacobs D, Manning CJ, Hefti AF. Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M-17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med* 1998, 27:260-266

Markopoulos AK, Belazi M, Drakoulakos D, Petrou-Americanou C, Sioulis A, Sakellari D, Papanayotou P. Epidermal growth factor in saliva and serum of patients with cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 2001, 36:88-91

Marshall RI, Bartold PM. Medication induced gingival overgrowth. Review. *Oral Diseases* 1998, 4:130-151

Martins RC, Werneck CC, Rocha LA, Feres-Filho EJ, Silva LC. Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin-and nifedipine-induced overgrowths. *J Periodont Res* 2003, 38:182-189

Mathur H, Moretti AJ, Flaitz CM. Regression of cyclosporin A-induced gingival overgrowth upon interruption of drug therapy. *Gen Dent* 2003, 51:159-162

BIBLIOGRAFÍA

Matsumoto H, Noji I, Akimoto Y, Fujii A. Comparative study of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA and collagen syntheses, and EGF receptors of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine, nicardipine and nisoldipine responders. *J Oral Sci* 2001, 43:261-268

Mauviel A, Heino J, Kähäri VM, Hartmann DJ, Loyau G, Pujol JP, Vuorio E. Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1991, 96:243-249

Mc Cord JF, Sloan P, Hussey DJ. Phenytoin hyperplasia occurring under complete dentures: A clinical report. *J Prost Dent* 1992, 68:569-572

McGaw T, Lam S, Coates J. Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporin levels in serum and saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987, 64:293-297

McGaw T, Porter H. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988, 65:186-190

McLaughlin WS, Ball DE, Seymour RA, Kamali F, White K. The pharmacokinetics of phenytoin in gingival crevicular fluid and plasma in relation to gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1995, 22:942-945

McKaig SJ, Kelly D, Shaw L. Investigation of the effect of FK-506 (tacrolimus) and cyclosporin on gingival overgrowth following paediatric liver transplantation. *Int J Paediatric Dent* 2002, 12:398-403

Mendieta CF, Reeve CM, Romero JC. Biosynthesis of prostaglandins in gingiva of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 1985, 56:44-47

Mendieta C. Biosíntesis de prostaglandinas en la enfermedad periodontal crónica. Tesis Doctoral 1988. Universitat de Barcelona

Mendieta C. Metabolismo del ácido araquidónico en la enfermedad periodontal. *Rev Eur Oe* 1989, 1:249-254

BIBLIOGRAFÍA

Mendieta C. Clasificación de las enfermedades periodontales. *Av Oe* 1995, 11(Suppl.B):135-143

Metzler K, Beiraghi S, Shanfeld J. Effect of cyclosporin on cAMP level in cultured gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1989, 68:361. 1436

Miller JE. Collagen types: structure, distribution and functions. In: Nimni ME. *Collagen, Biochemistry* 1988, I:139-157

Miller CS, Damm DD. Incidence of verapamil-induced gingival hyperplasia in a dental population. *J Periodontol* 1992, 63:453-456

Miranda J. Estudi de Prevalença del Dismorfisme Gingival, Engrandiment Gingival en Pacients Tractats amb: Bloquejadors dels Canals del Calci. Tesis Doctoral 1997. Universitat de Barcelona

Miranda J, Brunet LI, Roset P, Berini L, Farré M, Mendieta C. Prevalence and risk of gingival enlargement in patients treated with nifedipine. *J Periodontol* 2001, 72:605-611

Miranda J, Brunet L, Roset P, Berini L, Farré M, Mendieta C. Prevalence and risk of gingival overgrowth in patients treated with diltiazem or verapamil. *J Clin Periodontol* 2005, 32:294-298

Modéer T, Dahllöf G, Otteskog P. The effect of the phenytoin metabolite p-HPPH on proliferation of gingival fibroblasts in vitro. *Acta Odontol Scand* 1982, 40:353-357

Modéer T, Dahllöf G. Development of phenytoin-induced gingival overgrowth in non-institutionalized epileptic children subjected to different plaque control programs. *Acta Odontol Scand* 1987, 45:81-85

Modéer T, Dahllöf G, Otteskog P. Potentiation of fibroblast spreading by extracellular matrix from fibroblasts derived from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Acta Odontol Scand* 1988, 46:101-104

Modéer T, Dahllöf G, Karsten J, Otteskog P. Potentiation of fibroblast DNA synthesis by a phenytoin-induced mononuclear cell derived factor in vitro. Short communication. *Scand J Dent Res* 1989, 97: 186-187

BIBLIOGRAFÍA

Modéer T, Andersson G. Regulation of epidermal growth factor receptor metabolism in gingival fibroblasts by phenytoin in vitro. *J Oral Pathol Med* 1990, 19:188-191

Modéer T, Mendez C, Dahllöf G, Anduren I, Andersson G. Effect of phenytoin medication on the metabolism of epidermal growth factor receptor in cultured gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1990, 25:120-127

Modéer T, Brunius G, Mendez C, Juntti-Berggren L, Berggren PO. Influence of phenytoin on cytoplasmic free Ca^{2+} level in human gingival fibroblasts. *Scand J Dent Res* 1991, 99:310-315

Modéer T, Wondimu B, Larsson E, Jonzon B. Levels of cyclosporin-A (CsA) in saliva in children after oral administration of the drug in mixture or in capsule form. *Scand J Dent Res* 1992a, 100:366-370

Modéer T, Brunius G, Iinuma M, Lerner UH. Phenytoin potentiates interleukin-1-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts. *Brit J Pharmacol* 1992b, 106:574-578

Modéer T, Anduren I, Lerner UH. Enhanced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts isolated from patients treated with phenytoin. *J Oral Pathol Med* 1992c, 21:251-255

Modéer T, Anduren I, Bengtsson A, Andersson G. Interleukin-1 β and phenytoin reduce $\alpha 1$ (I) procollagen mRNA expression in human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1996, 31:563-568

Montebugnoli L, Bernardi F, Magelli C. Cyclosporin-A-induced gingival overgrowth in heart transplant patients. A cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 1996, 23:868-872

Montebugnoli L, Bernardi F. Cyclosporin A effects on extra oral connective tissue in heart transplanted patients. *J Inter Academy Periodontol* 1999, 1:91-94

Montebugnoli L, Servidio D, Bernardi F. The rôle of time in reducing gingival overgrowth in heart-transplanted patients following cyclosporin therapy. *J Clin Periodontol* 2000, 27:611-614

BIBLIOGRAFÍA

Morisaki I, Kato K, Loyola-Rodriguez JP, Nagata T, Ishida H. Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats. *J Periodont Res* 1993, 28:396-403

Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Regulation of gingival fibroblast interleukin-6 secretion by cyclosporine A. *J Periodontol* 1999, 70:1464-1471

Moy LS, Tan EM, Holness R, Uitto J. Phenytoin modulates connective tissue metabolism and cell proliferation in human skin fibroblast cultures. *Arch Dermatol* 1985, 121:79-83

Myrillas TT, Linden GJ, Marley JJ, Irwin CR. Cyclosporin A regulates interleukin-1 β and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999, 70:294-300

Nakou M, Kamma JJ, Andronikaki A, Mitsis F. Subgingival microflora associated with nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1998, 69:664-669

Narayanan AS, Page RC. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts from normal and diseased human gingiva. *J Biol Chem* 1976, 251:5464-5471

Narayanan AS, Page RC. Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. *J Biol Chem* 1983, 258:11694-11699

Narayanan AS, Engel LD, Page RC. The effect of chronic inflammation on the composition of collagen types in human connective tissue. *Coll Relat Res* 1983, 3:323-334

Narayanan AS, Page RC. Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. *Coll Relat Res* 1985, 5:297-304

Narayanan AS, Hassell TM. Characterization of collagens in phenytoin-enlarged human gingiva. *Coll Relat Res* 1985, 5:513-518

Narayanan AS, Meyers DF, Page RC. Transcriptional regulation of collagen biosynthesis in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1986, 65:330. 1448

BIBLIOGRAFÍA

Narayanan AS, Page RC. Serum regulation of collagen biosynthesis in human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 145:639-645

Narayanan AS, Meyers DF, Page RC. Regulation of collagen production in fibroblasts cultured from normal and phenytoin-induced hyperplastic human gingiva. *J Periodont Res* 1988, 23:118-121

Narayanan AS, Page RC, Swanson J. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem J* 1989, 260:463-469

Nares S, Ng MC, Dill RE, Park B, Cutler CW, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates platelet-derived growth factor B chain in hyperplastic human gingiva. *J Periodontol* 1996, 67:271-278

Nell A, Matejka M, Solar P, Ulm C, Sinzinger H. Evidence that cyclosporine inhibits periodontal prostaglandin I₂ synthesis. *J Periodont Res* 1996, 31:131-134

Nery EB, Edson RG, Lee KK, Pruthi VK, Watson J. Prevalence of nifedipine-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1995, 66:572-578

Newell J, Irwin CR. Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1997, 68:443-447

Nezelof C, Galle P, Hinglais N. Técnicas microscópicas. Exámenes de laboratorio. Editorial JIMS, 1ª edición española 1975, 39-43, 53-58, 60, 67

Nimni ME, Harkness RD. Molecular structure and functions of collagen. In: Nimni ME. *Collagen, Biochemistry* 1988, I:1-61

Nishikawa S, Tada H, Hamasaki A, Kasahra S, Kido J, Nagata T, Ishida H, Wakano Y. Nifedipine induced gingival hyperplasia: a clinical and in vitro study. *J Periodontol* 1991, 62:30-35

Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol* 1996, 67:463-471

BIBLIOGRAFÍA

Norris JF, Cunliffe W. Phenytoin-induced gum hypertrophy improved by isotretinoin. *Int J Dermatol* 1987, 26:602-603

Nowzari H, Jorgensen MG, Aswad S, Khan N, Osorio E, Safarian A, Shidban H, Munroe S. Human cytomegalovirus-associated periodontitis in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2003, 35:2949-2952

Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuutila MLH. Mitotic activity of keratinocytes in nifedipine and immunosuppressive medication induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001, 72:167-173

Nyska A, Waner T, Pirak M, Galiano A, Zlotogorski A. Gingival hyperplasia in rats induced by oxodipine -a calcium channel blocker. *J Perio Res* 1990, 25:65-68

Offenbacher S. Effects of dilantin on monocytic growth factors. Guest editorial. *J Periodontol* 1993, 64:237-238

O'Hara AJ, Collins T, Howell JMC. Gingival eruption cysts induced by cyclosporine administration to neonatal dogs. *J Clin Periodontol* 2002, 29:507-513

Ojanotko-Harri A, Forssell H, Laine M, Hurttia H, Bläuer M, Tuohimaa P. Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1992, 37:511-514

Olesen OV, Jensen ON. The influence of folic acid on phenytoin (DPH) metabolism and the 24 hours fluctuation in urinary output of 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH). *Act Pharmacol Toxicol* 1970, 28:265-269

Paik JW, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Inhibition of cyclosporin A-induced gingival overgrowth by azithromycin through phagocytosis: an in vivo and in vitro study. *J Periodontol* 2004, 75:380-387

Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 1992, 63:356-366

Panuska HJ, Gorlin RJ, Bearman JE, Mitchell DF. The effect of anticonvulsant drugs upon the gingiva. A series of analyses of 1048 patients (I). *J Periodontol* 1960, 31:336-344

BIBLIOGRAFÍA

Panuska HJ, Gorlin RJ, Bearman JE, Mitchell DF. The effect of anticonvulsant drugs upon the gingiva. A series of analyses of 1048 patients (II). *J Periodontol* 1961, 32:15-28

Pagliarini A, Stabellini G, Carinci F, Calura G, Tognon M, Evangelisti R. Heterogeneity of fibroblasts derived from human free and attached gingiva. Glycosaminoglycan synthesis and effects of phenytoin (PHT) treatment. *J Oral Pathol Med* 1995, 24:72-77

Pascual-Castroviejo I, Pascual Pascual SI. Hiperplasia gingival inducida por nicardipina. *Neurología* 1997, 12:37-39

Peñafiel R. Replicación y transcripción del DNA. En: Lozano JA, Galindo JD, García-Borrón JC, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica para ciencias de la salud*, editorial interamericana McGraw-Hill, 1995a:359-378

Peñafiel R. Traducción proteica. En: Lozano JA, Galindo JD, García-Borrón JC, Martínez-Liarte JH, Peñafiel R, Solano F. *Bioquímica para ciencias de la salud*, editorial interamericana McGraw-Hill, 1995b:379-396

Peñarrocha Diago M, Bagán Sebastian JV, Antolín Rodríguez MM, Alfaro Giner A. Sobrecrecimiento gingival inducido por difenilhidantoína sódica. *Rev Eur Oe* 1989a, 1:41-48

Peñarrocha Diago M, Antolín Rodríguez MA, Alfaro Giner A, Pérez Sirvent ML. Hematologic alterations and reduction in serum folate in epileptics treated with anticonvulsants. *Neurologic* 1989b, 4:119-123

Peñarrocha Diago M, Bagán-Sebastian JV, Vera-Sempere F. Dyphenyl hydantoin-induced gingival overgrowth in man: a clinico-pathological study. *J Periodontol* 1990, 61:571-574

Pernu HE, Oikarinen K, Hietanen J, Knuutila M. Verapamil-induced gingival overgrowth: a clinical, histologic, and biochemic approach. *J Oral Pathol Med* 1989, 18:422-425

Pernu HE, Pernu LM, Huttunen KR, Nieminen PA, Knuutila ML. Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. *J Periodontol* 1992, 63:548-553

BIBLIOGRAFÍA

Pernu HE, Pernu LM, Knuutila ML. Effect of periodontal treatment on gingival overgrowth among cyclosporine A treated renal transplant recipients. *J Periodontol* 1993a, 64:1098-1100

Pernu HE, Pernu LM, Knuutila ML, Huttunen KR. Gingival overgrowth among renal transplant recipients and uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993b, 8:1254-1258

Pernu HE, Knuutila ML, Huttunen KR, Tiilikainen AS. Drug-induced gingival overgrowth and class II major histocompatibility antigens. *Transplant* 1994, 57:1811-1813

Pernu HE, Knuutila ML. Macrophages and lymphocyte subpopulations in nifedipine and cyclosporine A associated human gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001, 72:160-166

Perona M, Ibañez P, Sagredo E, Pino A, Ortiz G. Células de Langerhans en la encía normal, inflamada y con hiperplasia hidantoínica. *Av Oe* 1987, 3:57-65

Phillips B, Shen S, Lesko L, Emm T, Hassell TM. Levels of cyclosporine-A in human parotid fluid and whole saliva. *J Dent Res* 1986, 65:353. 1659

Pistorius A, Willershausen B, Callaway A. Effects of selected immunosuppressive drugs on prostaglandin release, protein synthesis and cell proliferation in human gingival fibroblasts and on the growth of plaque bacteria. *Eur J Med Res* 2003, 28:25-32

Plemons JM, Dill RE, Rees TD, Dyer BJ, Ng MC, Iacopino AM. PDGF-B producing cells and PDGF-B gene expression in normal gingiva and cyclosporine A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1996, 67:264-270

Poppell TD, Kecling SD, Collins JF, Hassell TM. Effect of folic acid on recurrence of phenytoin-induced gingival overgrowth following gingivectomy. *J Clin Periodontol* 1991, 18:134-139

Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1987, 165:251-256

BIBLIOGRAFÍA

Prasad VN, Chawla HS, Goyal A, Gauba K, Singhi P. Folic acid and phenytoin induced gingival overgrowth—is there a preventive effect. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2004, 22: 82-91

Rateitschak KH & EM, Wolf HF. *Atlas de Periodoncia*, Ed. Salvat, 2ª edición 1991

Roberts G, Beiraghi S, Shanfeld J, Wilson S, Casamassimo P. Effect of cyclosporin A on prostaglandin E in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1989, 68:361. 1435

Romanos GE, Schröter-Kermani C, Hinz N, Herrmann D, Strub JR, Bernimoulin JP. Extracellular matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth: immunohistochemical distribution of different collagen types as well as the glycoprotein fibronectin. *J Periodont Res* 1993, 28:10-16

Romito GA, Lotufo RF, Saraiva L, Pustiglioni AN, Pustiglioni FE, Stolf NA. Superinfecting microorganisms in patients under treatment with cyclosporin-A and its correlation to gingival overgrowth. *Pesqui Odontol Bras* 2003, 17:35-40

Romito GA, Pustiglioni FE, Saraiva L, Pustiglioni AN, Lotufo RF, Stolf NA. Relationship of subgingival and salivary microbiota to gingival overgrowth in heart transplant patients following cyclosporin A therapy. *J Periodontol* 2004, 75:918-924

Rostock MH, Fry HR, Turner JE. Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. *J Periodontol* 1986, 57:294-299

Saglam F, Onan U, Soyding M, Yilmaz O, Kiraç K, Sever MS. Human papillomavirus in a patient with severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. A case report. *J Periodontol* 1996, 67:528-531

Saito K, Mori S, Iwakura M, Sakamoto S. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodont Res* 1996, 31:545-555

BIBLIOGRAFÍA

Saito K, Mori S, Tanda N, Sakamoto S. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol* 1999, 70:581-586

Sakamoto R, Nitta T, Kamikawa Yo, Kono S, Kamikawa Ya, Sugihara K, Tsuyama S, Murata F. Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural studies of gingival fibromatosis: a case report. *Med Electron Microsc* 2002, 35:248-254

Sakellari D, Vouros I, Aristodemou E, Konstantinidis A, Socransky S, Goodson M. Tetracycline fibers as an adjunct in the treatment of nifedipine-induced gingival enlargement. Case series. *J Periodontol* 2005, 76:1034-1039

Salo T, Oikarinen KS, Oikarinen AI. Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med* 1990, 19:404-407

Sasaki T, Maita E. Increased bFGF level in the serum of patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1998, 25:42-47

Sato N, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A. The effect of IL1 α and nifedipine of cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Oral Sci* 2005, 47:105-110

Schincaglia GP, Forniti F, Cavallini R, Piva R, Calura G, del Senno L. Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 1992, 21: 181-185

Schulz A, Lange DE, Hassell TM, Stone CE, Lison AE. Cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant patients. *Dtsch Zahnarztl Z* 1990, 45:414-416

Seibel W, Lundberg JP, Lesko LJ, Sauk JJ, Mc Cleary LB, Hassell TM. Cutaneous papillomatous hyperplasia in cyclosporine A treated beagles. *J Invest Dermatol* 1989a,, 93:224-230

Seibel W, Yahia NA, Mc Cleary LB, Lesko LJ, Hassell TM. Cyclosporine-induced gingival overgrowth in beagle dogs. *J Oral Pathol Med* 1989b, 18:240-245

BIBLIOGRAFÍA

Seibel W, Yahia N, Stone C, Hassell TM. Elevated protein synthesis of cultured fibroblasts after cyclosporine-A therapy in beagles. *J Dent Res* 1989c, 68:288. 853

Seymour RA, Smith DG, Turnbull DN. The effects of phenytoin and sodium valproate on the periodontal health of adult epileptic patients. *J Clin Periodontol* 1985, 12:413-419

Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effects of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. A longitudinal study. *J Clin Periodontol* 1987, 14:610-613

Seymour RA and Heasman PA. Drugs and the periodontium. *J Clin Periodontol* 1988, 15:1-16

Seymour RA. Calcium-channel blockers and gingival overgrowth. Review. *Brit Dent J* 1991, 170:376-379

Seymour RA and Smith DG. The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J Clin Periodontol* 1991, 18:107-110

Seymour RA and Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. Review. *J Clin Periodontol* 1992, 19:1-11

Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Drug-induced gingival overgrowth and its management. *J R Coll Surg Edimb* 1993, 38:328-332

Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM, Monkman S, Idle JR. Amlodipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1994, 21:281-283

Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996, 23:165-175

Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2000, 27:217-223

Sheehy EC, Roberts GJ, Beighton D, O'Brien G. Oral health in children undergoing liver transplantation. *Int J Paediatr Dent* 2000, 10:109-119

BIBLIOGRAFÍA

Shibly O, Ciancio S, Anderson T, Bartz N, Mather M, Farber R. The role of 0.12 % chlorhexidine gluconate in drug induced hyperplasia. *J Dent Res* 1994, 73:356-2034

Shikata H, Utsumi N, Shimojima T, Oda Y, Okada Y. Increased expression of type VI collagen genes in drug-induced gingiva enlargement. *Febs Lett* 1993, 334:65-68

Shirasuna K, Okura M, Watatani K, Hayashido Y, Saka M, Matsuya T. Abnormal cellular property of fibroblasts from congenital gingival fibromatosis. *J Oral Pathol* 1989, 7:381-385

Silverstein LH, Koch JP, Lefkove MD, Garnick JJ, Singh B, Steflik DE. Nifedipine-induced gingival enlargement around dental implants: a clinical report. *J Oral Implantol* 1995, 21:116-120

Slavin J, Taylor J. Cyclosporin, nifedipine and gingival hyperplasia. *Lancet* 1987, 2:739

Sloan PJM, O'Neil TCA, Smith CJ, Holdsworth CD. Multisystem sarcoid presenting with gingival hyperplasia. *Brit J Oral Surg* 1983, 21:31-35

Smith CA, Wood EJ. *Biología celular*. Edición española 1997 de Addison-Wesley Iberoamericana, S.A: 172-203

Sobhani S, Hassell TM, Stone C. Patient age and susceptibility to cyclosporine gingival enlargement: in vitro study. *J Dent Res* 1989, 68:416-1873

Solomon H, Foster R, Jarvis K, Hassell T. Glycosaminoglycan production by human gingival fibroblasts from normal and phenytoin-enlarged gingiva. *J Dent Res* 1986, 65:331-1462

Somacarrera ML, Hernández G, Acero J, Moskow BS. Localization of gingival overgrowth in heart transplant patients undergoing cyclosporin therapy. *J Periodontol* 1994a, 65:666-670

Somacarrera ML, Hernández G, Acero J, Moskow BS. Factors related to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. *J Periodontol* 1994b, 65:671-675

BIBLIOGRAFÍA

Somacarrera ML, Lucas-Tomas M. Reversion of cyclosporine induced gingival overgrowth. Letters to the editor. Brit Dent J 1996, 180:286

Somacarrera ML, Lucas M, Acero J. Reversion of gingival hyperplasia in a heart transplant patient upon interruption of cyclosporine therapy. Spec Care Dentist 1996, 16:18-21

Somacarrera ML, Lucas M, Scully C, Barrios C. Effectiveness of periodontal treatments on cyclosporine-induced gingival overgrowth in transplant patients. Brit Dent J 1997, 183:89-94

Sooriyamoorthy M, Gower DB, Harvey W. Effect of phenytoin on testosterone metabolism by different human gingival fibroblast cell lines. J Dent Res 1986, 65:496. 81

Sooriyamoorthy M, Harvey W, Gower DB. The use of human gingival fibroblasts in culture for studying the effects of phenytoin on testosterone metabolism. Arch Oral Biol 1988, 33:353-359

Sooriyamoorthy M, Gower DB. Drug induced gingival overgrowth: clinical features and possible mechanisms. Med Sci Res 1989, 17:881-884

Sooriyamoorthy M, Gower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporin. J Periodont Res 1990, 25:25-30

Soory M, Kasasa SC. The effects of epidermal growth factor, interleukin -1 and phenytoin, alone and in combination, on C₁₉ steroid conversions in fibroblasts. J Periodontol 1997, 68:819-826

Soory M, Gower DB. The influence of prostaglandins on steroid conversions by human gingival fibroblasts. J Periodont Res 1998, 33:439-447

Soory M, Virdy H. Effects of the anti-androgen finasteride on 5 α -reductase activity in human gingival fibroblasts in response to minocycline. J Clin Periodontol 1998, 25:67-73

Soory M, Suchak A. The effects of human mast-cell products and of phenytoin on androgen 5 α -reductase expression in human gingival fibroblasts. Arch Oral Biol 2001, 46:847-855

BIBLIOGRAFÍA

Soory M, Suchak A. Phenytoin mediated androgen metabolism in gingival fibroblasts. Effects of the antiandrogen finasteride and the alkaline phosphatase inhibitor levamisole. *J Clin Periodontol* 2002, 29:955-960

Southren AL, Rappaport SC, Gordon GG, Vittek J. Specific 5 α -dihydrotestosterone receptors in human gingiva. *J Clin Endocr Metab* 1978, 47:1378-1382

Spolidorio LC, Spolidorio DM, Neves KA, Gonzaga HF, Almeida OP. Morphological evaluation of combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats. *J Periodont Res* 2002, 37:192-195

Spolidorio LC, Spolidorio DM, Benatti C, Sampaio JE, Almeida OP. Combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats is not age dependent. *J Periodont Res* 2003, 38:375-379

Spolidorio LC, Spolidorio DM, Massucato EM, Neppelenbroek KH, Campanha NH, Sanches MH. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. *Oral Dis* 2006, 12:309-314

Spratt H, Boomer S, Irwin CR, Marley JJ, James JA, Maxwell P, Middleton D, Linden GJ. Cyclosporin associated gingival overgrowth in renal transplant recipients. *Oral Dis* 1999, 5:27-31

Stabellini G, Calastrini C, Mariani G, Gioia M, Caramelli E, Gagliano N, Dellavia C, Moscheni C, Vizzotto L, Calvi EM. Extracellular glycosaminoglycan changes in healthy and overgrown gingiva fibroblasts after cyclosporin A and cytokine treatments. *J Oral Pathol Med* 2004, 33:346-353

Stone C, Eshenaur A, Hassell TM. Gingival enlargement in cyclosporine-treated multiple sclerosis patients. *J Dent Res* 1989, 68:285. 831

Stricklin GP, Hibbs MS. Biochemistry and physiology of mammalian collagenases. In: Nimni ME. *Collagen, Biochemistry* 1988, I:187-205

Sugano N, Ito K, Murai S. Cyclosporin A inhibits collagenase gene expression via AP-1 and JNK suppression in human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1998, 33:448-452

BIBLIOGRAFÍA

Takada K, Sugiyama H, Umezawa K, Mega J, Hirasawa M. The subgingival microflora in phenytoin-induced gingival hyperplasia. *J Periodont Res* 2003, 38:477-481

Thomas DW, Baboolal K, Subramanian N, Newcombe RG. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth is unrelated to allograft function in renal transplant recipients. *J Clin Periodontol* 2001, 28:706-709

Thomason JM, Seymour RA, Rawlins MD. Incidence and severity of phenytoin-induced gingival overgrowth in epileptic patients in general medical practice. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992, 20:288-291

Thomason JM, Seymour RA, Rice N. The prevalence and severity of cyclosporin and nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1993, 20:37-40

Thomason JM, Seymour RA, Soames JV. Severe mucosal hyperplasia of the edentulous maxilla associated with immunosuppressant therapy: A clinical report. *J Prost Dent* 1994, 72:1-3

Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, Idle JR. Iatrogenic gingival overgrowth in cardiac transplantation. *J Periodontol* 1995, 66:742-746

Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, Wilkinson R, Idle JR. Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the rôle of HLA phenotype. *J Clin Periodontol* 1996a, 23:628-634

Thomason JM, Kelly PJ, Seymour RA. The distribution of gingival overgrowth in organ transplant patients. *J Clin Periodontol* 1996b, 23:367-371

Thomason JM, Ellis JS, Kelly PJ, Seymour RA. Nifedipine pharmacological variables as risk factors for gingival overgrowth in organ transplant patients. *Clin Oral Investig* 1997, 1:35-39

Thomason JM, Sloan P, Seymour RA. Immunolocalization of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) in the gingival tissues of organ transplant patients medicated with cyclosporin. *J Clin Periodontol* 1998, 25:554-560

BIBLIOGRAFÍA

Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS. Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with cyclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Clin Periodontol* 2005, 32:273-279

Thomson AW, Moon DK, Geczy CL, Nelson DS. Cyclosporine and lymphokines affecting macrophage behaviour. *Transpl Proc* 1983, 15 (suppl. 1):2390-2393

Tipton DA, Dabbous MK. Heterogeneity of gingival fibroblast response to cyclosporine. *J Dent Res* 1986, 65:331. 1457

Tipton DA, Dabbous M. Dose-dependent collagenolytic response profiles of gingival fibroblasts to cyclosporine. *J Dent Res* 1989, 68:361. 1437

Tipton DA, Pabst M, Dabbous M. Effect of immune response to cyclosporine on fibroblast collagenase activity. *J Dent Res* 1989, 68:361. 1433

Tipton DA, Stricklin GP, Dabbous MK. Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 1991, 46:152-165

Tipton DA, Fry HR, Dabbous MK. Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res* 1994, 29:401-409

Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol* 1997, 68:524-530

Tipton DA, Dabbous MK. Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *J Periodontol* 1998, 69:609-619

Tipton DA, Flynn JC, Stein SH, Dabbous MKh. Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1 beta-stimulated prostaglandin E₂ and IL-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2003, 74:1754-1763

Tyldesley WR, Rotter E. Gingival hyperplasia induced by cyclosporin A. *Brit Dent J* 1984, 157:305-309

BIBLIOGRAFÍA

Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, Trackman PC. Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001, 72:921-931

Valle JLR, Gómez-Lus MLC, Prieto JP, Liébana JU. Composición y ecología de la microbiota oral. En: Liébana J, *Microbiología oral*, ed. Interamericana, Mc Graw-Hill 1995, 401-407

Valsecchi R, Cainelli T. Gingival hyperplasia induced by erythromycin. *Act Derm Venereol* 1992, 72:157

Van der Wall EE, Tuinzing DB, Hes J. Gingival hyperplasia induced by nifedipine, an arterial vasodilating drug. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985, 60:38-40

Van der Zee E, Everts V, Beertren W. Cytokines modulates routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol* 1997, 24:297-305

Varga E, Lennon MA, Mair LH. Pre-transplant gingival hyperplasia predicts severe cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal transplant patients *J Clin Periodontol* 1998, 25:225-230

Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amount of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987, 247:597-604

Veis A, Payne K. Collagen fibrillogenesis. In: Nimni ME. *Collagen*, Biochemistry 1988, I:113-137

Vernillo AT, Schwartz NB. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production by phenytoin 5,5-diphenylhydantoin in monolayer cultures of mesenchymal cells derived from embryonic chick sterna. *Arch Oral Biol* 1986, 31:819-823

Vernillo AT, Schwartz NB. The effects of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J Periodont Res* 1987, 22:307-312

BIBLIOGRAFÍA

Vieira ML, Martins WJ, Grisi MF, Novaes AB, Souza SL, Salvador SL. Clinical and microbiological analysis of periodontally diseased sites after renal transplant. *Spec Care Dentist* 2002, 22:115-120

Vittek J, Rappaport SC, Gordon GG, Munnanzi PR, Southren AL. Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol* 1979, 50:254-264

Vogel RI, Fink RA, Schneider LC, Frank O, Baker H. The effect of folic acid on gingival health. *J Periodontol* 1976, 47:667-668

Vogel RI, Fink RA, Frank O, Baker H. The effect of topical application of folic acid on gingival health. *J Oral Med* 1978, 33:20-22

Wahlström E, Zamora JU, Teichman S. Improvement in cyclosporine-associated gingival hyperplasia with azithromycin therapy. *New Eng J Med* 1995, 332:753-754

Walker CR Jr, Tomich CE, Hutton CE. Treatment of phenytoin-induced gingival hyperplasia by electrosurgery. *J Oral Surg* 1980, 38:306-311

Waner T, Nyska A, Nyska M, Pirak M, Sela M, Galiano A. Gingival hyperplasia in dogs induced by oxodipine, a calcium channel blocking agent. *Toxicol Pathol* 1988, 16:327-332

Westbrook P, Bednarczyk E, Carlson M, Sheehan H, Bissada NF. Regression of nifedipine-induced gingival hyperplasia following switch to a same class calcium channel blocker, isradipine. *J Periodontol* 1997, 68:645-650

Willershausen-Zönnchen B, Lemmen C, Schumacher U. Influence of cyclosporine-A on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992, 152:397-402

Willershausen-Zönnchen B, Lemmen C, Zönnchen B, Hamm G, Schumacher U. Influence of nifedipine on the metabolism of gingival fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994, 375:299-303

Williamson MS, Miller EK, Plemons J, Rees T, Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994, 65:895-903

BIBLIOGRAFÍA

Wilson RF, Morel A, Smith D, Koffman CG, Ogg CS, Rigden SPA, Ashley FP. Contribution of individual drugs to gingival overgrowth in adult and juvenile renal transplant patients treated with multiple therapy. *J Clin Periodontol* 1998, 25:457-464ç

Wirnsberger G, Pfragner R. Comment on "Efficacy of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients" by Nash and Zaltzman (Letters to the editor). *Transplantation* 1999, 67:1289-1291

Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 1991, 5:2145-2154

Wondimu B, Dahllof G, Berg U, Modéer T. Cyclosporin A induced gingival overgrowth in renal transplant children. *Scand J Dent Res* 1993, 101:282-286

Wondimu B, Reinholt FP, Modéer T. Stereologic study of cyclosporin A-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *Eur J Oral Sci* 1995, 103:199-206

Wondimu B, Sandberg J, Modéer T. Gingival overgrowth in renal transplant patients administered cyclosporin A in mixture or in capsule form. A longitudinal study. *Clin Transplant* 1996, 10:71-76

Wondimu B, Berg U, Modéer T. Renal function in cyclosporine-treated pediatric renal transplant recipients in relation to gingival overgrowth. *Transplantation* 1997, 64:92-96

Wondimu B, Modéer T. Cyclosporin A upregulates prostaglandin E₂ production in human gingival fibroblasts challenged with tumor necrosis factor alpha in vitro. *J Oral Pathol Med* 1997, 26:11-16

Wondimu B, Nemeth A, Modéer T. Oral health in liver transplant children administered cyclosporin A or tacrolimus. *Int J Paediatric Dent* 2001, 11:424-429

Wong W, Hodge MG, Lewis A, Sharpstone P, Kingswood JC. Resolution of cyclosporin-induced gingival hypertrophy with metronidazole. *Lancet* 1994, 343:986

BIBLIOGRAFÍA

Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. TGF- β isoforms and TGF- β receptors in drug-induced and hereditary gingival overgrowth. *J Oral Pathol Med* 2001, 30:281-289

Wright HJ, Chapple IL, Blair F, Matthews JB. Crevicular fluid levels of TGF β 1 in drug-induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* 2004, 49:421-425

Wysocki GP, Gretzinger HA, Laupacis A, Ulan RA, Stiller CR. Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983, 55:274-278

Yamada H, Nishimura F, Naruishi K, Chou HH, Takashiba S, Albright GM, Nares S, Iacopino AM, Murayama Y. Phenytoin and cyclosporin A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1, and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000, 71:955-960

Yamada H, Nishimura F, Furuno K, Naruishi K, Kobayashi Y, Takashiba S, Murayama Y. Serum phenytoin concentration and IgG antibody titre to periodontal bacteria in patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Int Acad Periodontol* 2001, 3:42-47

Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ. Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol* 1987a, 16:129-134

Yamasaki A, Rose GG, Pinero GJ, Mahan CJ. Ultrastructural and morphometric analyses of human cementoblasts and periodontal fibroblasts. *J Periodontol* 1987b, 58:192-201

Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor β_1 -induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990, 111:731-741

Zebrowski EJ, Singer DL, Brunka JR. Cyclosporin-A, nifedipine and phenytoin: comparative effects on gingival fibroblast metabolism. *J Dent Res* 1986, 65:331. 1456

Zebrowski EJ, Ramamurthy NS, Singer DL, Brunka JR. Collagenase activity of cyclosporin, nifedipine, and phenytoin treated fibroblasts. *J Dent Res* 1988, 67:331. 1751

BIBLIOGRAFÍA

Zebrowski EJ, Singer D. Fibroblast function: regulation by cyclosporin-induced hyperplastic gingiva conditioned growth medium. *J Dent Res* 1989, 68:361-1434

Zebrowski EJ, Pylypas SP, Odlum O, Johnson RB. Comparative metabolism of ³H-glucosamine by fibroblast populations exposed to cyclosporine. *J Periodontol* 1994, 65:565-567

Zerón A. Nueva clasificación de las enfermedades periodontales. *Rev Adm* 2001, 58:16-20

Zlabinger GJ, Kudlacek S, Pohanka E, Franz M, Hamilton G, Rosenmayr A, Kovarik J. Evidence that sensitivity to cyclosporine is influenced by the HLA-DR phenotype of kidney graft recipients. *Transplantation* 1992, 53:758-762