



TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS MITOCONDRIALES EN EL  
AGRADAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR CICLOSPORINA Y NIFEDIPINA:  
ENSAYO SOBRE MODELO ANIMAL.**

LOURDES VICTORIA ROMAN MALO

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

2016

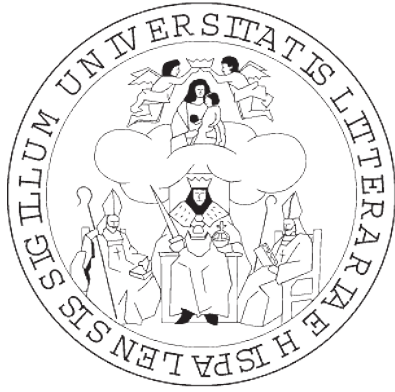
DIRECTORES:

Dr. PEDRO BULLÓN FERNÁNDEZ

Dr. MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ

Dr. MARIO DAVID CORDERO MORALES





## CERTIFICADO

Departamento de Estomatología.

Facultad de Odontología.

C/Avicena, s.n.

**D. Pedro Bullón Fernández.** Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático en Periodoncia y Medicina Bucal del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla,

D. Manuel de Miguel Rodríguez. Doctor en Biología y Profesor titular en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de la Universidad de Sevilla.

D. Mario David Cordero Morales. Doctor en Ciencias de la Salud.

Certifican:

Que el trabajo de investigación titulado: **“INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS MITOCONDRIALES EN EL AGRANDAMIENTO GINGIVAL INDUCIDO POR CICLOSPORINA Y NIFEDIPINA: ENSAYO SOBRE MODELO ANIMAL”**, desarrollado por **D<sup>a</sup> Lourdes Victoria Román Malo** para optar al título de Doctor en Odontología, ha sido realizado bajo su dirección y cuenta con los requisitos para ser presentado y defendido como tesis doctoral, al encontrarlo acorde a la normativa actual aprobada por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firman el presente documento en Sevilla a 15 de mayo de 2016.

Fdo: Pedro Bullón Fernández

Fdo: Manuel de Miguel Rodríguez

Fdo: Mario David Cordero Morales





## UNIVERSIDAD DE SEVILLA

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado gracias a la financiación del V Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla, gracias a un Contrato predoctoral II.2 o de Personal Investigador en Formación (PIF) concedido a D<sup>a</sup>. Lourdes Victoria Román Malo.



*A mi familia*

*A Fran*





## AGRADECIMIENTOS

*Gracias a mis directores. Gracias Pedro por depositar en mí tu confianza y continuar haciéndolo. Gracias Mario por guiar mis primeros pasitos dentro del laboratorio y “despertar la ciencia que hay en mí”, has sido jefe y compañero. Es un placer pertenecer a vuestro equipo. Gracias Manolo por estar desde el principio y siempre hacerme un huequito en tu agenda.*

*Gracias a Pepe Quiles y su fantástico equipo, que han participado activamente del desarrollo de esta investigación.*

*Gracias a todos mis compis del L.I.B.O. (Fabi, Eli, Diego, Ángel, Lucho, Rafa y Jessica), hacéis que las jornadas de trabajo sean más cortas y disfrute de cada día. En especial a Fabi, por ser una amiga, por su apoyo y su paciencia, y aguantar tanto mi buen como mi mal humor. No puedo olvidar a Lucía Maestre, parte fundamental de este equipo y un gran apoyo para mí, gracias por tener tu puerta siempre abierta y por tus buenos días de cada mañana.*

*Gracias a mis compis de master. Belén, Esther, Karina; echo de menos todos los “malos” y buenos ratos con vosotras.*

*Gracias a “los juernes” por existir, pero sobre todos a las personas que formáis parte de ello, porque dan sentido a las semanas y hacen que estas sean más cortas.*

*Gracias Mario y Fati, sé que siempre cuento con vosotros. Sois geniales.*

*Gracias a mi familia. A mis padres, por demostrarme lo orgullosos que se sienten de mí y apoyar todos mis proyectos. A Gelli, que aun estando ocupada y lejos, siempre tiene un huequito para preguntarme como estoy. A Carmela, no podría tener mejor compi de piso, aunque me queje (mucho), no te cambiaría por nadie. Teniéndoos a vosotros todo se hace mucho más fácil. Os quiero.*

*Gracias a Fran, mi mitad, esta tesis también es tuya. Te amo.*

*Y gracias a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado en el desarrollo de este proyecto.*

*A todos vosotros. GRACIAS.*



# Índice

---



## ÍNDICE

Resumen	17
Abreviaturas	19
1. Introducción	23
1.1 Enfermedad periodontal	24
- Concepto	24
- Clasificación	24
1.2 Morfología de la encía sana	33
- Anatomía macroscópica	33
- Anatomía microscópica	34
1.3 Agrandamiento gingival	36
- Concepto	36
- Clasificación	37
- Principales causas	37
- Fármacos comúnmente asociados	38
1.4 Ciclosporina	39
- Mecanismo de acción y farmacodinámica	39
- Farmacocinética	41
- Posología	41
- Aplicaciones terapéuticas	42
- Efectos adversos	43
1.5 Nifedipina	43
- Mecanismo de acción y farmacodinámica	43
- Farmacocinética	45
- Principales aplicaciones terapéuticas	45
- Efectos adversos	45
1.6 Agrandamiento gingival por ciclosporina y nifedipina	46
- Antecedentes	46
- Epidemiología	47

- Manifestaciones orales	47
- Factores de riesgo	48
- Etiopatogenia	52
- Evaluación del papel de los fibroblastos, su muerte y proliferación	53
- Evaluación de los marcadores de fibrosis	54
- Teoría de la transición de epitelio a mesénquima	57
- Evaluación del papel del sistema inmune e inflamación	60
- Papel del calcio	61
- Otras líneas de investigación	61
1.7 Fibromatosis gingival hereditaria	62
- Antecedentes	62
- Características y epidemiología	62
- Histología	63
- Mecanismo biológico	64
- Proliferación celular	64
- Colágeno	65
- Degradación de la matriz extracelular	65
- Citoquinas y factores de crecimiento	66
1.8 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	67
1.9 Enfermedades sistémicas y mitocondria	79
- Enfermedad periodontal y disfunción mitocondrial	81
1.10 Planteamiento del problema	82
2 Hipótesis	85
3 Objetivos	89
3.1 Objetivo principal	91
3.2 Objetivo secundario	91

4	Material y Método	93
4.1	Animales y condiciones de estabulación	95
4.2	Estudio morfológico	96
	- Microscopía óptica	96
	- Análisis morfométrico de la microscopía óptica	98
	- Microscopía electrónica	99
	- Análisis morfométrico de la microscopía electrónica	100
4.3	Determinaciones bioquímicas	101
	- Preparación de los homogenados de las muestras	101
	- Cuantificación de la cantidad de proteínas en los Homogenados	101
	- Análisis de la masa mitocondrial	102
	- Niveles de ATP	103
	- Detección de colágeno	103
	- Peroxidación lipídica	104
	- Análisis de proteínas mediante western blot	105
4.4	Evaluación de agrandamiento gingival en pacientes	109
	- Toma de muestras de sangre y obtención de células mononucleares periféricas (PBMC)	109
	- Toma de biopsias y procesado	110
	- Cultivo de fibroblastos gingivales sanos	111
	- Evaluación de lípidos peróxidos	112
	- Evaluación de la síntesis de colágeno	112
	- Determinación de los niveles de CoQ <sub>10</sub> en los PBMC	113
4.5	Análisis estadístico	115
5	Resultados	117
5.1	Análisis del grado de agrandamiento gingival mediante microscopía Óptica	119
5.2	Análisis ultraestructural de las mitocondrias	121

5.3	Determinación bioquímica de masa mitocondrial mediante la actividad de la citrato sintasa	125
5.4	Niveles de ATP	125
5.5	Producción de nuevo colágeno	126
5.6	Peroxidación lipídica	127
5.7	Western blot en tejido gingival	127
5.8	Western blot en tejido cardíaco	128
5.9	Pacientes con fibromatosis gingival hereditaria	129
	- Descripción del caso clínico	129
	- Hallazgos histopatológicos en la H&E	133
	- Análisis de los PBMC	134
	- Evaluación de la síntesis de colágeno	135
	- Influencia de las ROS en la síntesis de colágeno	135
6	Discusión	137
7	Conclusiones	149
8	Bibliografía	155



## RESUMEN

El agrandamiento gingival es una entidad patológica englobada dentro de la clasificación de la enfermedad periodontal. Las causas más comunes son en primer lugar como manifestación secundaria al consumo de fármacos - hidantoínas, ciclosporina y bloqueantes de los canales del calcio – y en segundo lugar, la forma idiopática asociada a un síndrome denominado fibromatosis gingival hereditaria.

La clínica de este agrandamiento gingival está bien definida, pero las vías moleculares no quedan del todo claras a pesar del gran número de ensayos que la han abordado. En general se habla de una etiopatogenia multifactorial en la que se asocian proliferación de fibroblastos con descenso en su apoptosis, disminución de la degradación de la matriz con aumento de su depósito y la presencia de diversos factores de crecimiento.

En el presente estudio hemos tratado de aclarar el papel que juega la mitocondria en este proceso. Se conoce la importancia que esta organela toma en procesos como la inflamación y distintas enfermedades sistémicas, entre ellas la enfermedad periodontal. Además, al tratarse de fármacos cuya diana principal no va a ser la encía pero que actúan a este nivel, queremos ver cómo afectan a otro órgano de vital importancia, pero del que no tenemos una visión clínica directa, como es el corazón.

Para lograr nuestros objetivos hemos usado en primer lugar un modelo animal en el que inducimos la patología con fármacos (ciclosporina A o nifedipina) comparándolos con un grupo control, y en segundo lugar hemos evaluado el tejido gingival de dos pacientes diagnosticados de fibromatosis gingival hereditaria. Así, hemos estudiado los tejidos a nivel histológico, ultraestructural y bioquímico con

diversas técnicas. Analizando los resultados hemos encontrado que los cambios morfológicos y funcionales en la mitocondria y el estrés oxidativo podrían estar involucrados en la etiopatogenia de este proceso. El tratamiento con ciclosporina produjo un incremento del estrés oxidativo a nivel cardiaco, por lo que el paciente podría beneficiarse de un cotratamiento con antioxidantes para el control de este efecto secundario al fármaco. Seguimos necesitando más estudios que nos permitan aclarar las vías moleculares en este proceso.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGEs	Productos finales de la glicación avanzada.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosin-5-trifostato.
BSA	Albúmina de suero bovino.
Ca <sup>2+</sup>	Calcio.
CEJ	Límite amelocementario.
CoA	Coenzima A.
CoQ	Coenzima Q.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
CO <sub>3</sub> Li <sub>2</sub>	Carbonato de litio.
CIP	Coctel inhibidor de proteasas.
CsA	Ciclosporina A.
CT	Tejido conectivo.
CTGF o CNN2	Factor de crecimiento del tejido conectivo.
CTL	Control.
CTP	Papilas del tejido conectivo.
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco.
DTNB	5,5'-dithiobis(ácido 2-nitrobenzoico).
E	Epitelio.
EMT	Transición de epitelio a mesénquima.
ER	Crestas epiteliales.

FAD	Flavina adenín dinucleótido.
FN ED-A	Fibronectina con ensamblaje alternativo.
FSP-1	Proteína 1 fibroblasto-específica.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
HLA	Antígeno linfocitario humano.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
HRP	Peroxidasa de rábano.
Hsp47	Proteína de choque térmico 47.
H <sub>2</sub> O	Agua molecular.
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada.
H&E	Hematoxilina y eosina.
IGF	Factor de crecimiento semejante a la insulina.
IL-1	Interleuquina-1.
IL-2	Interleuquina-2.
IL-6	Interleuquina-6.
JE	Epitelio de unión.
LB	Tampón de carga.
MDA	Malondialdehído.
MetOH	Metanol.
MMPs	Matriz de metaloproteinasas.
MMP-1	Metaloproteinasa 1.
MMP-2	Metaloproteinasa 2.
MMP-9	Metaloproteinasa 9.

MMP-12	Metaloproteinasa 12.
MMP-13	Metaloproteinasa 13.
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa.
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin.</i>
N	Nifedipina.
NaCl	Cloruro sódico.
NAD	Nicotinamida adenín dinucleótido.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NFAT	Factores nucleares de células T activadas.
NH <sub>3</sub>	Hidróxido de amonio.
OE	Epitelio oral.
OGG	8-oxoguanina DNA glicosilasa.
OSE	Epitelio del surco.
OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de osmio.
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular.
PBMC	Células mononucleares periféricas.
PBS	Tampón fosfato salino.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
TBS	Tampón tris salino.
TCA	Ácido tricloroacético.

TEMED	Tetrametiletiléndiamina.
TFAM	Factor A de transcripción mitocondrial.
TG	Tampón de tris y glicina.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta.
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante beta 1.
TIMPs	Inhibidores de metaloproteinasas.
TrisHCl	Tris(hidroximetil)aminometano y ácido clorhídrico.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.

# Introducción

---





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL**

#### **Concepto**

Suponen un conjunto de patologías que afectan a los tejidos de sostén del diente o periodonto; incluyendo como tal a la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar.

#### **Clasificación**

Las primeras clasificaciones de la enfermedad periodontal surgen ante la necesidad de facilitar el trabajo a los clínicos en cuanto a identificación y tratamiento. Esta clasificación a lo largo del tiempo ha ido sufriendo cambios para adaptarse a los nuevos conocimientos sobre la etiología y patogénesis de la enfermedad periodontal e incluir nuevas categorías.

Así, surge en 1999 una completa clasificación de la enfermedad periodontal, la cual deberá seguir en revisión y actualizarse según los nuevos descubrimientos y necesidades clínicas que surjan en un futuro.

Con la actual clasificación de 1999 propuesta por Armitage (1): “the International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions” ya se incluye a la patología objeto de nuestro estudio; y se divide a la enfermedad periodontal en:

I. Gingivitis:

a. Inducida por placa dental.

i. Inducida por placa dental sólo.

1. Sin la contribución de otros factores locales.
  2. Con la contribución de otros factores locales  
(ver VIII a).
- ii. Modificada por factores sistémicos.
1. Asociada con el sistema endocrino.
    - a. Gingivitis puberal.
    - b. Gingivitis asociada al ciclo menstrual.
    - c. Gingivitis asociada al embarazo.
      - i. Gingivitis.
      - ii. Granuloma piógeno.
    - d. Gingivitis asociada a diabetes mellitus.
  2. Asociada a discrasias sanguíneas.
    - a. Gingivitis asociada a leucemia.
    - b. Otros.
- iii. Modificada por medicación.
1. Agrandamientos gingivales inducidos por medicamentos.
  2. Gingivitis inducida por medicamentos.
    - a. Asociada a anticonceptivos orales.

- b. Otros.
- iv. Modificada por malnutrición.
- 1. Gingivitis por déficit de ácido ascórbico.
  - 2. Otros.
- b. Lesiones gingivales no inducidas por placa.
- i. Gingivitis con origen bacteriano específico.
    - 1. Lesiones asociadas a *Neisseria gonorrhoeae*.
    - 2. Lesiones asociadas a *Treponems Pallidum*.
    - 3. Lesiones asociadas a *Streptococcus*.
    - 4. Otros.
  - ii. Gingivitis de origen viral.
    - 1. Infección por herpes virus.
      - a. Gingivoestomatitis por primoinfección.
      - b. Herpes oral recurrente.
      - c. Infección por varicela zoster.
    - 2. Otros.
  - iii. Gingivitis de origen fúngico.
    - 1. Infección por cándidas.
      - a. Candidiasis gingival generalizada.

2. Eritema lineal gingival.
  3. Histoplasmosis.
  4. Otros.
- iv. Lesiones gingivales de origen genético.
1. Fibromatosis gingival hereditaria.
  2. Otros.
- v. Gingivitis por manifestación de enfermedades sistémicas.
1. Desórdenes mucocutáneos.
    - a. Liquen plano.
    - b. Penfigoide.
    - c. Pénfigo vulgar.
    - d. Eritema multiforme.
    - e. Lupus eritematoso.
    - f. Inducida por drogas.
    - g. Otros.
  2. Reacciones alérgicas.
    - a. Materiales de restauración dental.
      - i. Mercurio.

- ii. Níquel.
    - iii. Acrílicos.
    - iv. Otros.
  - b. Reacciones atribuidas a.
    - i. Pasta dental/dentífricos.
    - ii. Enjuagues/colutorios.
    - iii. Aditivos de gomas de mascar.
    - iv. Alimentos y aditivos.
    - v. Otros.
  - vi. Lesiones traumáticas.
    - a. Químicas.
    - b. Físicas.
    - c. Térmicas.
  - vii. Reacción a cuerpo extraño.
  - viii. Otro origen no específico.
- II. Periodontitis crónica.
  - a. Localizada.
  - b. Generalizada.
- III. Periodontitis agresiva.

- a. Localizada.
- b. Generalizada.

IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas.

a. Asociada a desórdenes hematológicos.

- i. Neutropenia adquirida.
- ii. Leucemias.
- iii. Otros.

b. Asociada con desórdenes genéticos.

- i. Neutropenia familiar y cíclica.
- ii. Síndrome de Down.
- iii. Síndromes de deficiencia en adhesión leucocitaria.
- iv. Síndrome de Papillon-Lefèvre.
- v. Síndrome de Chediak-Higashi.
- vi. Síndromes de histiocitosis.
- vii. Glucogenosis.
- viii. Agranulocitosis congénita infantil.
- ix. Síndrome de Cohen.
- x. Síndrome de Ehlers-Danlos (Tipos IV y VIII).
- xi. Hipofosfatasa.



- b. Deformidades y condiciones mucogingivales en el dentado.
  - i. Recesión gingival y de tejidos blandos.
    - 1. Superficie vestibular o lingual.
    - 2. Interproximal (papila).
  - ii. Falta de encía queratinizada.
  - iii. Disminución de la profundidad de vestíbulo.
  - iv. Frenillo aberrante.
  - v. Excesos gingivales.
    - 1. Pseudobolsa.
    - 2. Margen gingival inconsistente.
    - 3. Pantalla gingival excesiva.
    - 4. Agrandamientos gingivales (ver I.a.iii y I.b.iv).
  - vi. Alteraciones del color.
- c. Deformidades y condiciones mucogingivales sobre el reborde desdentado.
  - i. Deficiencia del reborde vertical y/o horizontal.
  - ii. Falta de encía queratinizada.
  - iii. Agrandamiento de la encía y tejidos blandos.
  - iv. Frenillo aberrante.



- v. Disminución de la profundidad de vestíbulo.
  - vi. Alteraciones del color.
- d. Trauma oclusal.
- i. Trauma oclusal primario.
  - ii. Trauma oclusal secundario.

## **1.2 MORFOLOGÍA DE LA ENCÍA SANA**

### **Anatomía macroscópica**

La encía es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Adquiere su forma y textura definitivas con la erupción dental. Se extiende desde el margen gingival libre hasta la línea mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar (esto no ocurre a nivel palatino, donde toda la mucosa es de tipo queratinizado), y su anchura varía entre 1 y 9 mm, aumentando con la edad (Figura 1).

Está formada por:

- Encía libre (desde el margen gingival libre, hasta la línea de encía libre - que corresponde horizontalmente con el límite amelocementario -). De color rosa coralino, opaca y de consistencia firme. Incluye también a las papilas interdenciales.

- Encía adherida (desde la línea de encía libre, hasta la línea mucogingival). De color rosa coralino, textura firme y punteada (debido a las fibras conectivas que se anclan al cemento y hueso adyacente).

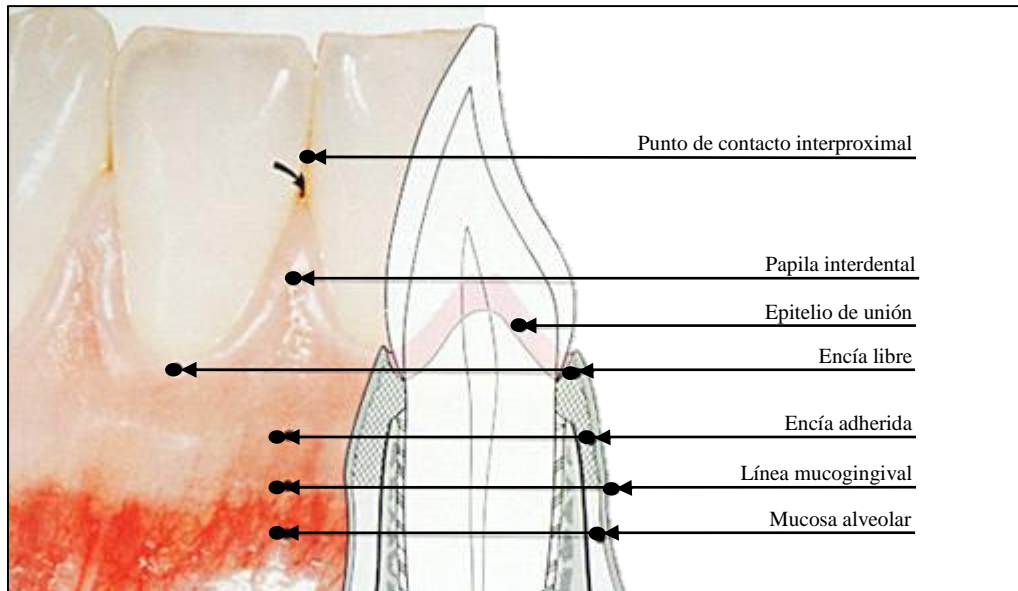


Figura 1. Anatomía macroscópica de la encía. Imagen modificada de "Periodontología clínica e implantología odontológica", Tomo 1. 5ª edición.

### Anatomía microscópica

La encía está formada por epitelio y tejido conectivo/lámina propia.

En primer lugar tenemos el epitelio bucal, que es el que apunta a la cavidad oral, siendo un epitelio plano, estratificado y queratinizado. El componente celular principal son los queratinocitos (90%), pero también encontramos los siguientes tipos celulares: melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y células inflamatorias.

El límite con el tejido conectivo subyacente presenta una serie de proyecciones que se denominan papilas de tejido conjuntivo o papilas coriales, que están separadas unas de otras por las crestas epiteliales o papilas dérmicas.

El epitelio bucal se continúa a partir del margen gingival libre con el epitelio dentogingival, formado por el epitelio del surco (con células cúbicas y superficie queratinizada), que enfrenta al diente sin estar en contacto con la superficie del esmalte) y el epitelio de unión (con células más grandes y separadas, con menos uniones entre ellas -desmosomas- y ausencia de papilas coriales), que provee el contacto entre la encía y el diente, presentando sus células hemidesmosomas en unión con el esmalte (similar a la membrana basal entre epitelio-conectivo) (Figura 2).

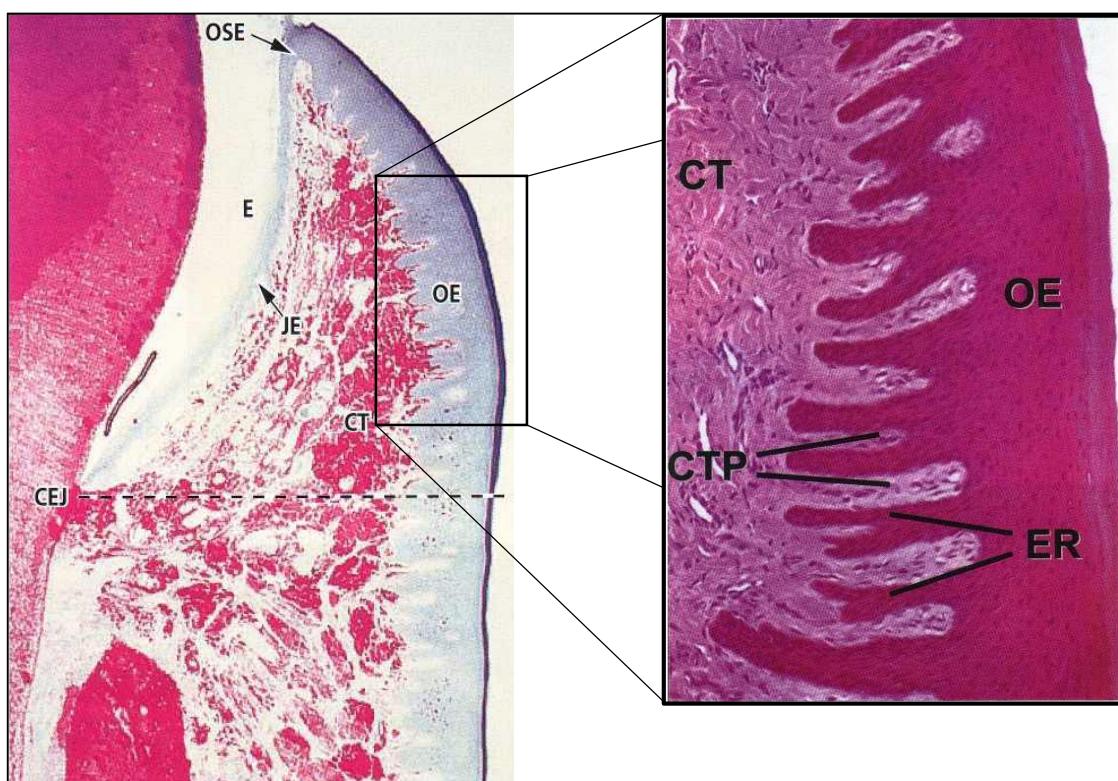


Figura 2. Anatomía microscópica de la encía. Observamos el epitelio (E), dividido en epitelio oral (OE), epitelio del surco (OSE) y epitelio de unión (JE). Bajo el epitelio vemos el tejido conectivo (CT). Tenemos una línea que divide la encía a nivel del límite amelocementario (CEJ). A mayor aumento observamos las papilas de tejido conectivo (CTP) y las crestas epiteliales (ER), formando un entramado que permite que un tejido penetre en otro. Imagen modificada de "Periodontología clínica e implantología odontológica", Tomo 1. 5ª edición.

Por otro lado, el componente tisular predominante en la encía es el tejido conectivo, lámina propia o corion; cuyos componentes principales son:

- Fibras. Colágenas en su mayoría (producida por fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos), aunque también encontramos fibras de reticulina, de oxitalano y elásticas.

- Células. Siendo predominante el fibroblasto (65% de la población celular total y encargado de la síntesis de diversos tipos de fibras además de algunos componentes de la matriz del tejido conectivo). También encontramos mastocitos (responsables de la síntesis de algunos componentes de la matriz y productora de sustancias vasoactivas), macrófagos (derivados de los monocitos sanguíneos, con funciones fagocíticas y de síntesis), y células inflamatorias de distintos tipos: granulocitos neutrófilos o polimorfonucleares, linfocitos y plasmocitos.
- Matriz. Producida principalmente por los fibroblastos, algunos componentes por los mastocitos y otros derivan de la sangre. Compuesta por complejos macromoleculares de proteínas e hidratos de carbono, que se clasifican generalmente en proteoglucanos (contienen glucosaminoglucanos, determinantes de la presión osmótica e importantes en la elasticidad y consistencia del tejido) y glucoproteínas (2).

### **1.3 AGRANDAMIENTO GINGIVAL**

#### **Concepto**

Se refiere, en esencia, a un aumento de encía adherida a nivel de la encía libre que sobrepasa el límite amelocementario con engrosamiento del tejido. La literatura usa una amplia gama de terminología para referirse a esta situación: hiperplasia, hipertrofia, aumento o agrandamiento.

Los términos agrandamiento o aumento, son clínicamente descriptivos; mientras que hiperplasia e hipertrofia son términos histológicos.

Hiperplasia describe el aumento de tamaño de un órgano debido a un incremento en el número de sus células. Esta debería distinguirse del término hipertrofia, el cual es exceso de crecimiento del tejido debido a un aumento en el tamaño de las células (3).

“Agrandamiento” (“*overgrowth*”) es el término preferido para referirnos a muchas de estas situaciones en relación con medicamentos, previamente etiquetadas como “hiperplasia gingival” e “hipertrofia gingival”, ya que estos términos no reflejan nuestro conocimiento actual sobre el aumento macroscópico de una encía histológicamente alterada (4).

Por lo tanto, con los conocimientos actuales, definir a esta situación con el término de agrandamiento gingival es lo que nos parece más adecuado.

### **Clasificación**

El agrandamiento gingival puede ser clasificado en función del grado de crecimiento clínico del tejido gingival (3):

- Grado 0, no hay signos clínicos de agrandamiento.
- Grado 1, el agrandamiento está confinado a la papila interdental.
- Grado 2, el agrandamiento se extiende más allá de la papila por el resto de tejido queratinizado.
- Grado 3, el tejido gingival llega a cubrir tres cuartas partes o más del diente.

### **Principales causas**

La causa más común de aumento del tejido gingival es una inflamación inducida por placa. Pero tenemos una serie de situaciones de aumento del tamaño del tejido en las que el factor etiológico no va a ser puramente inflamatorio, y estas son, de mayor a menor frecuencia:

1. Agrandamiento gingival por medicamentos.
2. Fibromatosis gingival hereditaria.
3. Neurofibromatosis I.
4. Infiltrado leucémico gingival.
5. Agrandamiento gingival como manifestación del linfoma de Hodgkin.
6. Síndrome de Sweet.
7. Síndrome de Schinzel-Giedion (3).

### **Fármacos comúnmente asociados**

El agrandamiento gingival asociado a medicamentos se produce como un efecto secundario a fármacos que son usados principalmente para tratamientos no dentales, en los que la encía no es su órgano diana.

Estos fármacos asociados con el aumento gingival pueden ser categorizados en general dentro de tres grandes grupos, de acuerdo a su acción terapéutica (4):

1. Anticonvulsivantes (especialmente fenitoína - *Dilantina*®, *Epanutín*®, *Neosidantoína*®, *Sinergina*®).
2. Inmunosupresores (principalmente ciclosporina A - *Neoral*®, *Sandimmune*®).

3. Antagonistas de los canales de calcio (principalmente nifedipina - *Adalat®*, *Nifelat®*- aunque también se ha descrito con otros principios activos de la misma familia – *amlodipino*, *diltiazem*, *verapamilo*, etc).

El tratamiento con ciclosporina se sigue prescribiendo a una gran proporción de los pacientes trasplantados o con patologías autoinmunes, y se estima que irá en aumento debido a la alta eficacia de la terapia (5). Por otro lado, según datos de la Organización Mundial de la Salud de 2012, uno de cada tres adultos presentaba hipertensión arterial, siendo factor de riesgo de infarto y otras enfermedades cardiovasculares. Muchos de estos pacientes logran controlar su tensión gracias a la administración de antagonistas de los canales del calcio.

#### **1.4 CICLOSPORINA A**

La ciclosporina A (CsA) fue aislada por primera vez en Suiza en 1970, como un metabolito del hongo *Tolypocladium inflatum gams*. En un principio se utilizó como antifúngico demostrando tener poco valor; sin embargo, sus polipéptidos cíclicos poseen una potente acción inmunosupresora (6), permitiendo prolongar la supervivencia de los trasplantes alogénicos que involucran a piel, corazón, riñón, hígado, páncreas, médula ósea, intestino delgado y pulmón.

La ciclosporina A (*Sandimmune™*; *Neoral™*) ha demostrado suprimir algo la inmunidad humoral (linfocitos B), y en un grado mucho mayor, la inmunidad celular (linfocitos T), ayudando a tratar el rechazo de aloinjertos, hipersensibilidad retardada, la enfermedad de injerto contra huésped y enfermedades autoinmunes (7).

#### **Mecanismo de acción y farmacodinámica**

Se trata de un fármaco que inhibe la transmisión de señales de activación, uniéndose selectivamente a las inmunofilinas del citoplasma celular (moléculas que participan en el plegamiento de proteínas implicadas en el crecimiento celular), en concreto a la ciclofilina, formando un complejo que facilita la acción del fármaco sobre su molécula diana: la calcineurina (8).

La farmacodinamia de la ciclosporina principalmente envuelve al linfocito T; su respuesta y papel en el rechazo a trasplantes, que puede ser resumida en:

- Reconocimiento de antígeno del tejido extraño.
- Procesamiento de los antígenos por macrófagos con la posterior producción y liberación de interleuquina-1 (IL-1).
- Activación por parte de la IL-1 de precursores de linfocitos T-citotóxicos, los cuales adquieren receptores para interleuquina-2 (IL-2).
- Activación de linfocitos T-helper con la producción y liberación de IL-2, la cual es acentuada por la IL-1.
- Amplificación clonal de linfocitos T-citotóxicos que causan lisis mediada por células y rechazo al tejido extraño.

La ciclosporina inhibe muchos de estos estadios, actuando tanto a nivel celular como molecular. Específicamente, la ciclosporina inhibe la síntesis de IL-2 con concentraciones de entre 10 y 20ng/mL. Tal inhibición, limita la amplificación clonal de linfocitos T-citotóxicos. A altas concentraciones (100ng/mL), inhibe la capacidad de los linfocitos T-citotóxicos de responder a IL-2. Se piensa que el mecanismo por el cual se produce esta inhibición es debido al bloqueo de los receptores de IL-2 en estas células. Por otro lado, la ciclosporina tiene un “efecto ahorro” sobre los linfocitos T-supresores.



La acción de la ciclosporina parece ser selectiva de los linfocitos T. Los linfocitos T-supresores parecen ser resistentes a la ciclosporina, mientras que los T-citotóxicos y T-helper son sensibles. Esta diferencia puede ser debida a las propiedades de unión entre fármaco y célula, y a la posterior internalización de las moléculas de ciclosporina dentro de la estructura celular (9).

Una vez introducida en el citoplasma del linfocito T, la ciclosporina se une a la ciclofilina, formando un complejo capaz de unirse a la calcineurina y provocar así la inhibición de su actividad. El resultado final de este complejo formado por tres proteínas es la incapacidad de activación de los genes que están involucrados en la activación de la célula T (10).

### **Farmacocinética**

La ciclosporina puede ser administrada por vía oral, intramuscular o intravenosa. Tras la administración oral, el fármaco es absorbido a nivel del tracto gastrointestinal mostrando gran variación interindividual. La concentración plasmática máxima la alcanza a las 2 o 3 horas después de la dosis, teniendo una vida media en suero de entre 17 y 40 horas. La ciclosporina es metabolizada en el hígado y este metabolismo es principalmente mediado por el sistema enzimático citocromo P450 monooxidasa; incluyendo N-desmetilación, hidroxilación y ciclación. Siendo identificados algunos de sus metabolitos. Muchos de estos metabolitos son excretados por vía biliar a través de las heces. Sólo el 10% son excretados por vía renal (9).

### **Posología**

Para el mantenimiento de la inmunosupresión se requieren unas dosis orales diarias de entre 10 y 20mg por kilogramo de peso. Estas dosis permiten una

concentración en suero de entre 100 a 400ng/mL. Debido a la variabilidad interindividual en la biodisponibilidad, en un rango entre el 20 y 50% en adultos, y al relativamente estrecho rango terapéutico del fármaco, la selección de una dosis terapéutica óptima debe basarse en una monitorización individual de ciclosporina en sangre. La meta es tratar a cada paciente con una dosis efectiva lo más baja posible; siendo los niveles deseados en suero entre 100 y 250ng/mL (11).

Debido a la variabilidad intra e interindividual en la farmacocinética de estos fármacos y a su estrecho intervalo terapéutico, se recomienda monitorización de sus concentraciones (8).

### **Aplicaciones terapéuticas**

Las aplicaciones terapéuticas las podemos dividir en general en dos grandes grupos:

- Trasplantes. Prevención del rechazo agudo del injerto en el trasplante alogénico de órgano sólido y de la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de médula ósea. Debido a su toxicidad, se administra asociada a otros fármacos con los que se consigue reducir la dosis y el riesgo de toxicidad.
- Enfermedades autoinmunes. En la uveítis de naturaleza no infecciosa y resistente a corticoides, la uveítis en la enfermedad de Behçet, la psoriasis grave que no responde al tratamiento convencional, indicada en síndrome nefrótico, en el tratamiento de la artritis reumatoide, en la dermatitis atópica grave y en enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. También se ha usado para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino-dependiente y otras alteraciones autoinmunes

como el liquen plano erosivo, lupus eritematoso, pénfigo, penfigoide, esclerosis múltiple (8, 11).

Además de estos dos grupos de patologías, recientemente se ha utilizado como complemento en el tratamiento de la hepatitis activa y el SIDA (5).

### **Efectos adversos**

La mayoría son dependientes de las dosis y con frecuencia son reversibles con una disminución de la misma o con el cese de administración del fármaco.

Los principales efectos adversos incluyen nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, hipertensión, neurotoxicidad, predisposición a las infecciones bacterianas, fúngicas y virales, fibrosis del tejido pulmonar, pericárdico e insuficiencia renal.

El efecto adverso más notable en términos odontológicos es el agrandamiento gingival (11).

## **1.5 NIFEDIPINA**

Se trata de un fármaco que pertenece al grupo de los antagonistas de los canales de calcio o bloqueantes de los canales de calcio dependientes de voltaje de subtipo L, desarrollados para el manejo de las enfermedades cardiovasculares. Estos fármacos pueden clasificarse según su composición química en derivados de benzodiazepina; derivado de bencilalquilamina; o sustitutos de dihidropiridinas; siendo el principal representante de este último grupo la nifedipina (7, 12).

### **Mecanismo de acción y farmacodinamia**

El calcio es uno de los mensajeros intracelulares más ubicuos y de mayor protagonismo en procesos de regulación celular de lo más variado.

Las indicaciones terapéuticas de los antagonistas de los canales del calcio se basan en sus efectos sobre la homeostasis celular del calcio en el músculo liso vascular y estriado cardiaco.

Las células se encuentran sumergidas en elevadas concentraciones de calcio, pero sólo cuando se excitan permiten el paso de este al interior, utilizando para ello sus propios canales dependientes de voltaje. Se han llegado a identificar hasta cinco canales con distinta sensibilidad a fármacos y toxinas. El tipo L se encuentra en neuronas, cardiomiocitos, células musculares lisas vasculares y no vasculares, y células endocrinas; bloqueándose por mediación de este extenso grupo que componen los antagonistas de los canales de calcio.

Los bloqueantes de los canales de calcio tipo L actúan inhibiendo el flujo de iones de calcio a través de la membrana de las células cardíacas y del músculo liso; sin que se traduzcan sus efectos en el músculo esquelético y células neurosecretoras.

La nifedipina, uniéndose a receptores acoplados a dichos canales, precipitan su cierre, el descenso de los niveles citosólicos de calcio y la vasodilatación; siendo la nifedipina el de mayor potencia vasodilatadora. Esta vasodilatación es selectiva para lechos arteriales, y se afectan poco los venosos.

La caída brusca de las resistencias periféricas y de la presión arterial, pone en marcha un doble mecanismo compensador: vasoconstricción periférica e incremento de la frecuencia y gasto cardíaco (activación simpática refleja). Por ello, la nifedipina produce una discreta taquicardia y modesto incremento de la contractilidad miocárdica (7, 12).

## **Farmacocinética**

Este fármaco se va a absorber por vía oral con gran rapidez, alcanzando su concentración máxima en 20-45 minutos y presenta una vida media de eliminación de 3 horas. Por vía sublingual la absorción es aún más rápida. El efecto hipotensor comienza a los 20 minutos (5 por vía sublingual) y perdura 4-6 horas, lo que obliga a administrarlo tres o cuatro veces al día.

Se ha desarrollado un preparado galénico: OROS (Oral Release Osmotic System) que proporciona concentraciones plasmáticas constantes durante 24 horas (12).

## **Principales aplicaciones terapéuticas**

- Angina de pecho. Efecto antianginoso derivado de la vasodilatación coronaria.
- Hipertensión arterial. Los antagonistas de los canales de calcio se consideran fármacos de primera línea en el tratamiento de la hipertensión arterial.
- Otras enfermedades vasculares. Prevención del espasmo de ciertas vasculopatías periféricas y en el tratamiento de migrañas.
- Protección renal. Indicada en nefropatías y en insuficiencia renal secundaria al uso de ciclosporina, entre otros, así como en el trasplante renal.

## **Efectos adversos**

Aunque la hiperplasia gingival es la única complicación oral recogida hasta la fecha, hay asociados al consumo de bloqueantes de canales de calcio un gran número de efectos adversos.

La potente vasodilatación puede causar enrojecimiento, cefalea, edema periférico, taquicardia refleja, hipotensión y bradicardia. Otras reacciones adversas incluyen alteraciones en la conducción cardíaca, trastornos gastrointestinales (estreñimiento), efectos betabloqueantes. Trastornos cutáneos, como la necrólisis epidérmica, dermatitis exfoliativa, erupción cutánea y fotosensibilidad, también se han registrado, además del agrandamiento gingival.

En general, son bien tolerados y efectivos. Ya que la mayoría de estos efectos adversos no son frecuentes y normalmente están limitados al efecto vasodilatador (13).

## **1.6 AGRANDAMIENTO GINGIVAL POR CICLOSPORINA Y NIFEDIPINA**

### **Antecedentes**

El primer caso de agrandamiento gingival inducido por fármacos fue registrado en 1939 como consecuencia de la administración crónica de un agente antiepiléptico, hidantoína (fenitoína - Dilantina®) (14).

La asociación entre la terapia con ciclosporina y el agrandamiento gingival fue registrada algo más tarde, a principio de los años 80, durante el proceso de evaluación inicial del fármaco. La posterior experimentación animal confirmó este efecto no deseado (9).

El primer caso de agrandamiento gingival inducido por ciclosporina fue publicado en la literatura dental en 1983 por Rateitschak-Plüss et al; quienes en un estudio sobre 50 pacientes trasplantados renales, encontraron que 7 de ellos

desarrollaron problemas gingivales similares a los anteriormente descritos para Dilantina®, pero en relación con la ciclosporina; produciéndose el agrandamiento gingival entre 4 y 6 semanas después de iniciar el tratamiento con ciclosporina (15).

Un año más tarde, en 1984, fue cuando se publicaron los primeros casos de agrandamiento gingival asociado al consumo de nifedipina por Lederman et al, quienes observaron en un paciente de 58 años en tratamiento con nifedipina un incremento de la encía que comenzó a los 3 meses de iniciar el tratamiento, que mejoraba con su suspensión y se exacerbaba con su reinstauración; siendo similar a los anteriormente descritos para fenitoína y ciclosporina (16). De manera casi simultánea, Ramon et al describieron 5 casos de agrandamiento gingival asociado al tratamiento con nifedipina de características muy similares a los agrandamientos producidos por Dilantina® (17).

### **Epidemiología**

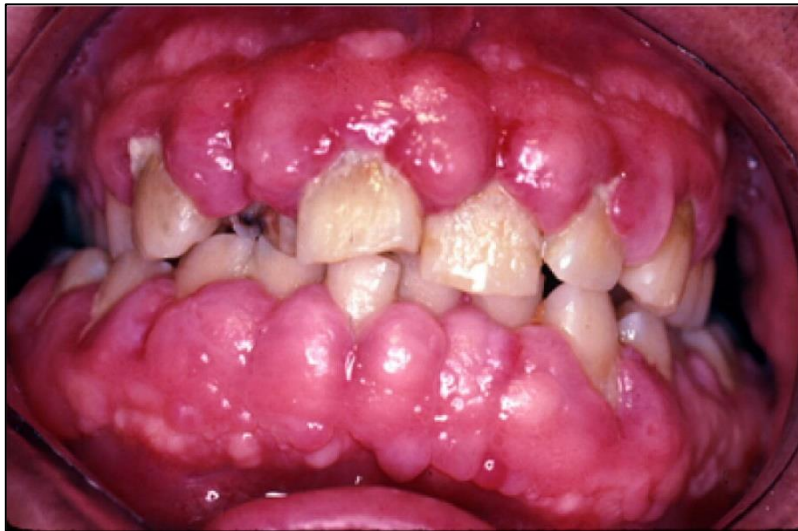
En un análisis de los diferentes estudios, la prevalencia de aparición de la hiperplasia con relación a la ciclosporina se encuentra en un amplio rango de entre el 8 al 100% (5).

Para la nifedipina, el rango de prevalencia de acuerdo con la literatura se encuentra entre el 14,7 y el 83% (18).

Por otro lado, se sugiere la existencia de sinergismo entre ambos fármacos, de manera que la prevalencia aumentaría cuando se administraran de manera conjunta (19).

### **Manifestaciones orales**

Ocurre habitualmente durante los tres primeros meses de estar recibiendo terapia con ciclosporina o nifedipina. Se produce un incremento de tamaño de la encía adherida que comienza a nivel de la papila interdental, siendo más frecuente a nivel vestibular de la región anterior que en lingual o palatino. Gradualmente, puede llegar a extenderse en sentido vestibulo-lingual y coronal, pudiendo llegar a cubrir la corona dental por completo (11, 20) (Figura 3 (21)).



*Figura 3. Imagen clínica de un paciente con agrandamiento gingival inducido por medicamentos (Nakib & Ashrafi, 2011).*

Esto va a causar problemas estéticos, dificultades funcionales (masticación, habla y contacto oclusal), además de dificultar al paciente el mantenimiento de una higiene oral adecuada, favoreciendo el acumulo de placa y la aparición de complicaciones inflamatorias en un paciente con un problema sistémico de base (3).

### **Factores de riesgo**

No todos los pacientes que consuman estos fármacos van a desarrollar el agrandamiento, de hecho, en la literatura se habla de pacientes “susceptibles” y pacientes “no-susceptibles”. De ahí que se estén tratando de identificar todos los posibles factores relacionados con la aparición y la severidad de este agrandamiento (22, 23, 24). Entre ellos encontramos:



- Edad. Reconocida como un factor de riesgo importante para la ciclosporina, siendo los niños y adolescentes más susceptibles (25). Numerosos estudios se han centrado la prevalencia dentro de pacientes pediátricos trasplantados, observándose valores significativamente más altos con respecto a los adultos (26). Esto sugiere que un componente hormonal contribuiría a la sensibilidad del fibroblasto al fármaco. Para la nifedipina, la edad no es aplicable ya que el uso de este fármaco está principalmente confinado a adultos de la tercera y mediana edad. Por lo que no se establece a la edad como factor de riesgo para desarrollo de agrandamiento gingival por nifedipina.
- Género. Muchos de estos estudios presentan sesgo debido a que los pacientes trasplantados son con más frecuencia hombres que mujeres. Parece que existe una mayor predilección por hombres que por mujeres, además de afectarse estos con mayor severidad (27). Respecto a los bloqueantes de los canales del calcio, se habla de que el hombre presenta tres veces más de probabilidad de desarrollar el agrandamiento que la mujer (28). Parece que el umbral mínimo de fármaco en suero es menor para el hombre.
- Variables del fármaco. Una gran cantidad de variables farmacocinéticas han sido estudiadas (dosis, duración, concentración en suero, saliva y fluido crevicular) sin encontrarse hallazgos consistentes. Varía mucho de un estudio a otro la manera de clasificar el agrandamiento, el momento de obtención de la muestra sanguínea, el número de pacientes y la evaluación de la farmacocinética del propio fármaco. No parecen ser datos útiles a la hora de ver cómo el paciente podría responder a uno de estos fármacos. En lo que sí parecen coincidir la mayoría de los estudios es que se requiere superar un

umbral de concentración del fármaco para que se produzcan los cambios gingivales, y este varía de un individuo a otro.

- Medicación concomitante. Es bastante común la asociación de ciclosporina con nifedipina en el paciente trasplantado para controlar la hipertensión secundaria al inmunosupresor. Existe bastante evidencia de que la combinación de ambos fármacos produce mayor agrandamiento gingival que si se administrasen de manera individual (29, 30, 31). Sugiriéndose que la prevalencia de este efecto no deseado aumenta significativamente, pero no la severidad (32).

Por otro lado, prednisolona y azitromicina parecen proporcionar cierto grado de protección frente al desarrollo del agrandamiento; pudiendo ser derivada de su acción antiinflamatoria (33).

- Variables periodontales. Los cambios inflamatorios inducidos por placa parecen exacerbar la expresión del agrandamiento, independientemente del fármaco inductor. Esto sugiere una relación de causalidad entre la higiene oral del paciente y el desarrollo del agrandamiento gingival (25, 28).

Debemos tener en cuenta que muchos de estos estudios son transversales, y es difícil de determinar si el acumulo de placa es factor inductor o consecuencia del cambio gingival. En otras circunstancias, donde hay estructuras adicionales, tales como aditamentos ortodóncicos que interfieren con la limpieza, la prevalencia del agrandamiento es alta (34).

Un ensayo en ratas sugiere que la nifedipina por sí sola no es capaz de inducir el agrandamiento, sino que requeriría la presencia de algún factor irritante como es la inflamación del periodonto (35).

En el caso de la ciclosporina, se ha observado que el estado periodontal previo al inicio del tratamiento en pacientes trasplantados está relacionado con mayor probabilidad de desarrollar el agrandamiento (36). Analizando la higiene durante el tratamiento en otro grupo de pacientes trasplantados se observó también, que esta no previene su aparición (25). Por otro lado, un estudio en niños trasplantados concluyó que el factor más relacionado con la aparición y severidad del agrandamiento era el índice de placa (37). De lo que no existe duda es que la mejora de la higiene y la reducción del componente inflamatorio, parecen minimizar la severidad del agrandamiento inducido por ciclosporina. Aunque seguimos observando a un grupo de pacientes en los que se va a desarrollar el agrandamiento independientemente de su higiene y condición periodontal, aquí otro tipo de factores deben tener mayor importancia.

- Tabaco y enfermedades sistémicas subyacentes. En un estudio epidemiológico en el que se evaluaron un amplio número de sujetos pareció tener importancia la relación entre agrandamiento gingival, tabaco, enfermedad cardiovascular y periodontitis (38). Para los bloqueantes de los canales de calcio, es interesante como los cambios gingivales son más pronunciados en pacientes que los toman por desórdenes cardiovasculares que los que los toman por otros motivos.
- Factores genéticos. Un factor clave ha sido atribuido a la heterogenicidad en los fibroblastos en los estudios *in vitro*, pero se ha tenido poco éxito a la hora de extrapolar clínicamente estos hallazgos valorando el riesgo para el paciente. Se habla de una predisposición genética del paciente que podría tener su explicación en el citocromo P450, que participa en el metabolismo

hepático de ambos fármacos, pero es poco práctico a la hora de la evaluación en clínica (39).

También se ha evaluado el polimorfismo en el gen que codifica al transportador de ciclosporina: P-glucoproteína.

Otros estudios se han centrado en la expresión del antígeno linfocitario humano (HLA). EL fenotipo de este marcador es determinado previamente al trasplante en todos los pacientes. El mecanismo no está claro, pero se ha postulado una posible relación entre la expresión de HLA y la incidencia del agrandamiento, identificándose un desequilibrio entre los genes HLA y no-HLA en el cromosoma humano 6 (40).

Un estudio sobre pacientes sometidos a trasplante y bajo terapia con ciclosporina habla de una triada que explicaría la mayor parte de la variabilidad del agrandamiento gingival. Incluyendo en esta triada a la inflamación gingival, el nivel del fármaco en saliva y la actividad residual de los factores nucleares de células T activadas (NFAT; el cual es activado por la calcineurina, la diana de nuestro inmunosupresor) (41).

### **Etiopatogenia**

Muchos estudios han intentado clarificar el mecanismo de acción por el cual se va a producir este efecto adverso a determinados fármacos que tienen características farmacológicas tan dispares. Por tanto, aunque su farmacología es muy diferente debe existir un mecanismo biológico común.

Se trata de un efecto indeseado secundario a la administración sistémica de un medicamento cuya diana no es el periodonto pero sí que va a afectar al tejido periodontal.

En general, en el agrandamiento gingival inducido por fármacos se va a producir una acumulación de componentes de la matriz extracelular en el tejido conectivo gingival con diferentes grados de infiltrado inflamatorio, acompañado de engrosamiento del epitelio correspondiente y elongación de las redes de cresta. Y aunque a grandes rasgos se trate de la misma entidad patológica, parece que a nivel molecular y celular las lesiones causadas por nifedipina y ciclosporina presentan características diferentes (42).

### **Evaluación del papel de los fibroblastos, su muerte y proliferación**

Respecto a los hallazgos sobre los fibroblastos son, en su mayoría, inconsistentes. Parece que los fibroblastos susceptibles de sufrir agrandamiento gingival responden de manera diferente a estos fármacos en comparación con células gingivales sanas, sugiriendo unas variaciones fenotípicas que dan lugar a una respuesta diferente frente al agente farmacológico (43). Tomando juntos todos los estudios, se podría decir que el mecanismo primario no va a derivar de la regulación directa sobre el metabolismo extracelular y la proliferación de los fibroblastos, pudiendo contribuir de una manera más significativa en el desarrollo y mantenimiento del agrandamiento los desequilibrios en las citoquinas (44).

Algunos estudios se han centrado en evaluar el equilibrio entre proliferación y apoptosis, observándose una disminución de la apoptosis asociada a un aumento en la proliferación celular en todas las formas de

agrandamiento gingival inducido por fármacos (45). Aunque existe una tendencia general a encontrar una disminución de la apoptosis con aumento de la proliferación, existen algunos autores que no encuentran una relación concluyente (46).

### **Evaluación de los marcadores de fibrosis**

Lo más característico del agrandamiento gingival es el proceso de fibrosis e inflamación que tiene lugar en el tejido, de ahí que muchas investigaciones se centren en el análisis de los factores relacionados con este proceso como pueden ser el colágeno, las citoquinas y los factores de crecimiento.

En este desequilibrio de la homeostasis del tejido, se han registrado alteraciones en la matriz de metaloproteinasas (MMPs) - una familia de proteínas de degradación muy en relación con la periodontitis -, los inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) y catepsina-L (enzima proteolítica).

En un estudio mediante PCR en pacientes con agrandamiento gingival por antagonistas del calcio y periodontitis se detectaron niveles elevados de MMP-1 y MMP-12 junto con aumento de la catepsina-L; y contradictoriamente, no encontraron aumento de los factores de crecimiento TGF- $\beta$ 1 y keratin-10 (47). En ese mismo estudio se analizaron biopsias de 4 pacientes con agrandamiento gingival por antagonistas del calcio, y a la principal conclusión que llegaron fue la gran variabilidad individual que presentaba esta patología. En contraposición, encontramos otro estudio en el que el nivel de esta MMP-1 se encuentra disminuido (48).

Cuando se han intentado analizar las variaciones en la MMPs y otras enzimas proteolíticas a nivel del fluido crevicular (49), los estudios han tenido poco éxito. Al igual que otros estudios relacionados con la composición salival (50).

Respecto a las factores de crecimiento, se ha evaluado el papel del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), cuya expresión se encuentra elevada en respuesta a la presencia de una herida (51). Existe amplia literatura que analiza las vías de señalización de TGF- $\beta$  y su relación con los procesos de fibrosis (52, 53). Existen 3 isoformas del TGF- $\beta$ : 1, 2 y 3. Sabemos que TGF- $\beta$  tiene un importante papel en la activación de los fibroblastos, siendo capaz de inducir la expresión de genes que promueven el depósito de componentes de la matriz extracelular y de aquellos de inhiben la MMPs (54, 55). Por otro lado, varios ensayos *in vitro* han observado que la ciclosporina es capaz de aumentar la expresión de TGF- $\beta$ 1, hecho que explicaría el efecto fibrogénico de este fármaco a nivel celular (56, 57).

Por otro lado, está tomando gran importancia la presencia del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF o CCN2); se trata de un polipéptido rico en cisteína secretado por las células del endotelio vascular y que pertenece a una familia de factores conocidos como CCN; los cuales se encargan de coordinar complejos procesos biológicos, entre los que se encuentran procesos de diferenciación y reparación. CTGF tiene su propia función como molécula de señalización celular y se asocia con la estimulación del acumulo y depósito de colágeno además de haberse establecido una relación directa con los procesos de fibrosis (43). Este CTGF es un marcador establecido de fibrosis, estudios *in vivo* muestra su presencia

en tejido fibrótico pero no en tejido normal (58). CTGF está fuertemente inducido por TGF- $\beta$ 1 (59), contribuyendo ambos a la regulación de los genes que controlan la matriz extracelular (60). Podemos considerar que TGF- $\beta$ 1 y CTGF/CCN2 van a crear un ambiente favorable para el desarrollo de la fibrosis (61), aunque ambos por sí solos no son capaces de explicar la formación de un tejido fibroso persistente, viéndose la necesidad de implicación de otros factores.

Comparando a los fibroblastos del tejido gingival con las células del hígado y el pulmón, parece que las vías de señalización de CTGF y TGF- $\beta$  presentan un comportamiento diferente en función del tejido (62).

En estrecha relación con TGF- $\beta$ , también encontramos la periostina, una proteína de la matriz celular claramente relacionada con procesos fibróticos (63). En un estudio realizado sobre biopsias de pacientes sanos y con agrandamiento gingival inducido por nifedipina se observó un incremento de la periostina mediante técnicas de inmunohistoquímica de estos respecto a los controles, además de valorar la presencia de periostina *in vitro* en cultivo celulares tratados con el fármaco (64). Hasta lo que se conoce, la presencia de periostina no se ha valorado en el agrandamiento gingival inducido por ciclosporina.

Otro factor de los factores estudiado es el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF). Su acción sobre el fibroblasto incluye la inducción de la producción de colágeno y la inhibición de la producción de colagenasas (65). Ensayos sobre fibroblastos de ratas han observado como la



ciclosporina es capaz de inducir la proliferación de receptores de IGF junto a un aumento de la síntesis de matriz extracelular (66).

Un paso esencial para un aumento de un tejido es el desarrollo de nuevos vasos o angiogénesis. La estrecha relación de CTGF y TGF- $\beta$  con el endotelio vascular podría estar relacionada con la inducción de la angiogénesis. Ensayos clínicos en ratones han demostrado el papel proangiogénico tanto de la nifedipina como de la ciclosporina sobre el tejido conectivo, relacionando al agrandamiento, principalmente en el caso de la ciclosporina, con el aumento de la microvasculatura junto con la acumulación de colágeno (67).

A nivel vascular se estudia el papel de la angiotensina y endotelina. La angiotensina es una enzima capaz de causar vasoconstricción y aumentar la presión sanguínea. Parece que el papel de la angiotensina en el agrandamiento gingival está ligado a TGF- $\beta$  (68), observándose *in vivo* como angiotensina II no es capaz de inducir fibrosis en ausencia de TGF- $\beta$  (69). También, en estrecha relación con TGF- $\beta$  parece estar la endotelina (70), un potente vasoconstrictor con capacidad para inducir fibrosis mediante la estimulación de la replicación, migración y contracción del fibroblasto, aumento de la fibronectina, inducción de la síntesis de colágeno, y disminución de la destrucción de colágeno (71).

### **Teoría de la transición de epitelio a mesénquima**

Otras hipótesis relacionan la patogénesis del agrandamiento con un proceso similar al que ocurre en algunos cánceres o enfermedades fibróticas;

caracterizado por una transición fenotípica de epitelio a mesénquima conocida como “*Epithelial to Mesenchymal Transition*” (EMT) (72).

EMT es un concepto bien definido en desarrollo embrionario, progresión del cáncer y daño o estrés epitelial en el que se produce una disminución de las proteínas asociadas con el fenotipo epitelial y un aumento de las asociadas con un fenotipo mesenquimal y migratorio.

La célula epitelial pierde su polaridad, sus uniones célula-célula y célula-matriz extracelular y son remodeladas y reorganizadas para adquirir características de células mesenquimales. En definitiva, tenemos una células que deja de ser epitelial para ser una célula fibrogénica similar al fibroblasto, una célula epitelioide que pierde sus uniones celulares, adquiere movilidad, cruza la membrana basal y se incorpora al estroma del tejido conectivo, contribuyendo a la formación de la matriz.

En el estudio de Katarci et al se demuestra la existencia de características relacionadas con el proceso de EMT (73); como es la falta de continuidad de la membrana basal en el tejido gingival afectado mediante técnicas de inmunohistoquímica, produciéndose un contacto anómalo entre el epitelio y el conectivo.

En el proceso de EMT también toman importancia el CTGF y su activador el TGF- $\beta$ 1, cuya presencia en el agrandamiento gingival ha sido demostrada por la mayoría de los trabajos y son considerados tanto inductores de EMT como potentes marcadores del proceso.

Dentro de las funciones de TGF- $\beta$ 1, vamos a encontrar que es activador de MMPs, las cuales van a tener un papel importante dentro del proceso de EMT, como va a ser la degradación de la membrana basal.

Junto a CTGF y TGF- $\beta$ 1, otros marcadores importantes de EMT son: la disminución de E-caderina (una proteína transmembrana unida a calcio que permite mantener la unión e integridad epitelial y cuya pérdida se asocia a malignidad y a mal pronóstico en cáncer) y al aumento de fibronectina; de una forma de fibronectina con ensamblaje alternativo (FN ED-A) (activada por TGF- $\beta$ 1 y que junto a este induce formación de la matriz); de la proteína 1 fibroblasto-específica (FSP-1) y la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6 (molécula mediadora de la comunicación celular, cuya mayor función es la activación del TGF- $\beta$ 1).

En la evaluación de resultados, encontraron, con excepción de la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6, una presencia significativa de estos marcadores junto con el aumento de MMP-2, MMP-9 y MMP-13 para el agrandamiento gingival inducido por ciclosporina y nifedipina. Y llegan a la conclusión de que el proceso está regulado por la interacción entre TGF- $\beta$ 1 y CTGF, el desequilibrio en los mediadores inflamatorios y la presencia de marcadores de EMT.

En relación a las integrinas, se trata de una familia de heterodímeros formados por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , encargadas de la comunicación célula-célula y célula matriz. Son receptores de membrana que median los efectos de los estímulos externos sobre el estado de la matriz extracelular, morfología celular o la expresión de enzimas de degradación entre las que se encuentran las MMPs. Como anteriormente se ha mencionado, algunas de ellas se han

relacionado con la integridad de la membrana basal y su alteración, y también con otros procesos como la periodontitis. Algunos ensayos se han centrado en su estudio y han visto que se encuentran disminuidas (74), lo que estaría a favor de esta alteración de la homeostasis que se produciría en el agrandamiento gingival.

### **Evaluación del papel del sistema inmune e inflamación**

Dentro de este agrandamiento gingival inducido por fármacos encontramos cierto grado de infiltrado inflamatorio, siendo este componente inflamatorio mayor en el caso de la ciclosporina (43). El sistema inmune innato toma gran valor a nivel de la cavidad oral debido al continuo desafío microbiano. Ante la administración de ciclosporina, que actúa principalmente atenuando al sistema inmune adquirido, se va romper la situación de equilibrio entre estos sistemas innato y adquirido, que unido a la acción de la ciclosporina sobre su diana la ciclofilina, va a alterar la acumulación y maduración de colágeno y promover la inflamación a nivel del tejido gingival (42).

En relación con el infiltrado inflamatorio, encontramos un estudio en ratas acerca de la posible interacción entre linfocitos y factores de crecimiento (75). Se centraron en el estudio del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un factor esencial en el desarrollo tanto de procesos normales como patológicos, relacionado con la inducción de la angiogénesis y migración y proliferación celular. De acuerdo con ensayos previos se observó un aumento del VEGF, junto con un aumento en los linfocitos T CD4, CD8 y CD45RO+ (células T con memoria).

## **Papel del calcio**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un mensajero intracelular clave que coordina un amplio repertorio de funciones celulares que van desde la contracción, la secreción y la fecundación para el control de la transcripción, la proliferación, varios aspectos del desarrollo así como el aprendizaje y la memoria (76, 77).

Tanto ciclosporina como nifedipina tienen cierto papel modular en el calcio intracelular, de ahí que se haya tratado de relacionar los cambios en el calcio con los que se producen a nivel gingival.

En un ensayo previo se demostró en células de rata tratadas con ambos fármacos que las oscilaciones del calcio intracelular no están relacionadas con los cambios en el metabolismo del colágeno gingival (67); pero sí que podrían asociarse de manera directa o indirecta a otros cambios que tienen lugar en el agrandamiento gingival inducido por fármacos.

## **Otras líneas de investigación**

Se ha evaluado la relación de los receptores de andrógenos con la nifedipina, en la que los investigadores sugieren que en el agrandamiento hay un aumento del número de receptores androgénicos e IL-1 $\beta$  (78).

Hasta ahora, el mecanismo sigue siendo desconocido. Se habla de una etiología multifactorial en la que existe una alteración en la homeostasia del tejido, encontrando como principales involucrados a los fibroblastos, una alteración en las citoquinas y a los factores de crecimiento.

Se hacen necesarios modelos animales para una mayor comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que conducen al agrandamiento gingival.

## **1.7 FIBROMATOSIS GINGIVAL HEREDITARIA**

### **Antecedentes**

La fibromatosis gingival hereditaria fue descrita por primera vez en 1856 por Cross (79), aunque ya se venía observando desde un siglo atrás. Se trata de una enfermedad hereditaria de carácter autosómico dominante.

Algunos autores la han clasificado como autosómica recesiva (80, 81, 82), pero hay que decir que en estos casos el agrandamiento gingival se ve asociado a otros cambios sistémicos como pueden ser cierto grado de retraso mental o dismorfismos faciales, sugiriendo la presencia de un síndrome.

### **Características y epidemiología**

Situación inherente al individuo en la que se va a producir un agrandamiento espontáneo y progresivo a nivel del tejido gingival (83). Se va a formar un tejido de color y consistencia firme, no hemorrágico y cursa de manera asintomática.

Debuta durante la infancia, coincidiendo con la erupción de la dentición permanente, siendo pocos los casos en los que se presenta desde el nacimiento (84). Afectando de igual modo a varones y mujeres. La prevalencia es de 1:175000 (85).

Presenta gran variabilidad individual, incluso dentro de la misma familia (84). El agrandamiento es más marcado durante la erupción dentaria, agravándose la situación durante la adolescencia y llegando a ser mínimo o a penas detectable en la edad adulta (84, 86). Parece que existe cierta influencia hormonal sobre el metabolismo del periodonto (87).

En un estudio epidemiológico se realizó el seguimiento de la enfermedad en más de 100 miembros pertenecientes a cinco generaciones de dos familias que presentaban esta patología (88). En este estudio se confirmó la gran variabilidad dentro de la misma entidad patológica, estableciéndose un riesgo de un 8,5% de padecer la enfermedad en una de las familias, frente a casi un 50% de probabilidad en la otra. Se observó además que existen los denominados de individuos portadores de la enfermedad, que no están afectados clínicamente por la misma pero sí pueden dar herencia de ella.

Esta fibromatosis gingival va a producir problemas tanto estéticos como funcionales, los efectos más comunes son la aparición de diastemas, malposiciones dentarias, retardo en la erupción de la dentición tanto primaria como permanente, mordidas cruzadas y abiertas, labios prominentes y ausencia de sellado labial. Además de inducir un mayor acumulo de placa bacteriana, incluyendo inflamación y halitosis.

Una condición *sine qua non* para la aparición del agrandamiento parece ser la presencia dental; es decir, la existencia del periodonto alrededor de un diente (85).

## **Histología**

Analizando las características del epitelio en la fibromatosis gingival hereditaria, observamos unas papilas elongadas y estrechas que penetran en un tejido conectivo fibroso (89). La mayoría de las investigaciones se han centrado en las alteraciones del tejido conectivo (85, 89), apareciendo de manera constante una mayor cantidad de fibras conectivas. Analizando estas fibras mediante microscopía electrónica se observan anomalías en su estructura y diámetro (90). Habitualmente podemos ver la presencia de un leve infiltrado inflamatorio crónico

subepitelial. Parece que presenta las características habituales de un tejido gingival libre con infiltrado inflamatorio (Figura 4 (91)).

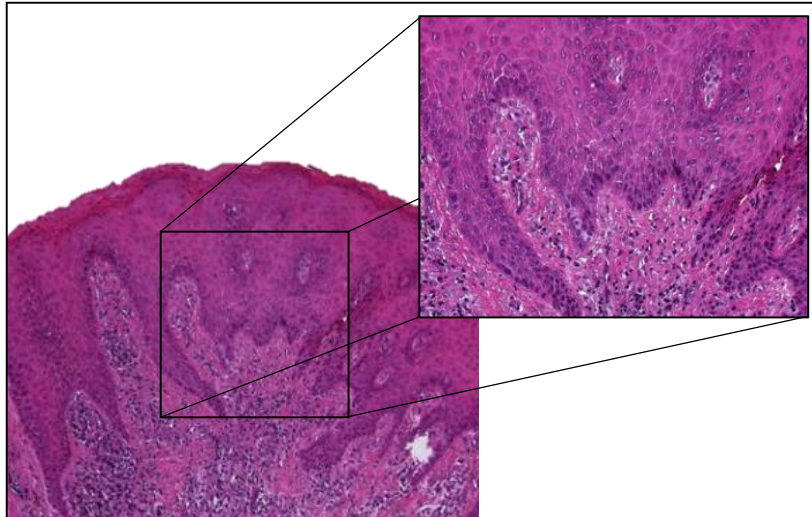


Figura 4. Corte histológico de la biopsia gingival de un paciente con fibromatosis. Hematoxilina y eosina a 10x y 50x. Se observa elongación en la crestas e infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo (Sabina et al, 2015).

Las características histológicas parecen no ser específicas, y el diagnóstico debe basarse en los hallazgos clínicos y la historia familiar del paciente (92).

### **Mecanismo biológico**

Hasta la fecha, los mecanismos biológicos involucrados en la etiopatogenia de la fibromatosis gingival hereditaria siguen siendo desconocidos, pero al igual que con el agrandamiento gingival inducido por fármacos, se han analizado ciertos factores que se pudiesen relacionar con el crecimiento del tejido.

### **Proliferación celular**

Los resultados de los primeros ensayos en cultivos celulares son contradictorios, principalmente debido a que en el pasado no se diferenciaba la fibromatosis gingival hereditaria como entidad única de otros síndromes que cursaban con fibromatosis (92), pero los últimos estudios parecen indicar que los fibroblastos procedentes de pacientes con fibromatosis gingival



hereditaria presentan mayores tasas de proliferación (93, 94). Concretamente, de Andrade (93) evaluó la proliferación celular - incluyendo cuatro técnicas diferentes - en 12 líneas celulares de distintos pacientes pero pertenecientes a la misma familia, y demostró la existencia de una proliferación de los fibroblastos de los pacientes con fibromatosis significativamente superior a los de un tejido gingival normal.

Se ha observado que una alta tasa de proliferación de fibroblastos produce unos niveles elevados de síntesis de ácidos grasos y receptores andrógenos, lo que explicaría el factor hormonal dentro de la fibromatosis (95).

### **Colágeno**

Respecto a la síntesis de colágeno, los resultados parecen ser inconsistentes, observándose tanto aumento como disminución del mismo (96).

La tendencia es a observar mayor síntesis de colágeno en el fibroblasto del paciente con fibromatosis - entre un 30 y un 40% más de síntesis de colágeno (97). Esto se une a un aumento de la presencia de una molécula específica tipo chaperona: la proteína de choque térmico 47 (Hsp47) que se asocia a una mejor maduración y agregación del colágeno tipo I, y presenta cierto efecto inhibitorio de la degradación de colágeno. La presencia de esta Hsp47 se ha encontrado significativamente elevada en los cultivos de fibroblastos de los pacientes con fibromatosis (95).

### **Degradación de la matriz extracelular**

Parece que otro de los mecanismos que contribuyen al agrandamiento es una menor degradación de la matriz extracelular. Esta se realiza a través de dos procesos: 1) fagocitosis por parte del fibroblasto (98) y 2) degeneración en el espacio extracelular por la acción de la familia de proteasas MMPs (99).

Al igual que ocurre en el agrandamiento gingival inducido por medicamentos, se ha visto un descenso en los niveles de la actividad de la MMPs (100). Este descenso va a contribuir al aumento de los niveles de colágeno.

### **Citoquinas y factores de crecimiento**

Los más estudiados son la IL-6 y el TGF- $\beta$ , la expresión de ambos puede sustentar la aparición de gran parte de las características fenotípica de la fibromatosis gingival hereditaria (101, 102). Ambos se asocian a una mayor cantidad de colágeno y Hsp47, y a una disminución de la MMP (97). Parece que esta característica también es compartida con el agrandamiento gingival inducido por fármacos (103).

El efecto que TGF- $\beta$  tiene sobre los fibroblastos parece depender de su capacidad de inducir la transdiferenciación del mismo a miofibroblasto, a través del CTGF (104). Los miofibroblastos son células altamente especializadas que tiene un fenotipo entre un fibroblasto y una célula muscular lisa, caracterizándose por la expresión de  $\alpha$ -actina (105). Estas células aparecen durante procesos de cicatrización de heridas, donde la contracción del tejido para el cierre y curación de la herida juega un papel esencial (106). Estos miofibroblastos quedan presentes de manera

permanente en lesiones fibróticas, llevando a una acumulación excesiva de colágeno (107). Por lo que parece que pudieran tener un papel importante en la fibromatosis gingival hereditaria.

La fibromatosis gingival hereditaria se trata de una patología principalmente pediátrica en la que se debe descartar la presencia de un síndrome. Aunque esta patología de manera aislada no compromete la vida del paciente, sí que va a afectar en gran medida a la calidad de vida del mismo pudiendo conllevar problemas psicosociales y funcionales.

## **1.8 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO**

Estudios anteriores han tratado de relacionar el proceso de agrandamiento gingival con cambios a nivel de la mitocondria, es necesario conocer esta estructura para poder valorar como puede llegar a influir en la aparición y persistencia del agrandamiento gingival.

El oxígeno es esencial para todos los mamíferos. Lo obtienen a través de sus pulmones y es usado para oxidar moléculas ricas en carbono e hidrógeno y producir las diferentes formas de energía. Esta energía la va a usar el organismo para llevar a cabo todas las reacciones bioquímicas necesarias para el desarrollo de su vida.

La energía se produce en forma de adenosin-5-trifostato (ATP), siendo su principal fuente de producción la mitocondria, que produce este ATP a partir de los productos del ciclo de Krebs, la oxidación de ácidos grasos, y la oxidación de aminoácidos, mediante la cadena de transporte de electrones y la fosforilación

oxidativa. Este procedimiento implica un proceso de oxidación en el que el oxígeno supone el principal combustible.

Toda esta producción de energía en la mitocondria implica respiración celular, esta, a su vez, la componen reacciones metabólicas y procesos que tienen lugar en las células para finalmente convertir, bioquímicamente, a la energía contenida en los nutrientes en una forma molecular que pueda ser utilizada por la célula: ATP. Estos nutrientes incluyen azúcares, aminoácidos y ácidos grasos; y tienen en común al oxígeno molecular ( $O_2$ ) como agente oxidante, usándose como aceptor final del electrón. Así se produce la respiración aeróbica.

La energía producida y almacenada en forma de ATP será utilizada en todos aquellos procesos celulares dependientes de energía; como son la biosíntesis, el movimiento o el transporte de moléculas a través de la membrana celular (108).

Para hablar de disfunción mitocondrial, es importante conocer la estructura y función de la mitocondria. Sabemos que es un constituyente esencial en la mayoría de células eucariotas y que su diámetro oscila entre 0,5 y  $10\mu m$ . Como se ha dicho anteriormente, supone una fuente de energía química para la célula; pero esta no es su única función, también está involucrada en los procesos de señalización a través de la homeostasis del calcio, diferenciación celular, apoptosis, crecimiento celular, mantenimiento del gradiente iónico transmembrana, síntesis proteica y transporte vesicular (109).

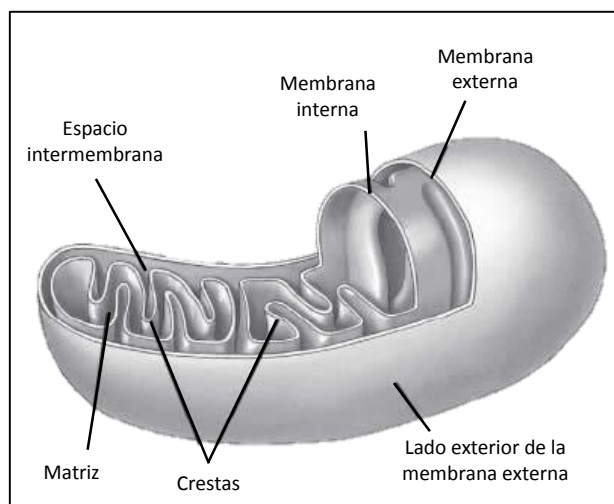


Figura 5. Estructura de la mitocondria.

Estructuralmente, se encuentra cubierta por una doble membrana, es decir, dos bicapas lipídicas que separan cuatro compartimentos (Figura 5):

- I. Membrana externa. Es lisa y supone el límite entre la mitocondria y el citosol. Contiene las porinas mitocondriales y una proteína canal voltaje-dependiente selectiva de aniones. Esta membrana es altamente selectiva, dejando pasar por difusión simple a las moléculas de tamaño inferior a 500 Da mientras que previene el paso de moléculas mayores.
- II. Espacio intermembrana. Contiene iones y moléculas esenciales para los procesos que se van a desarrollar en la mitocondria.
- III. Membrana interna. Forma una serie de invaginaciones hacia la matriz mitocondrial conocidas como crestas. La densidad de estas crestas varía en función del tejido. Esta membrana es poco permeable, sólo permite la difusión simple de algunos compuestos como agua, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>; el resto de moléculas de importancia biológica necesitan la ayuda de canales específicos y proteínas transportadoras para traspasar la membrana. A diferencia de la membrana externa, esta membrana se encuentra libre de colesterol en su composición.  
  
Aquí en la membrana interna es donde se aloja el complejo megadalton de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa.
- IV. Matriz mitocondrial. Es donde tiene lugar el ciclo de krebs, la  $\beta$ -oxidación, y la síntesis de colesterol y lípidos. En la matriz también encontramos al ADN mitocondrial; se trata de un ADN circular compuesto por 37 genes. Este ADN codifica un número limitado de proteínas mitocondriales específicas, ARN

ribosómico y ARN de transporte; el resto de proteínas son producidas en el núcleo. Este ADN, para una mayor protección, se empaqueta en forma de nucleótidos compuestos por una o más copias asociado a proteínas.

Lo característico del ADN mitocondrial es que su herencia es vía materna y acumula un gran número de mutaciones debido a que no está protegido por las histonas, es ineficazmente reparado y está más expuesto al daño oxidativo producido por los radicales libres.

Las copias del ADN mitocondrial en una única célula pueden ser de cientos o miles; por ello, cuando todo este ADN es idéntico, prevalece una situación conocida como homoplasma; mientras que cuando prevalecen dos o más genomas mitocondriales resulta en heteroplasma; esa heteroplasma supone un importante factor de severidad a tener en cuenta en las patologías mitocondriales.

La población mitocondrial es dinámica y muestra variaciones en número, tamaño y masa durante las distintas etapas del desarrollo, diferenciación celular y diversas situaciones tanto fisiológicas como patológicas (110). Dentro de esta dinámica toma importancia el fenómeno de biogénesis mitocondrial en el que confluyen: 1) proliferación mitocondrial, que consiste en el aumento del número de mitocondrias por célula, y 2) diferenciación, mediante la cual este orgánulo adquiere sus características estructurales y funcionales específicas anteriormente descritas (111). Este fenómeno de biogénesis mitocondrial permite adaptar la población de mitocondrias a las demandas energéticas a través de la dinámica y la bioenergética mitocondrial, siendo unos de los moduladores más importante de la biogénesis

mitocondrial el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM), a través de la interacción directa con el ADN mitocondrial (112).

El número de mitocondrias por células está fuertemente relacionado con las demandas energéticas del tejido, pudiendo contener desde una docena a varios miles de mitocondrias por célula. Los órganos con mayor actividad metabólica contienen un mayor número de mitocondrias, así ocurre en músculo (liso, esquelético y cardíaco), hígado y cerebro. Siendo, por tanto, más susceptibles a la actuación de fármacos sobre la mitocondria y a las patologías mitocondriales.

En muchos tejidos el estudio de la mitocondria mediante microscopía electrónica ha demostrado la existencia de las denominadas redes mitocondriales, en las que estas, forman fragmentos y ramificaciones de estructuras mayores. Otros datos hablan de un comportamiento célula/tejido-específico de la mitocondria en su dinámica, morfología, regulación y organización intracelular. Lo que indicaría una integración de la mitocondria dentro del citoesqueleto, el núcleo y el retículo endoplásmico (113).

La visión de la mitocondria como productora de energía ha cambiado desde que se tiene conocimiento de su comportamiento dinámico en respuesta a señales intracelulares. Ahora sabemos que la mitocondria forma un retículo funcional cuyo estado estable morfológico es regulado por una dinámica de acontecimientos de fisión, fusión y movilidad (114).

Como hemos comentado anteriormente, la estructura mitocondrial es altamente dinámica en función del tipo celular e incluso en una misma célula, pudiendo tener una amplia variedad de formas que van desde pequeñas esferas o bastones cortos a túbulos largos. Hay estudios que afirman que la mitocondria está

en constante movimiento y transiciones estructurales. Los túbulos mitocondriales se mueven con sus ejes longitudinales alineados con el tracto citoesquelético. Las mitocondrias aisladas pueden reconocerse entre sí durante estos movimientos y sufrir fusión, dando como resultado la fusión de las dobles membranas y la mezcla de ambas bicapas lipídicas y el contenido de la matriz mitocondrial. Por otro lado, una única mitocondria puede dividirse por fisión y dar lugar a dos o más mitocondrias más pequeñas. La mitocondria está en continua fusión y división, teniendo consecuencias importantes sobre su forma, función y distribución. Esta dinámica permite:

- Controlar la forma, longitud y número de mitocondrias.
- El intercambio del contenido de las membranas lipídicas e intramitocondrial (esencial para el mantenimiento de una población mitocondrial sana).
- Afectar a la habilidad celular para distribuir sus mitocondrias en localizaciones subcelulares específicas. De hecho, las células especializadas presentan diferentes poblaciones mitocondriales con características estructurales y funcionales específicas para desempeñar tareas especializadas.
- Con la fisión se facilita la apoptosis celular regulando la liberación de proteínas desde el espacio intermembrana hacia el citosol.
- El envejecimiento de la mitocondria la hace más fácilmente detectable en células con baja tasa de recambio (como la neurona).

Esta dinámica mitocondrial representa el mecanismo central de adaptación bioenergética a las necesidades metabólicas de la célula. La morfología mitocondrial afecta a la producción de ATP y eficiencia energética, y esta morfología cambia en



función de las demandas de ATP y disponibilidad de sustrato. Así, ante una baja demanda con sustrato suficiente, las mitocondrias serán más fragmentadas y numerosas, mientras que ante una mayor demanda con baja disponibilidad de sustrato, las mitocondrias se fusionarán y alargarán para mantener los niveles de ATP y la viabilidad celular (115).

Podemos decir que dentro del funcionamiento celular, la dinámica mitocondrial tiene consecuencias en el desarrollo, la enfermedad y la apoptosis (116). Así, se conoce que la mitocondria está fuertemente involucrada a gran cantidad de procesos biológicos debido a sus dos características únicas: 1) a su elevada dinámica y cambios morfológicos, y 2) a su capacidad de detectar e influenciar las señales intracelulares (iones y moléculas como el  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, pH y el potencial reductor) (117, 118).

El flujo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  está altamente asociado con la mitocondria. Esta contribuye eficazmente a dar forma a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de su absorción y liberación (119, 120, 121). Existen multitud de transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en las membranas mitocondriales (122). Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial actúan sobre una serie de vías de señalización relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y es capaz de cambiar el estado oxidativo y controlar la función mitocondrial, oxidación de nutrientes, permeabilidad mitocondrial, muerte celular y morfología mitocondrial (123). El estudio de estas señales *in vivo* está constituyendo todo un desafío (124), tomando gran interés el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la generación de ROS y la regulación energética celular (125).

La función mitocondrial también se ha relacionado con la inmunidad innata. Recientemente se han descubierto vías de señalización mediadas por la mitocondria

que activan la respuesta inmune innata del huésped frente a la infección viral y quizás pudiera interferir en la apoptosis celular (126).

A pesar de todas estas funciones que se asocian a la mitocondria, el proceso de fosforilación oxidativa tiene un papel destacado ya que la supervivencia celular va a depender de una generación eficiente de energía. Entender las vías por las cuales se va a producir esta energía es importante para comprender las enfermedades asociadas a la mitocondria.

La fosforilación oxidativa supone el culmen de la respiración celular en la que la energía de la oxidación va a impulsar la síntesis de ATP. Este proceso no es más que el flujo de electrones por una cadena de transportadores transmembrana en la que finalmente se va a producir la oxidación de  $O_2$  a  $H_2O$  gracias a los electrones cedidos por el NADH (nicotinamida adenín dinucleótido reducido) y el  $FADH_2$  (flavina adenín dinucleótido reducido).

Los transportadores transmembrana van a actuar secuencialmente, estos son en su mayoría proteínas con la capacidad de aceptar y donar uno o dos electrones. Además del NAD y FAD, hay otros tres tipos de moléculas que funcionan en la cadena respiratoria:

1. Benzoquinona hidrofóbica o ubiquinona, también llamada coenzima Q (CoQ).
2. Citocromos.
3. Proteínas ferrosulfatadas.

Estos transportadores de electrones se organizan en complejos supramoleculares incrustados en la membrana interna de la mitocondria.

Encontramos así cuatro complejos distintos:

- Complejo I: NADH a ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa.
- Complejo II: succinato a ubiquinona
- Complejo III: ubiquinona a citocromo c.
- Complejo IV: citocromo oxidasa. Aquí es donde se produce el paso de  $O_2$  a  $H_2O$ .

En definitiva, los electrones llegan al CoQ a través de los complejos I y II; y este actúa como transportador móvil de electrones y protones. Pasa los electrones al Complejo III, el cual los pasa a otro escalón de conexión móvil, el citocromo c. El complejo IV transfiere los electrones desde el citocromo c reducido al  $O_2$ . Y el flujo electrónico a través de los Complejos I, III y IV, va acompañado del flujo de protones desde la matriz al espacio intermembrana.

Este movimiento de electrones crea un gradiente electroquímico transmembrana, y esta fuerza protón-motriz es usada por el denominado complejo V (ATP sintetasa) para sintetizar finalmente ATP.

Aunque la fosforilación oxidativa es el procedimiento más eficiente para la obtención de ATP, lleva consigo la generación de ROS como resultado de una reacción prematura de los electrones con el  $O_2$  en el Complejo I o en el III (127).

El radical libre puede ser definido como una especie molecular o atómica con uno o más electrones desapareados en su estructura. Los radicales libres más

importantes son los derivados del oxígeno. Las especies reactivas del oxígeno no sólo incluyen a los radicales libres del oxígeno, sino también a los derivados del oxígeno no-radicales involucrados en la producción de radicales de oxígeno (128). Todos ellos, forman un conjunto de moléculas muy reactivas que pueden oxidar a un gran rango de sustratos biológicos diferentes.

### ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Radicales		No radicales	
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Oxígeno	$O_2$
Hidroxilo	$OH^{\cdot}$	Ozono	$O_3$
Hidroperóxido	$HOO^{\cdot}$	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Ariloxilo	$ArO^{\cdot}$	Peróxido de hidrogeno	$H_2O_2$
Arilperóxido	$ArOO^{\cdot}$		
Peroxilo	$ROO^{\cdot}$		
Aciloxilo	$RCOO^{\cdot}$		
Acilperóxido	$RCOOO^{\cdot}$		

Estos ROS se forman de manera habitual como resultado del metabolismo celular normal, y son esenciales para varios procesos fisiológicos incluyendo la fosforilación proteica, activación de factores de transcripción, diferenciación celular, apoptosis, maduración de ovocitos, esteroidogenesis, inmunidad celular, y defensa celular contra microorganismos (129). Sin embargo, cuando se producen en exceso

pueden afectar la función celular a través del daño a lípidos, proteínas y ADN celular (129, 130), considerándose como productos de oxidación avanzada.

Con el fin de mantener la salud del organismo es necesaria la existencia de un equilibrio en la producción de radicales libres y sus efectos dañinos, conocido como estrés oxidativo.

El buen estado del organismo depende de la actuación eficiente de un sistema de defensa frente al daño oxidativo inducido por radicales libres y/o especies reactivas del oxígeno. Halliwell definió en 1997 a los antioxidantes como “aquellas sustancias que estando en bajas concentraciones con respecto a las biomoléculas que protegen, previenen o reducen el daño que sufren las mismas debido al daño oxidativo” (131). Desde un punto de vista funcional, estos antioxidantes se pueden clasificar en base a su actuación en:

- Antioxidantes preventivos.
- Eliminadores de radicales libres.
- Reparadores y cofactores enzimáticos.

La mitocondria es la principal fuente intracelular de estos radicales, y como consecuencia directa, su principal diana. Podemos decir, que en condiciones fisiológicas normales, entre el 1 y el 5% del O<sub>2</sub> consumido por la mitocondria, es convertido en especie reactiva del oxígeno. Cualquier defecto en la cadena respiratoria de un paciente que presente patología mitocondrial o un paciente de edad avanzada, puede incrementar la producción de aniones superóxido por la mitocondria (132).

Esta organela, tan susceptible de sufrir daño *in situ*, para tratar con la continua producción de especies reactivas por el metabolismo aeróbico, ha desarrollado sus propias enzimas antioxidantes: manganeso superóxido dismutasa, cobre/zinc superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (133).

Aunque estas enzimas en combinación con otros antioxidantes puedan acabar con la mayoría de las especies reactivas del oxígeno y radicales libres generados bajo condiciones normales, un porcentaje de estos podría escapar de los mecanismos de defensa y causar daño a macromoléculas celulares importantes, tales como, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (134).

Las investigaciones acerca de esta disfunción mitocondrial y estrés oxidativo están relacionándola con procesos patológicos que cursan con inflamación. La inflamación es un proceso fisiológico de defensa en el que el organismo va a consumir gran cantidad de energía, dependiendo por tanto de la mitocondria, por lo que cualquier alteración en el proceso tendrá como consecuencia una agresión patológica que podría explicar ciertas enfermedades.

En la mitocondria se van a integrar información de señalización y metabolismo celular, tales como los niveles de oxígeno, ATP, NADH,  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, especies reactivas de nitrógeno y componentes de la vía apoptótica. No es extraño pensar que cualquier alteración en su estructura y funcionamiento va a desencadenar numerosas patologías incluyendo a las afectaciones cardíacas, renales y hepáticas, enfermedades neurodegenerativas, procesos de envejecimiento y fallo multiorgánico asociado a shock séptico (135); así como otras enfermedades que cursan con inflamación crónica como son el síndrome metabólico, la diabetes mellitus, la aterosclerosis y la periodontitis (136).

## 1.9 ENFERMEDADES SISTÉMICAS Y MITOCONDRIA

Como anteriormente hemos comentado, la mitocondria aparte de ser conocida como la productora energética de la célula, también interviene en multitud de procesos clave para el funcionamiento celular como son la señalización, diferenciación celular, y control del ciclo celular y de la apoptosis (137). Consecuentemente, cualquier cambio en su función y/o estructura puede desencadenar patología.

Un mantenimiento adecuado de las funciones mitocondriales se vuelve esencial ante situaciones de alta demanda energética como puede ser un proceso inflamatorio, así la mitocondria está en el punto de mira para muchas enfermedades, concretamente para todas aquellas patologías que cursan con inflamación como son las enfermedades cardiovasculares (138), la aterosclerosis, la obesidad (139), la diabetes (140) y sus complicaciones (141), y la enfermedad periodontal; englobándose en su mayoría en el proceso de síndrome metabólico (142).

Por otro lado, la artritis reumatoide, dentro de las enfermedades inflamatorias autoinmunes de tipo crónico, presenta un daño degenerativo cuyo mecanismo patogénico se ha asociado al daño de componentes celulares esenciales por parte de los radicales libre del oxígeno derivados del estrés oxidativo en ensayos en animales (143).

En el caso del cáncer humano, las investigaciones se están centrando en las ROS, que llevan a un estado de aumento de la producción de mediadores inflamatorios (144, 145). Siendo la inflamación un componente crítico en la progresión de los tumores, muchos de ellos evolucionan desde una infección

localizada, a irritación crónica e inflamación. Se están desarrollando diversos tratamientos antiinflamatorios para combatir al cáncer (146).

Respecto al papel de la disfunción mitocondrial en la diabetes, existe una “hipótesis unificada” de que la sobrecarga de glucosa podría dañar a la célula a través del estrés oxidativo. Siendo esto responsable de la etiopatogenia de la mayoría de las complicaciones que tienen lugar en el paciente diabético (147, 148). Como consecuencia del exceso de radicales libre se produciría la formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs), estos a su vez mediante la activación de diferentes vías moleculares proinflamatorias. Se ha observado que la administración de antioxidantes al paciente diabético previene de la aparición de complicaciones como la retinopatía, nefropatía y cardiomiopatía (149); en cambio, fallan como tratamiento de estas complicaciones (150).

En el caso de la aterosclerosis, una patología caracterizada por la inflamación, junto a una alteración de la respuesta inmune y por ser un proceso proliferativo, se ha determinado una “*delección mitocondrial común*” en el ADN mitocondrial que frecuentemente se asocia a esta patología (151). Esta delección provoca una mala reparación del ADN mitocondrial dañado, quedando más expuesto a las especies reactivas del oxígeno. En lesiones de pacientes con aterosclerosis se ha observado un cúmulo de alteraciones tanto en el ADN nuclear como el mitocondrial en asociación directa con el grado de la lesión (152). Parece que se produce un daño progresivo de la cadena respiratoria mitocondrial que va a reducir el aporte energético a la célula alterando su actividad (153). Además se ha observado que los fármacos comúnmente usados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tienen cierto efecto antioxidante (154). También parece ser que este tipo de paciente se ven muy



beneficiados por los cambios en su alimentación con una dieta que incluya el consumo de frutas y verduras ricas en antioxidantes (155).

En nuestro siglo, cada vez existe una mayor demanda de consumo de alimentos antioxidantes con la esperanza de mantenerse saludables y libre de enfermedad (156). Estando ya establecido el potencial efecto beneficioso de los antioxidantes frente a distintas patologías. El consumo exógeno supone la mayor fuente de antioxidantes del organismo (157).

Cada vez tenemos mayor evidencia del papel que el daño o disfunción mitocondrial tiene dentro del envejecimiento y las patologías. Las alteraciones de su dinámica normal van a manifestarse de manera sistémica (158).

### **Enfermedad periodontal y disfunción mitocondrial**

La entidad más ampliamente estudiada debido a su alta prevalencia en la población general es la periodontitis crónica, afectando alrededor del 40% de la población a partir de los 50 años (159, 160). Ensayos clínicos demuestran la relación entre la periodontitis y el incremento del estrés oxidativo con la disminución de la capacidad antioxidante (161).

Un ensayo sobre un amplio número de pacientes con y sin periodontitis demostró que en los paciente con periodontitis la existencia de una relación directa entre el estrés oxidativo y el acortamiento de telómeros (162) - regiones no codificantes del ADN que dan estabilidad estructural al cromosoma y están muy asociados con procesos de envejecimiento y carcinogénesis.

Análisis mediante microscopía electrónica de fibroblastos del tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica han observado anomalías morfológicas en

un 60% de los pacientes, junto a un incremento en la producción de ROS, y a una reducción del potencial de membrana mitocondrial y el consumo de oxígeno. Además, se detectaron mutaciones en el ADN mitocondrial de los fibroblastos del tejido gingival que no parecían a nivel de células sanguíneas (163). Estas mutaciones parecen que se acumulan en el ADN mitocondrial de los fibroblastos gingivales por una acción directa de las ROS (164).

En análisis mediante microscopía electrónica de pacientes con agrandamiento inducido por bloqueantes de los canales del calcio con una patología cardiovascular de base se observa una restauración de la morfología mitocondrial respecto a los pacientes con patología cardiovascular no tratados con estos fármacos (165).

En esta relación entre enfermedad periodontal y mitocondria se habla de la existencia de un estado proinflamatorio en el que la respuesta inflamatoria del individuo se ve modificada por el estrés oxidativo/disfunción mitocondrial.

## **1.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En los últimos años la investigación de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal se ha centrado en la búsqueda de su relación con distintas patologías sistémicas como son la enfermedad cardiovascular, la diabetes o el bajo peso del niño al nacer entre otras. Uno de los aspectos estudiados ha sido el del papel que juega el estrés oxidativo, y en relación directa con este, la mitocondria. Debido a la cantidad de funciones que se van atribuyendo a esta organela, está adquiriendo un papel protagonista como responsable de muchas patologías entre las que encontramos aterosclerosis, hipertensión, resistencia a la insulina, fallo cardíaco, cáncer y procesos de envejecimiento.

Una de las vías para el estudio de esta relación es la evaluación de la cavidad oral de los enfermos cardiovasculares, y dentro de ellos destacan los efectos que sobre la homeostasia de la encía pueda tener tanto la enfermedad en sí como la medicación que puedan estar tomando. Los efectos secundarios de distintos fármacos a nivel de la encía, como el agrandamiento gingival, ha sido objeto de estudio en los últimos años, destacando a la ciclosporina y la nifedipina. Se trata de fármacos que una vez prescritos, van a acompañar al paciente por el resto de su vida. La ciclosporina se utiliza como medicamento modulador de la respuesta inmune en pacientes trasplantados principalmente, pero tiene efectos cardíacos secundarios. Por otro lado, la nifedipina se utiliza como medicamento vasodilatador en la hipertensión. Se ha intentado ver el mecanismo etiopatogénico involucrado en este proceso que parece compartir ciertas características tanto clínicas como subclínicas con la fibromatosis gingival hereditaria, pero no se ha llegado a conclusiones evidentes. Por ello, vamos a estudiar el mecanismo por el cual se va a producir este agrandamiento que en tantas ocasiones se ha tratado en la literatura, buscando incorporar los nuevos conocimientos de la biología molecular que se han adquirido en los últimos años. Nos centraremos en el análisis de los parámetros mitocondriales alterados en la encía de manera secundaria a los fármacos, además indagaremos en ver si la alteración de estos parámetros se da también a nivel del miocardio. Con ello intentaremos correlacionar las alteraciones mitocondriales en ambos tejidos: el miocardio y la encía.



# Hipótesis

---



## **2. HIPÓTESIS**

El agrandamiento gingival inducido por fármacos conlleva cambios estructurales y morfológicos que podrían estar asociados a alteraciones oxidativas y mitocondriales. Además, estos cambios podrían tener una correlación con otros tejidos sistémicos como el tejido cardíaco. Por último, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo podrían estar también involucrados en el agrandamiento gingival asociado a fibromatosis gingival hereditaria.





# Objetivos



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo principal**

Evaluar si los cambios en el metabolismo mitocondrial y el estrés oxidativo tienen relación con la etiopatogenia del agrandamiento gingival inducido por fármacos en un modelo animal, así como en un modelo genético de la enfermedad como es la fibromatosis gingival hereditaria.

#### **3.2 Objetivos secundarios**

- I. Evaluar el estado oxidativo y mitocondrial en un modelo animal de agrandamiento gingival inducido por ciclosporina A y nifedipina.
- II. Establecer una posible relación entre lo que ocurre en el periodonto con lo que sucede en el músculo cardíaco en un modelo animal de inducción de agrandamiento gingival con fármacos.
- III. Evaluar los cambios en el metabolismo y estrés oxidativo en un modelo humano de agrandamiento gingival.



# Material & Método

---



## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1 ANIMALES Y CONDICIONES DE ESTABULACIÓN

Tras la aprobación por parte del Comité de Ética del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla, se tomaron 33 ratas Wistar (*Rattus Norvegicus*) adultas, machos de entre 250 y 400 g de peso que se dividieron de manera aleatoria en tres grupos de 11 ratas cada uno:

1. Grupo control (CTL).
2. Grupo nifedipina (N).
3. Grupo ciclosporina (CsA).

Durante el periodo experimental se encontraron estabuladas en el Servicio de Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, con libre acceso a agua y pienso, a temperatura constante de 25 grados y 12 horas alternas de luz y oscuridad. Durante un periodo de 6 semanas las ratas recibieron una inyección intraperitoneal diaria de distintas soluciones en función del grupo al que pertenecían:

1. Grupo CTL; 1mL de suero salino fisiológico.
2. Grupo N; 1mg/kg de peso de Adalat® (Bayer, Leverkusen, Alemania).
3. Grupo CsA; 30mg/kg de peso de Sandimmun® (Novartis, Basel, Suiza).

Al final del periodo experimental, todas las ratas fueron anestesiadas con Ketamine/xylazine (100/10 mg/kg) y sacrificadas mediante decapitación con

guillotina. Se Tomaron entonces muestras de encía, músculo cardíaco y una hemimandíbula para su análisis con microscopía óptica, microscopía electrónica y bioquímica.

## **4.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO**

### **Microscopía óptica**

Una vez extraídas las muestras de mandíbulas se fijaron en formaldehído al 4% durante 12 horas. Tras la fijación se sumergieron en 15mL de solución descalcificadora OsteoSoft® (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 15 días, antes de proceder a la técnica habitual de inclusión en parafina. Al 5º día del inicio de la descalcificación se les practicó una incisión transversal con bisturí frío, de manera que obtuvimos un bloque de unos 5mm de grosor que contenía los molares de la rata con su encía alrededor.

Procedimos entonces a la técnica habitual de inclusión en parafina realizada por un procesador de tejidos (STP-120, ESPECIALIDADES MÉDICAS MYR, S.L).

Obtenidos los bloques se realizaron cortes al micrótopo de entre 4 y 5 µm de espesor. Los cortes se colocaron en un baño de 37°C, se recogieron con portaobjetos silanizados, y se conservaron durante 60 minutos en la estufa a 60°C. Realizamos entonces la tinción con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E):

- Hidratación del tejido:
  - Xilol 1 durante 10 minutos.
  - Xilol 2 durante 10 minutos.



- Bateria de alcoholes decrecientes:
  - 30 pases en etanol de 100°.
  - 30 pases en etanol de 100°.
  - 30 pases en etanol de 90°.
  - 30 pases en etanol de 80°.
  - 30 pases en etanol de 70°.
  - 5 minutos en agua destilada.
  
- Tinción:
  - Hematoxilina (colorante básico), durante 2 minutos.
  - Lavar con agua de grifo y escurrir en papel de filtro.
  - 2 pases en carbonato de litio ( $\text{CO}_3\text{Li}_2$ )
  - Lavar con agua de grifo y escurrir en papel de filtro.
  - Eosina (colorante ácido), durante 2 minutos.
  - Lavar con agua destilada y escurrir en papel de filtro.
  
- Deshidratación:
  - Bateria de alcoholes crecientes:
    - 30 pases en etanol de 70°.
    - 30 pases en etanol de 80°.

- 30 pases en etanol de 90°.
  - 30 pases en etanol de 100°.
  - 30 pases en etanol de 100°.
- Xilol 1 durante 10 minutos.
  - Xilol 2 durante 10 minutos.

Se montaron los cristales echando una gota de resina para pegar el cubre y se dejó secar.

### **Análisis morfométrico de la microscopía óptica**

Se tomaron fotografías de las tinciones de H&E para la medición del agrandamiento gingival, valorándose este con dos medidas:

- A. Altura del tejido gingival: como la distancia entre la cresta ósea marginal y el margen gingival de la encía libre siguiendo el eje axial del diente.
- B. Anchura del tejido gingival: como la distancia entre la superficie dental y la superficie del epitelio a nivel del límite apical del epitelio de unión en sentido perpendicular al eje axial del diente.

Se seleccionaron para ello solamente aquellos cortes en los que la encía y el diente aparecían íntegros. Para la medición se realizaron microfotografías a una magnificación de 10x, tomándose como referencia una cuadrícula micrométrica colocada en el ocular del microscopio óptico (Olympus). Las fotografías se calibraron y midieron con la ayuda del software ImageJ 1.46r, programa de dominio público del U.S. National Institutes of Health (Rasband WS. ImageJ. U.S. National

Institutes of Health, Bethesda, Maryland. 2008) (Figura 6). Se realizaron tres mediciones distintas por el mismo operador y se realizaron las medias.

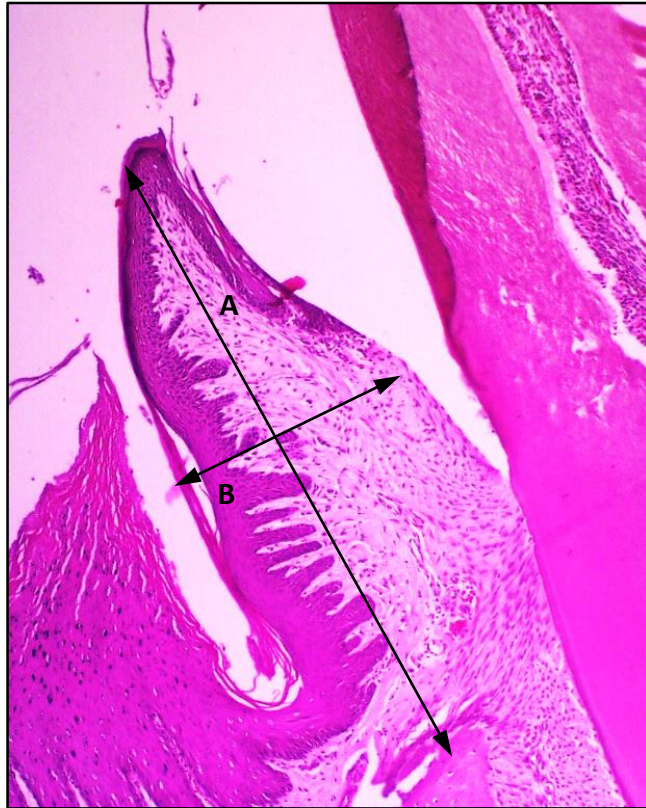


Figura 6. Análisis morfométrico del tejido gingival. A) Altura del tejido gingival, B) Anchura del tejido gingival.

### **Microscopía electrónica**

Realizamos técnicas de microscopía electrónica en las muestras de encía y músculo cardíaco siguiendo la técnica previamente descrita por Quiles et al en 2010 (166). Para ello, fueron inmediatamente seccionadas en piezas pequeñas y fijadas en una solución de formaldehído al 1,5% en tampón de cacodilato al 1%, pH7,4 durante 2 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados con un tampón de cacodilato, continuándose la fijación con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% durante 60 minutos. La temperatura de la muestra durante el procesado se mantuvo en 4°C.

Lavamos con agua destilada y procedemos a la deshidratación de la muestra mediante una escala de etanoles creciente:

- 15 minutos de etanol al 30%.
- 15 minutos de etanol al 50%.
- 2 horas de etanol al 70%.
- 15 minutos de etanol al 90%.
- 15 minutos de etanol al 100%.
- 15 minutos de etanol al 100%.

La muestra entonces es embebida en una resina Epon, y tras permanecer incubando toda la noche a 65°C, se realizan los cortes con un ultramicrotomo (Ultracut S). Primero se practica un corte semifino de 1µm perpendicular a la superficie del epitelio y el tejido conectivo subyacente de manera que nos permita escoger el corte adecuado para nuestro estudio de las ultraestructuras del fibroblasto y célula muscular cardíaca. Posteriormente se realizan cortes ultrafinos de 70nm de espesor con una hoja de diamante usando el ultramicrotomo Ultracut S y estos cortes se recogen en una rejilla de cobre.

Todas las secciones se tiñeron sumergiéndolas durante 5 minutos en acetato de uranilo en solución acuosa y durante 3 minutos en una contratinción de citrato.

Los cortes se visualizaron con el microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10C (Oberkochen, Germany) a 4000x, 7500 y 40000x aumentos en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada.

El software ImageJ 1.46r fue usado para determinar el área y perímetro de las mitocondrias.

### **Análisis morfométrico de la microscopía electrónica**

Para su análisis morfométrico, se consideraron sólo aquellos fibroblastos del tejido conectivo superficial y células musculares cardíacas en las que se apreciaba el núcleo. Se tomaron imágenes con el microscopio electrónico de transmisión y se estudiaron mediante un software analizador de imágenes ImageJ 1.46r y se determinaron el área y el perímetro de las mitocondrias.

### **4.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

Se determinarán tanto en las muestras de encía como en las de corazón.

#### **Preparación de los homogenados de las muestras**

Las muestras de tejidos de encía y corazón debidamente identificados, fueron seccionados en trozos más pequeños y homogenados usando sobre un eppendorf un mezclador (VWR™ Pellet Mixer, VWR International), y añadiendo 300 µl de tampón de lisis por cada 5 µg de tejido (tampón de lisis: 0,9% NaCl, 20mM TrisHCL pH 7,6, 0,1% Tritón x-100), al que se le incluyó un cóctel inhibidor de proteasas (1% PMSF, 1% CIP).

Las muestras se sonicaron para liberar las proteínas de las membranas celulares con pulsos de 4 segundos y manteniendo la cadena de frío usando un sonicador (Bandelin, Sonoplus de LABOLAN). Los eppendorf se centrifugaron durante 5 min a 10000rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante. Estos homogenados se conservaron a -80°C hasta su uso.

#### **Cuantificación de la cantidad de proteínas en los homogenados**

Se determinó la cantidad de proteína del homogenado usando el método de Bradford (167).

El ensayo se realiza añadiendo en una placa multipocillo: 10 $\mu$ L de NaOH 1M, 1 $\mu$ L de la muestra y 200 $\mu$ L de reactivo de Bradford. Se usa como blanco un pocillo con NaOH y reactivo de Bradford. Después de dejar incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, se mide la absorbancia a 595nm en un lector de microplacas para absorbancia iMark (Bio-Rad).

La cantidad de proteína se determinó mediante una recta patrón realizada con cantidades conocidas (0-28 $\mu$ g) de inmunoglobulina G.

### **Análisis de la masa mitocondrial**

Para ello, medimos la actividad de la citrato sintasa, una enzima de la matriz mitocondrial encargada de catalizar la primera reacción del ciclo de Krebs cuya cantidad permanece altamente constante en la mitocondria y es considerada un marcador de contenido en mitocondrias (168). Por ello permite normalizar su actividad a la cantidad relativa de mitocondrias, usándose como marcador de masa mitocondrial.

La actividad específica de la citrato sintasa en los extractos de tejidos homogeneizados será medida a 412nm utilizando 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) para detectar los grupos sulfidrilos libres del coenzima A. Para ello seguimos el método que ya ha sido descrito anteriormente por Garrabou (169).

Por duplicado y en el siguiente orden añadimos a la cubeta:

- |                      |             |              |
|----------------------|-------------|--------------|
| - Tris-HCl 0,75M pH8 | 100 $\mu$ L | 75mM.        |
| - DTNB 1mM           | 100 $\mu$ L | 100 $\mu$ M. |
| - Triton 1%          | 100 $\mu$ L | 0,1%.        |



La cantidad de colágeno en los homogenados de muestra se determinó por espectrofotometría utilizando un kit comercial Sircol Collagen Assay (Biocolor). Por este método de unión a colorante se pretende analizar el colágeno soluble en ácido y peptina. El ensayo evalúa la tasa de colágeno recién sintetizado que se produce durante los periodos de crecimiento y desarrollo rápido, pero también el producido por procesos de inflamación, cicatrización de heridas y desarrollo de tumores.

Para la determinación se siguen las instrucciones del fabricante, para finalmente medir a 595nm con un lector de microplacas para absorbancia iMark (Bio-Rad).

### **Peroxidación lipídica**

Lo que se pretende es analizar los niveles de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) en los tejidos usando un método basado en la reacción del mismo con los lipoperóxidos a 90–100°C.

Preparación del TBARS:

- 20mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- 5mL ácido Sulfúrico.
- 0,2gr ácido Tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich).

Se añade en un eppendorf el mismo volumen de muestra y de ácido ticloroacético (TCA) al 20%, entre 100-200µL.

Se centrifugan 5 minutos a 3000rpm a 15°C, recogándose el sobrenadante en otro eppendorf, para añadir un volumen aproximado al obtenido de TBARS al 0,67%.



La mezcla se hierve a 90°C durante 15 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Trasladamos las muestras a compartimentos para el espectrofotómetro de un tamaño acorde al tamaño de la muestra usando como blanco una mezcla de TCA+TBARS a partes iguales. Pondremos entonces a leer los datos a una longitud de onda de 532nm en el espectrofotómetro (DU 800UV/Vis Spectrophotometer).

Los resultados obtenidos se corresponden a equivalentes de malondialdehído (MDA) utilizando un coeficiente de extinción de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Aplicamos la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol MDA}}{g_{PF}} = \frac{(A_{535} - A_{600}) \times \text{mmol}}{1,56 \times 10^5 \text{ ml}} \times \frac{10^6 \text{ nmol}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,1 g_{PF}}$$

### **Análisis de proteínas mediante western blot**

Vamos a utilizar los siguientes anticuerpos primarios preparados a una concentración de 1:250 en una solución de TBS 1x (5% de BSA + 0,1% Tween20).

- GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), que nos a servir como control de carga (GAPDH (FL-335): sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, INC.).
- TFAM, (Factor A de transcripción mitocondrial) (TFAM Sygma Aldrich).
- OGG1/2 (8-oxoguanina DNA glicosilasa) (OGG1/2 (G-5):sc-376935, Santa Cruz Biotechnology, INC.).



<b>Gel condensador pH 6,8</b>			
	<b>Stock</b>	<b>Uso</b>	<b>5mL</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamina</b>	30%	4%	667 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>			3mL
<b>Tris-HCl pH 6,8</b>	1M	0.375M	1,25mL
<b>SDS 10%</b>	10%	0,10%	50 $\mu$ L
<b>Persulfato de amonio</b>	20%	0,10%	25 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	100%	0,10%	5 $\mu$ L

El análisis de las proteínas presentes en los homogenados de tejido se realizará mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a una intensidad de 35mA por gel en un sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y con tampón de carrera TGS al 1% (Tris/Glycine/SDS Buffer 10X, BioRad).

Finalizada la electroforesis de los geles se procede a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 $\mu$ m (Rio-Rad), ajustadas al tamaño del gel, protegida por dos papeles de filtro (Bio-Rad) y embebidas en un tampón de transferencia preparado con:

- 50mL de TG 10x (Tris/Glycine Buffer 10X, BioRad).
- 100mL MetOH.
- 350mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

Este especie de sándwich se coloca en un dispositivo para la electrotransferencia (Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transfer Cell con fuente de alimentación Bio-Rad Power Pac 1000) a 25V y durante 30 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas son lavadas dos veces durante 5 minutos con TTBS 1x (Tris 20mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) y se bloquean posteriormente con TTBS 1x + Leche al 0,5% (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para los lavados y el bloqueo nos servimos de un agitador PMR-30 (Mini Rocker-Shaker, Grant-bio).

C. Inmunodetección con anticuerpos y revelado con líquido de electroquimioluminiscencia (ECL):

Las membranas ya bloqueadas se incubarán con los anticuerpos primarios *overnight* y en agitación a 4°C. Tras este periodo se lavarán 2 veces durante 5 minutos con TTBS 1x.

A continuación, las membranas se incubarán nuevamente durante una hora en agitación y a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario, marcado con peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. El anticuerpo secundario se prepara a concentración 1:20000 en TTBS 1x + Leche al 0,5% (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad).

Tras tres nuevos lavados con TTBS 1x, la detección de la proteína se realizará por quimioluminiscencia incubando durante 5 minutos con los sustratos para quimioluminiscencia WesternSure® Premium (Li-Cor) y la lectura se realizará con asistencia del escáner personal para quimioluminiscencia C-Digit (Li-Cor) y se cuantificarán las bandas obtenidas

con el software Image Studio Ver 5.2  
([https://www.licor.com/bio/products/software/image\\_studio\\_lite/](https://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite/)).

#### **4.4 EVALUACIÓN DEL AGRANDAMIENTO GINGIVAL EN PACIENTES**

Como complemento a los datos *in vivo* aportados por el ensayo en ratas, hemos realizado análisis de biopsias de dos pacientes a los que se les diagnosticó fibromatosis gingival hereditaria, además de una serie de determinaciones bioquímicas *in vitro* en las células de estos pacientes pertenecientes a la misma familia: padre e hija.

Ambos pacientes acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla, presentaban salud sistémica y un agrandamiento gingival idiopático, se les diagnosticó fibromatosis gingival hereditaria. Tras la aprobación por parte del Comité de Ética del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Sevilla y su correspondiente consentimiento informado, tanto a los dos pacientes como a un voluntario sano que actuó como control, se les tomaron muestras de sangre y tejido gingival.

##### **Toma de muestras de sangre y obtención de células mononucleares periféricas (PBMC)**

De manera ambulatoria se produjo a la extracción de muestras de sangre de los dos pacientes y un paciente sano que actuó como control mediante una punción venosa con Vacutainer. Se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA, y se extrajeron unos 16 mL de sangre por paciente.

Para la obtención de PBMCs se utilizó un protocolo basado en la utilización del polisacárido hidrofílico Ficoll-Paque<sup>TH</sup>PLUS. Se usaron entre 2,5 y 3 mL de esta sangre heparinizada y se mezcló con 1,5mL de una solución salina equilibrada (BSS, Balanced Salt Solution), esta solución salina con contenido en glucosa permite mantener la viabilidad de las células sanguíneas. Para cada 2mL de sangre con BSS se utilizaron 1,5mL de Ficoll-Paque<sup>TH</sup>PLUS.

El primer paso consistió en introducir el Ficoll-Paque<sup>TH</sup>PLUS dentro de un falcon de 15 o 50mL, en función del volumen. A continuación, la sangre se introduce lentamente con una pipeta Pasteur, evitando la mezcla con la capa de Ficoll-Paque<sup>TH</sup>PLUS. Seguidamente se centrifuga a 900 g con una centrífuga basculante durante 40 minutos.

Tras el centrifugado se observa que se han separado los distintos componentes de la sangre dejando una fase superior amarilla de plasma, una fase intermedia con los monocitos y linfocitos (PBMCs) justo encima del Ficoll, y un precipitado de plaquetas, eritrocitos y otros fragmentos celulares en la fase más inferior. Recogemos esa fase intermedia con una pipeta Pasteur y se trasladan estas PBMCs a un nuevo falcon. Ahora por cada mililitro de células recogidas, se añaden 3mL de tampón BSS, se invierte el falcon y se centrifuga de nuevo a 900g durante 10 minutos para terminar de limpiar las PBMCs.

### **Toma de biopsias y procesado**

La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia local: articaína con epinefrina. Obteniéndose con una hoja del número 15 y mango de bisturí una

biopsia de unos 10x5x5mm aproximadamente de la región posterior del maxilar, a nivel de la tuberosidad. La biopsia obtenida se dividió en tres partes:

- Una porción de 1x1x1mm que se fijó en una solución de formaldehído al 1,5% en tampón de cacodilato al 1%, pH7,4 durante 2 horas para su procesamiento para microscopía electrónica tal como se explica en el apartado 5.2.
- Una segunda porción de 5x5x2mm aproximadamente, que se reservó se utilizó para realizar homogenados de tejido, tal como se explica en el apartado 5.3.
- El resto fue fijada en formaldehído al 4% durante 12 horas para su posterior procesamiento para corte y tinción con H&E, tal como se explica en el apartado 5.2 (excepto por la descalcificación, que en este caso no es necesaria).

\* El caso del paciente que actuó como control, se obtuvo otra porción de 5x5x2mm aproximadamente, que se reservó en suero fisiológico.

### **Cultivo de fibroblastos gingivales sanos**

Se tomó la pieza de la biopsia reservada en suero fisiológico estéril y se talló en trozos más pequeños en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo sobre una placa de Petri. Se colocó el tejido conectivo hacia la placa y se dejó secar unos 10 minutos para lograr la adhesión de las piezas.

Transcurrido este tiempo se echó medio de cultivo. Estos fibroblastos se cultivaron con medio de cultivo DMEM (4,5mg/L de glucosa, L-glutamina, piruvato – Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco, Invitrogen) y 0,5% de antibiótico (Sigma Chemical Co.). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se dejaron crecer.

La recolección de los fibroblastos para los distintos ensayos se realizó recogiendo con tripsina (0,25% Trypsin-EDT Solution, Sigma), centrifugándose a 2000rpm durante 5 minutos a 4°C y resuspendiéndose en tampón de lisis (0,9% NaCl, 20mM TrisHCL pH 7,6, 0,1% Tritón x-100).

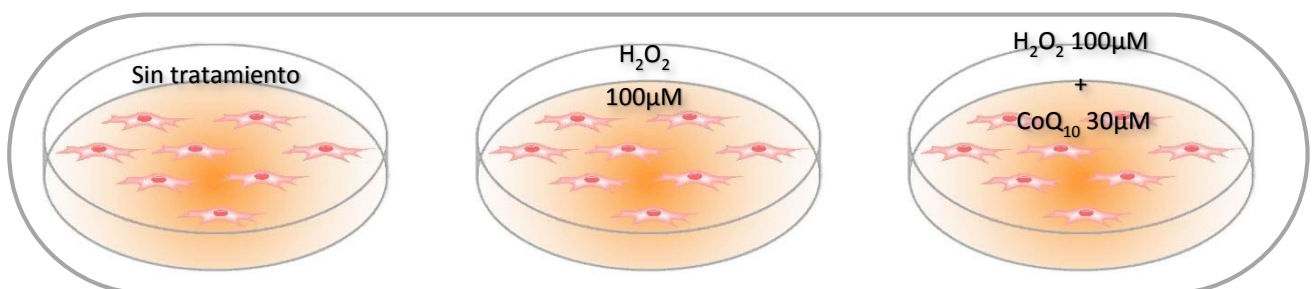
### **Evaluación de los lípidos peróxidos**

Se evaluó en los PBMCs usando la misma técnica descrita en el apartado 5.3.

### **Evaluación de la síntesis de colágeno**

Se determinó la síntesis de colágeno en los homogenados de tejido gingival.

Se quiso evaluar la influencia del estrés oxidativo sobre los fibroblastos en cuanto a la síntesis de colágeno, diseñándose un ensayo en el que los fibroblastos sanos permanecieron 48h en las siguientes condiciones:





El colágeno se evaluó de la misma manera que se describe en el apartado 5.3, tanto en los homogenados de tejidos como en los homogenados de fibroblastos tratados.

### **Determinación de los niveles de CoQ<sub>10</sub> en los PBMC**

El estudio de los niveles de CoQ se realizó en dos pasos:

#### 1) Extracción del CoQ de las membranas biológicas.

Sin romper la cadena de frío (4°C) se toman 100µL del homogenado de la muestra y se resuspende en 500µL de PBS. Esto se pasa a un tubo de vidrio de 15mL con tapón de rosca (Pirex) y se le añade Q<sub>9</sub> como estándar interno de la extracción. La concentración del estándar se determinó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 275nm ( $\epsilon_{\text{CoQ9}}=14,7\text{mM}^{-1}$ ).

La solución celular con el estándar interno se mantuvo en hielo 5 minutos para después añadir 500µL de SDS al 2% y agitar con un vortex durante un minuto a máxima potencia.

A continuación se añaden 2mL de una mezcla etanol:isopropanol 95:5 y se vuelve a vortex durante un minuto.

Seguidamente, añadimos a la mezcla 5mL de hexano, se agita con el vortex y se centrifuga a 1000g durante 5 minutos a 4°C para separar la fase orgánica (compuesta por los lípidos) de la fase soluble.

Tras esta centrifugación, la fase orgánica se transfiere a una ampolla de rotavapor de 25mL, volviendo a repetirse la extracción con

hexano dos veces más. El hexano de las ampollas se seca en un rotavapor (R-3000, B·U·CHI), en condiciones de vacío, a 35°C y con una potencia de rotor del 50%. El residuo seco se reconstituye en 333µL de etanol (calidad HPLC) y se pasa a un Eppendorf limpio, repitiendo el lavado dos veces más. El etanol se evapora por vacío (SPD121P, Savant) durante 2-3 horas a 50°C, guardando finalmente el residuo seco a -20°C para ser reconstituido en el volumen adecuado de etanol (calidad HPLC) antes de la medida cromatográfica.

2) Determinación de los niveles de CoQ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El proceso de separación de los componentes lipídicos de las muestras se lleva a cabo en un HPLC Beckmann 166-126, equipado con una columna sílica de fase reversa 15-cm Kromasil C-18, con horno a 40 °C, flujo de 1mL/min en una fase móvil compuesta de metanol:isopropanol (60:40) y 1,42 mM de perclorato de litio.

Los niveles de CoQ se analizan por detectores ultravioleta (System Gold 168; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y electroquímico (Coulochem III ESA).

Los datos obtenidos fueron referidos a mg de proteínas.

## **4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizará un estudio estadístico descriptivo de las variables analizadas en los tres grupos (porcentaje, media, desviación estándar). Se comprobarán las diferencias entre grupos comprobando la normalidad con el test de Kolmogorov. Posteriormente se usará el test de ANOVA con el test post hoc de Bonferroni para ver las diferencias entre grupos. El nivel de significación que se utilizará será  $p < 0,05$ . Todos los datos se tabularán y serán procesados con el paquete estadístico SPSS.



# Resultados

---



## **5. RESULTADOS**

### **5.1 ANÁLISIS DEL GRADO DE AGRANDAMIENTO GINGIVAL MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA**

Los cortes histológicos teñidos con H&E (Figura 7) muestran de forma total o parcial al primer molar mandibular de la rata rodeado por todo el complejo periodontal dentro del maxilar inferior. Se puede apreciar la pulpa dental y el tejido óseo. A nivel gingival vemos como las crestas epiteliales disminuyen en el grupo N.

Las mediciones en estos cortes fueron realizadas por duplicado, por el mismo operador y en días distintos, obteniéndose las medias y desviaciones estándar. Se valoró tanto la anchura como la altura del tejido.

El análisis de las mediciones nos muestra que en el grupo CsA se ha producido un aumento significativo del tejido en altura, no siendo así para el grupo N, cuyos valores son equiparables a los del grupo CTL. En el caso de la anchura, no existen diferencias significativas de los grupos de tratamiento respecto a los CTL (Figura 8).

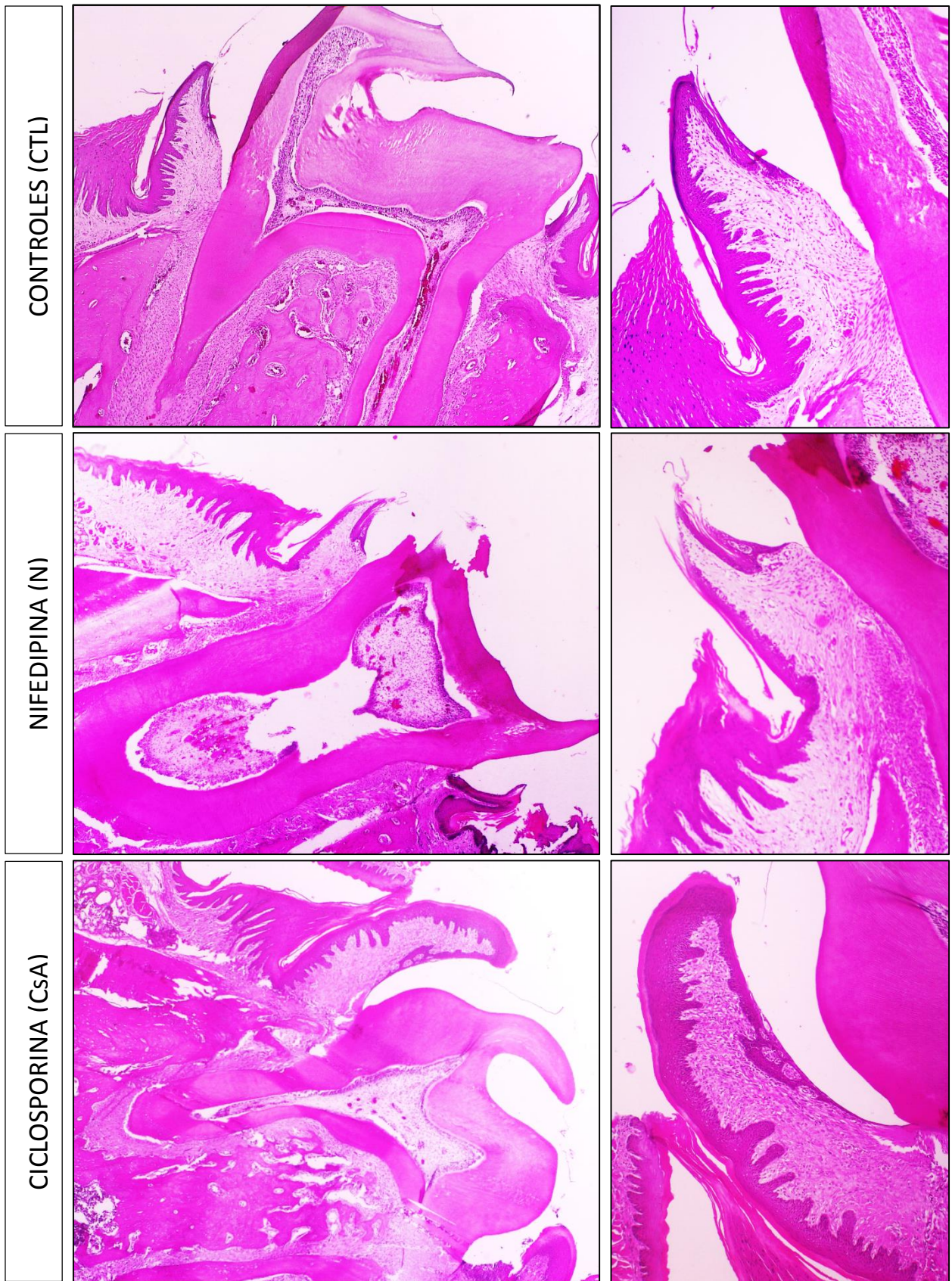


Figura 7. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de los tres grupos de tratamiento. A la izquierda se observa el primer molar rodeado por su periodonto a 4x, y a la derecha vemos en detalle la encía vestibular a 10x.



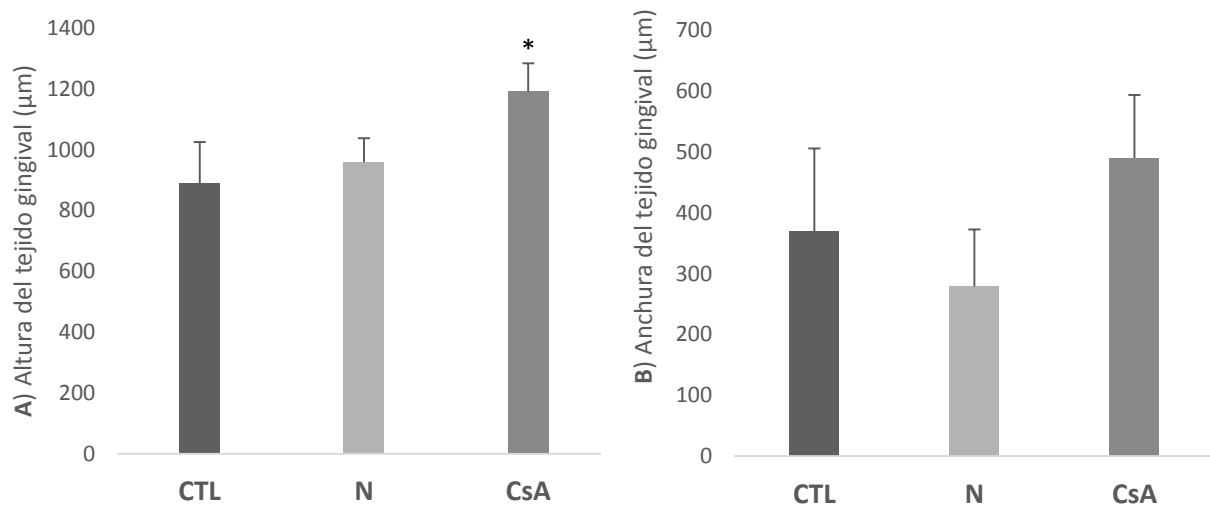


Figura 8. Evaluación morfológica del tejido gingival vestibular en altura (A, a la izquierda) y en anchura (B, a la derecha).  
\* =  $p < 0.05$ .

## 5.2 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS MITOCONDRIAS

Al igual que en el caso anterior, en el grupo que se observan más cambios es en el CsA, cuyas mitocondrias a nivel del tejido gingival presentan mayor área y perímetro respecto al grupo CTL y N, las mitocondrias son significativamente mayores. En el caso del tejido cardíaco no se observan diferencias entre grupos (Figura 9).

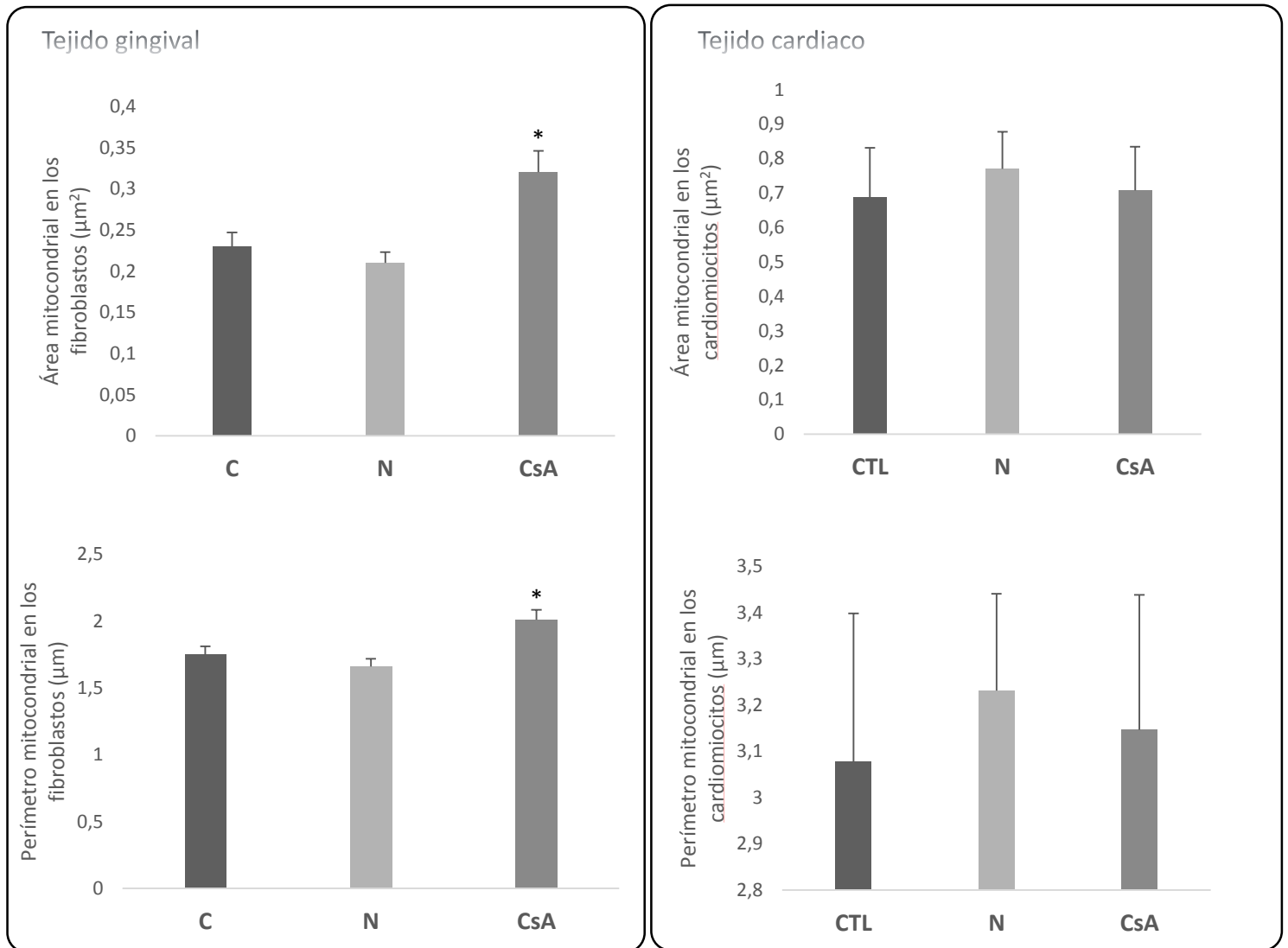


Figura 9. Evaluación morfométrica del área y perímetro mitocondrial tanto de los fibroblastos como de los cardiomiocitos. \* =  $p < 0.05$ .

Evaluando las imágenes de la microscopía electrónica se puede observar que el tratamiento con los fármacos provocó desestructuración interna de las mitocondrias, en mayor o menor grado, para todos los casos, siendo más marcada en las mitocondrias de los fibroblastos de las ratas tratadas con CsA (Figura 10).

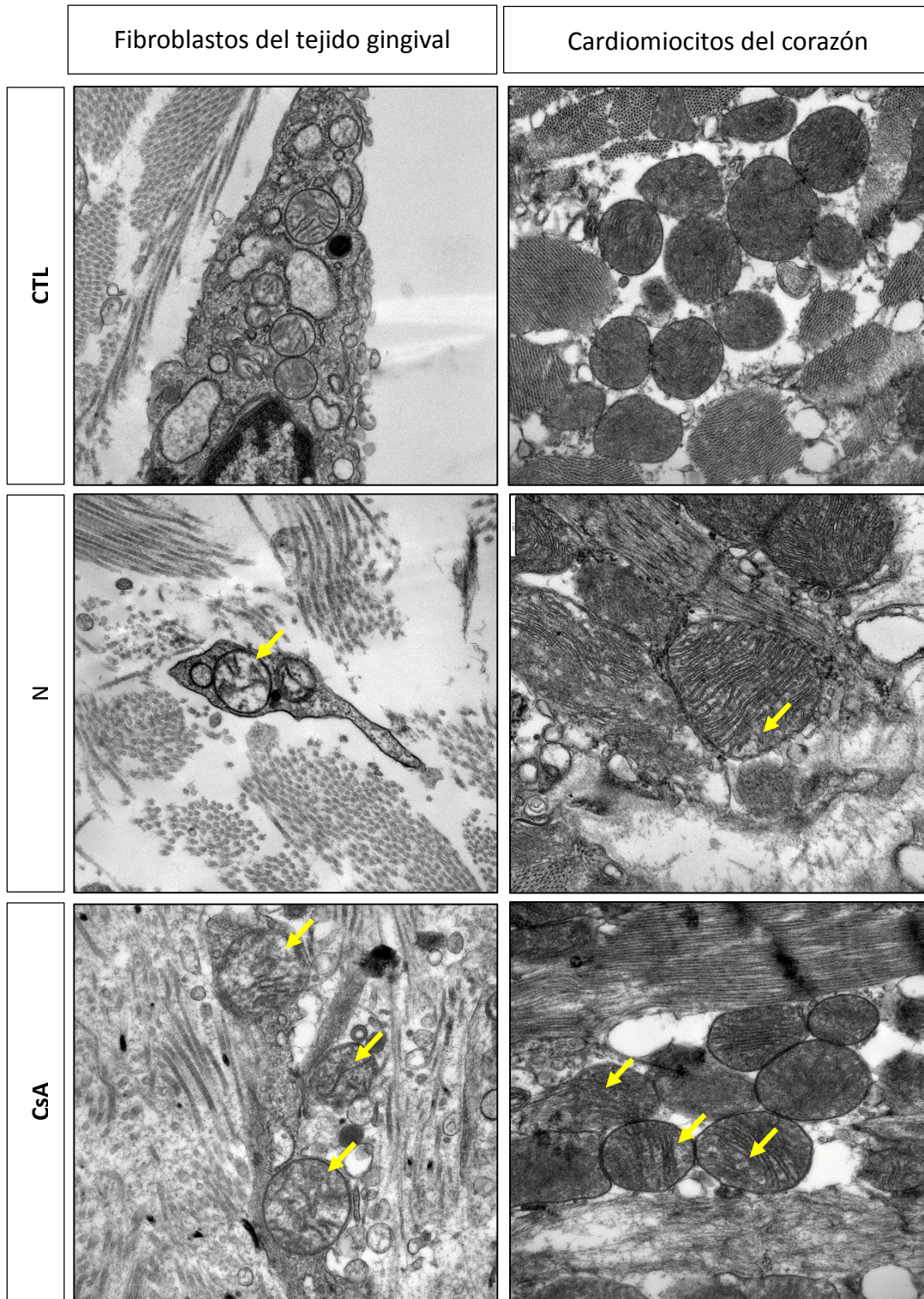
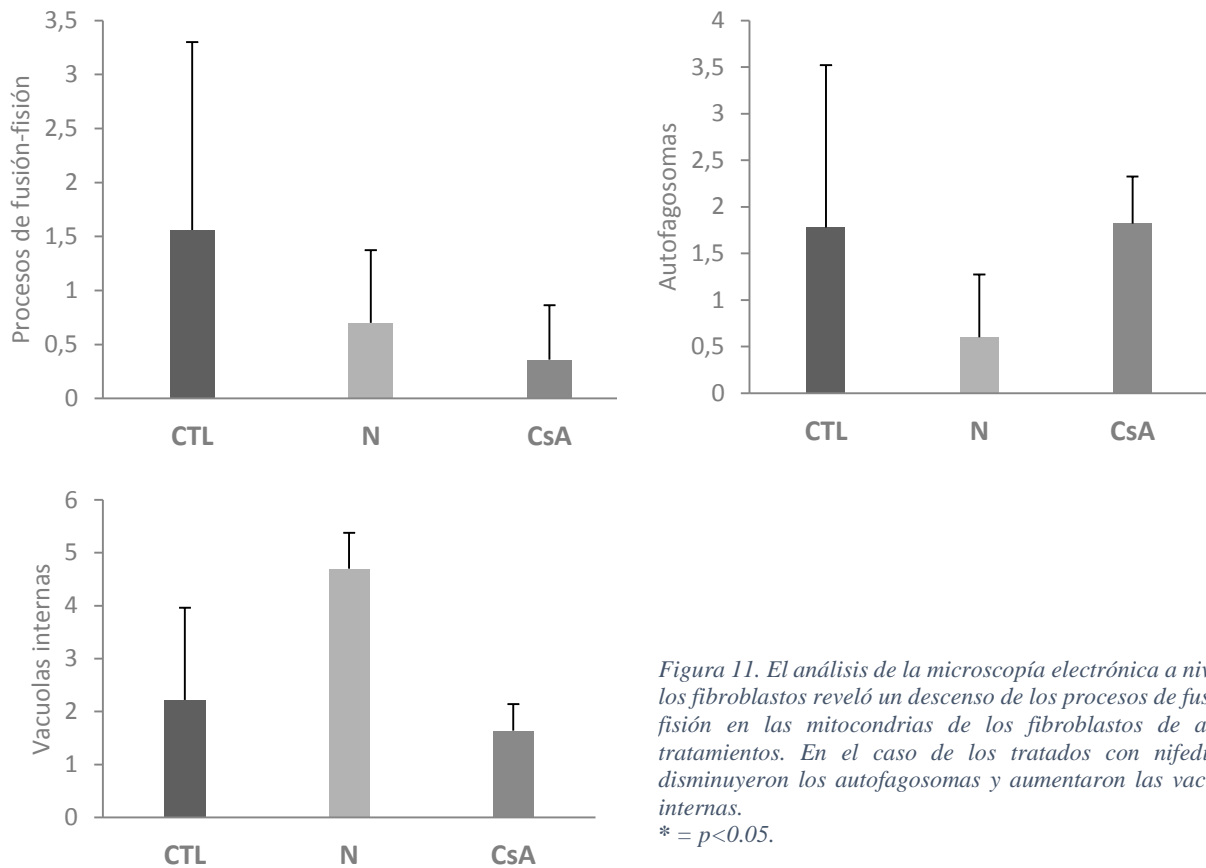


Figura 10. Imágenes de los fibroblastos a la izquierda y de los cardiomiocitos a la derecha de los distintos grupos de tratamiento. Las flechas indican desestructuración interna de la mitocondria.

En el caso de las mitocondrias de los fibroblastos del tejido gingival se pudieron analizar también los procesos de fusión-fisión, la cantidad de autofagosomas y la presencia de vacuolas internas (Figura 11).



Se observa un descenso de la dinámica mitocondrial de los fibroblastos tratados con ambos fármacos, mayor en el caso del tratamiento con CsA. Además, en el grupo tratado con N se produjo un descenso en el número de autofagosomas mitocondriales, con incremento en la acumulación de vacuolas internas a nivel celular.

### 5.3 DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DE MASA MITOCONDRIAL MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LA CITRATO SINTASA

La actividad de esta enzima se relaciona directamente con la masa mitocondrial. Se observó que su actividad se mantuvo estable en el tejido gingival, en cambio aparece disminuida en ambos grupos de tratamiento en el tejido cardíaco (Figura 12).

La disminución en la actividad de esta enzima indica que hay una disminución en el número de mitocondrias en los cardiomiocitos de las ratas tratadas respecto a las CTL.

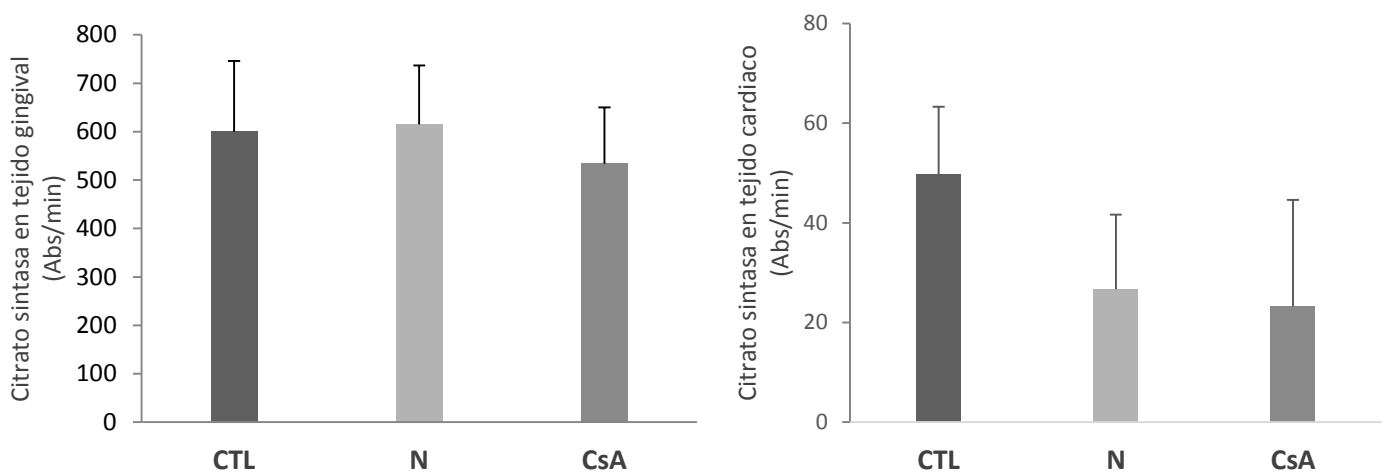


Figura 12. Actividad de la citrato sintasa en tejido gingival (a la izquierda) y en tejido cardíaco (a la derecha). \* =  $p < 0.05$ .

### 5.4 NIVELES DE ATP

Los niveles de ATP se mantuvieron en valores similares para todos los grupos (Figura 13). No parece verse afectada la producción energética por los tratamientos.

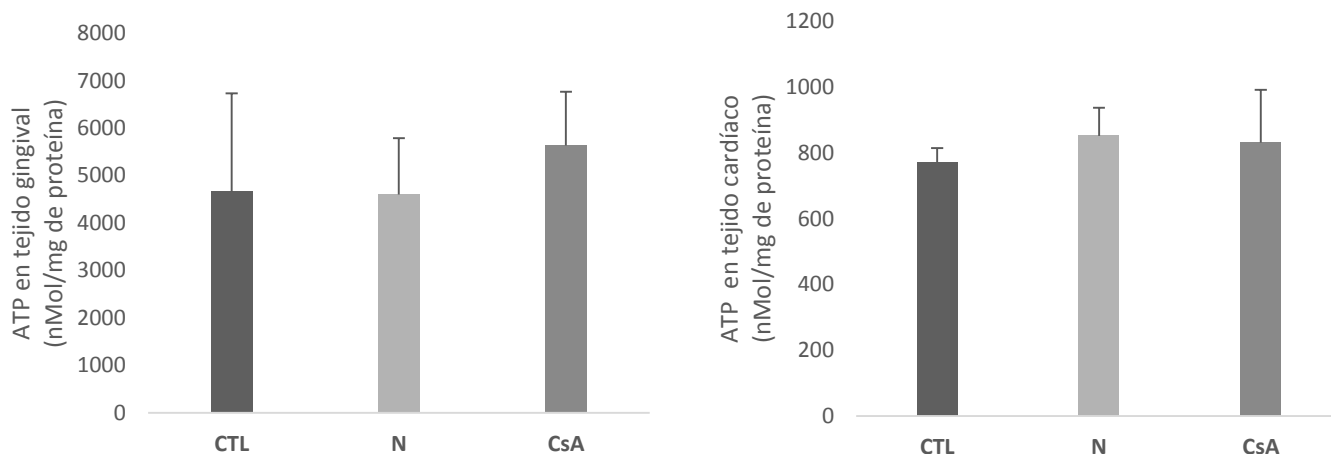


Figura 13. Niveles de ATP en tejido gingival (a la izquierda) y en tejido cardíaco (a la derecha). \* =  $p < 0.05$ .

## 5.5 PRODUCCIÓN DE NUEVO COLÁGENO

Al evaluar la cantidad de colágeno nuevo que se estaba produciendo se observó que esta no se veía afectada por los tratamientos, manteniéndose en niveles equiparables (Figura 14).

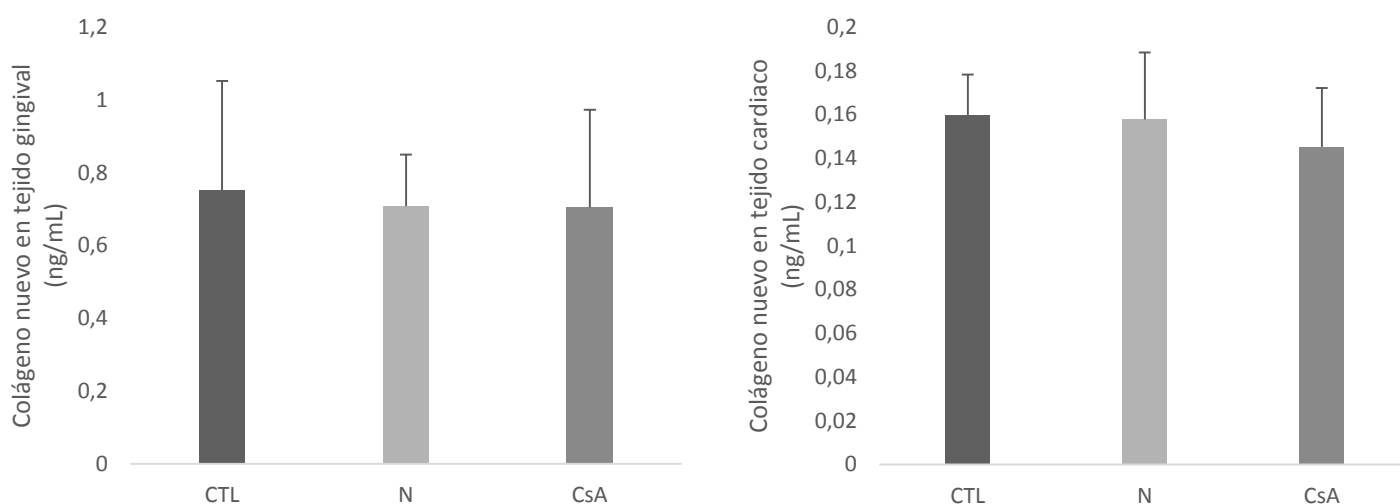


Figura 14. Evaluación de la síntesis de colágeno en tejido gingival (a la izquierda) y en tejido cardíaco (a la derecha). \* =  $p < 0.05$ .

## 5.6 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se observaron mayores niveles de lípidos peróxidos en ambos grupos de tratamiento respecto a los controles tanto a nivel gingival como a nivel del miocardio, siendo esta diferencia significativa para CsA en el miocardio (Figura 15).

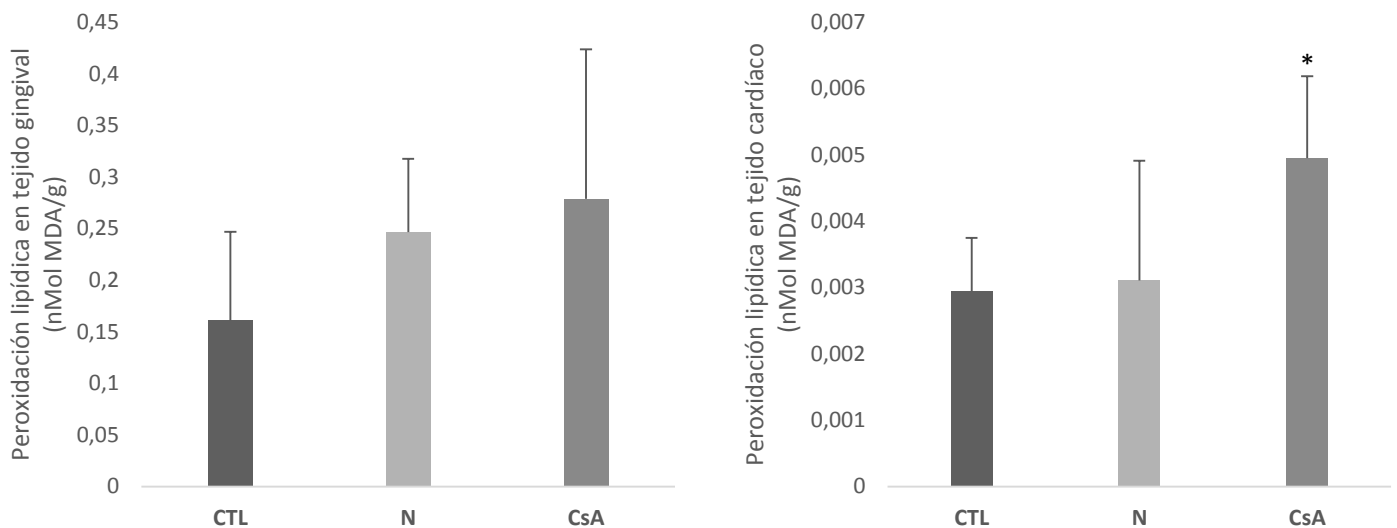
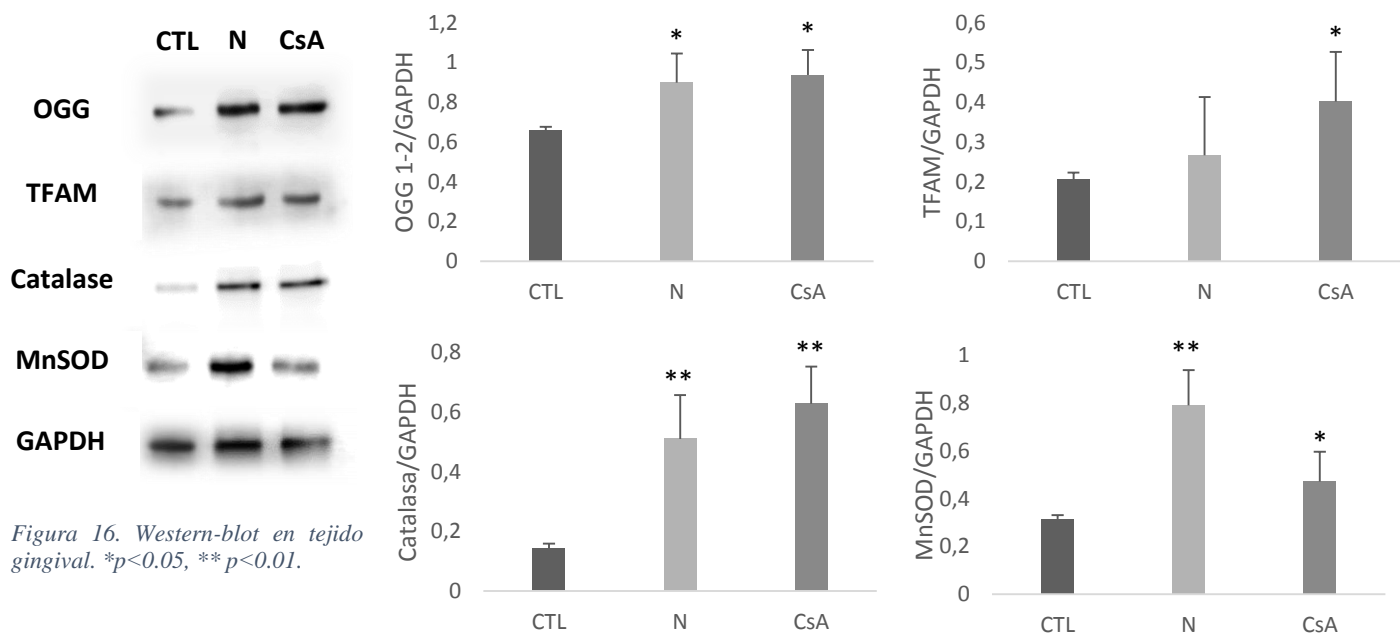


Figura 15. Niveles de lípidos peróxidos en tejido gingival (a la izquierda) y en tejido cardíaco (a la derecha). \* =  $p < 0.05$ .

## 5.7 WESTERN-BLOT EN TEJIDO GINGIVAL

Los análisis mediante western-blot indican que está aumentado el daño oxidativo en ambos grupos de tratamiento (OGG). Sucede lo mismo con la biogénesis mitocondrial (TFAM), que se encuentra aumentada en ambos grupos respecto a los CTL, ligeramente en el caso de N y de forma significativa para CsA respecto a los CTL (Figura 16).

En relación con los antioxidantes, encontramos que la catalasa se encuentra aumentada en ambos grupos de tratamiento, mientras que la MnSOD, se encuentra aumentada de forma significativa en el grupo N respecto a ambos grupos, y de manera no tan marcada en el grupo CsA (Figura 16).



## 5.8 WESTERN-BLOT EN TEJIDO CARDÍACO

Respecto a OGG, se encuentra significativamente disminuída en el grupo CsA. La biogénesis mitocondrial, marcada por TFAM, se mantiene en valores estables, existiendo diferencias entre N y CsA pero no de ambas respecto a los CTL. La alteración más marcada se produce a nivel de los antioxidantes, con un comportamiento diferente en el grupo N y en el CsA. Se produce un descenso significativo de MnSOD y catalasa en el grupo CsA, mientras que para el grupo N la MnSOD se mantiene en niveles equiparables a los CTL, y la catalasa ligeramente inferiores (Figura 17).

Analizando las proteínas de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo vemos que existe un comportamiento diferente según los tejidos y según los fármacos.



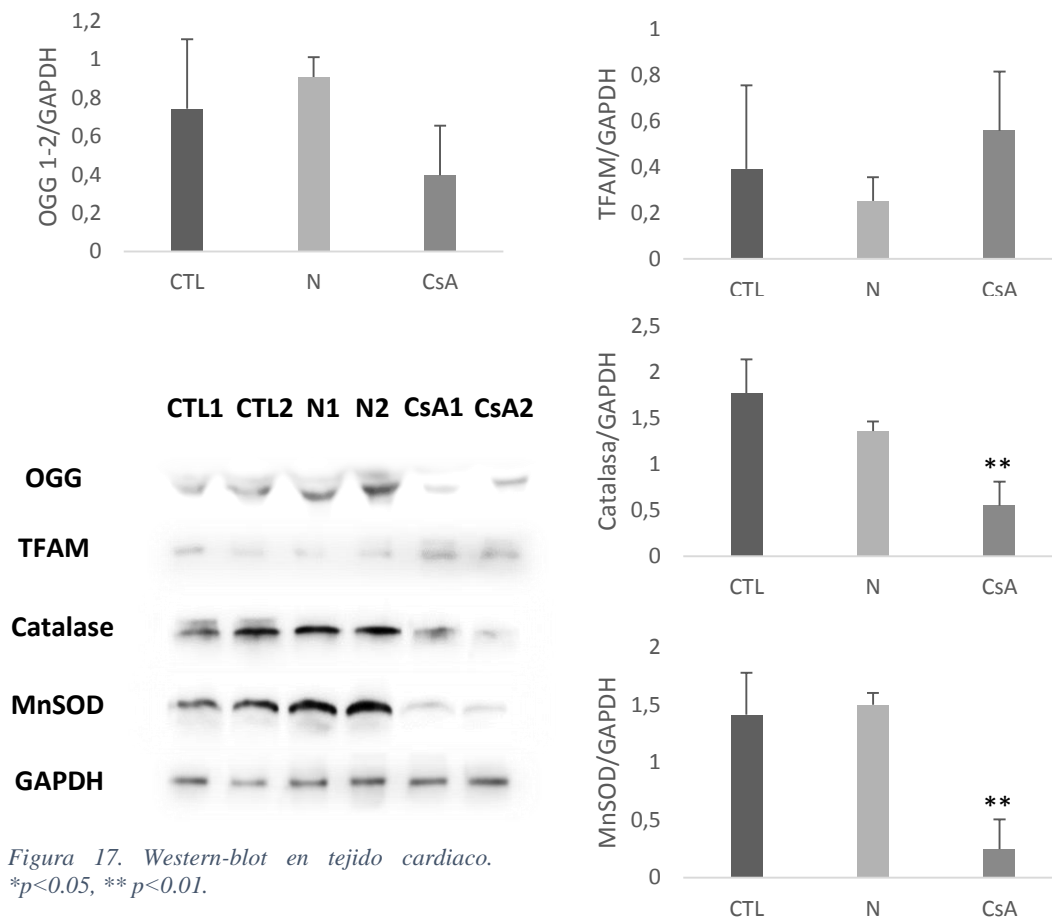


Figura 17. Western-blot en tejido cardiaco. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 5.9 PACIENTES CON FIBROMATOSIS GINGIVAL HEREDITARIA

Una vez realizados los análisis en nuestro modelo animal, quisimos valorar el comportamiento a nivel estructural y molecular de este agrandamiento gingival en un modelo de patología en humanos, como es el agrandamiento idiopático que se produce en la fibromatosis gingival hereditaria.

### Descripción del caso clínico

Un señor de 50 años de edad acude al área clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla aquejando la presencia de “una hinchazón de las encías en toda su boca” que le causaba dificultades en el habla y que comenzó 4 o 5 años atrás habiendo progresado lentamente. El paciente presentaba salud

sistémica y tras el correspondiente análisis clínico y radiológico no se le diagnosticó ninguna otra patología (Figura 18).

Le propusimos al paciente realizar un análisis intraoral a su familia. El paciente tenía dos hijas, una de las cuales, con 12 años de edad, presentaba características gingivales similares a las del padre pero menos acentuadas (Figura 19).

En ambos podía observarse un agrandamiento gingival que involucraba tanto a maxilar como a mandíbula, afectando a toda la encía alrededor de la dentición permanente y temporal. En el paladar del padre se puede observar que el tejido crecido forma un túnel que dificultaba el habla y la higiene. En las ortopantomografías no se observan lesiones óseas en las ortopantomografías.

Observando la presencia de este agrandamiento gingival idiopático, no asociado al consumo de fármacos o a síndromes, la presencia de salud sistémica y el patrón hereditario del agrandamiento, fueron diagnosticados de fibromatosis gingival hereditaria.



El tratamiento consistió en la instauración de unas rigurosas medidas de higiene oral y revisiones periódicas. Para el padre, que era quien presentaba el agrandamiento más severo e incapacitante, la gingivectomía a bisel externo fue la técnica quirúrgica de elección realizada en dos pasos y asociada a una rigurosa técnica de higiene oral. Se realizaron incisiones en el paladar para eliminar el tejido gingival sobrante en ambos cuadrantes del maxilar. El tejido total extirpado consistió en cuatro fragmentos de 100g, de superficie brillante y blanquecina, con consistencia densa y homogénea (Figura 20).



*Figura 19. Fotos intraorales y ortopantomografía de la hija. Paciente en fase de dentición mixta. Se aprecia también la mordida abierta anterior derecha. Existe un retraso en el recambio dentario y falta de erupción pasiva. Grosor de tejido queratinizado aumentado alrededor de los dientes permanentes erupcionados.*

Durante el postoperatorio y cicatrización no se produjo ningún tipo de complicación o incidencia (Figura 21). Los pacientes continuaron con sus revisiones periódicas.

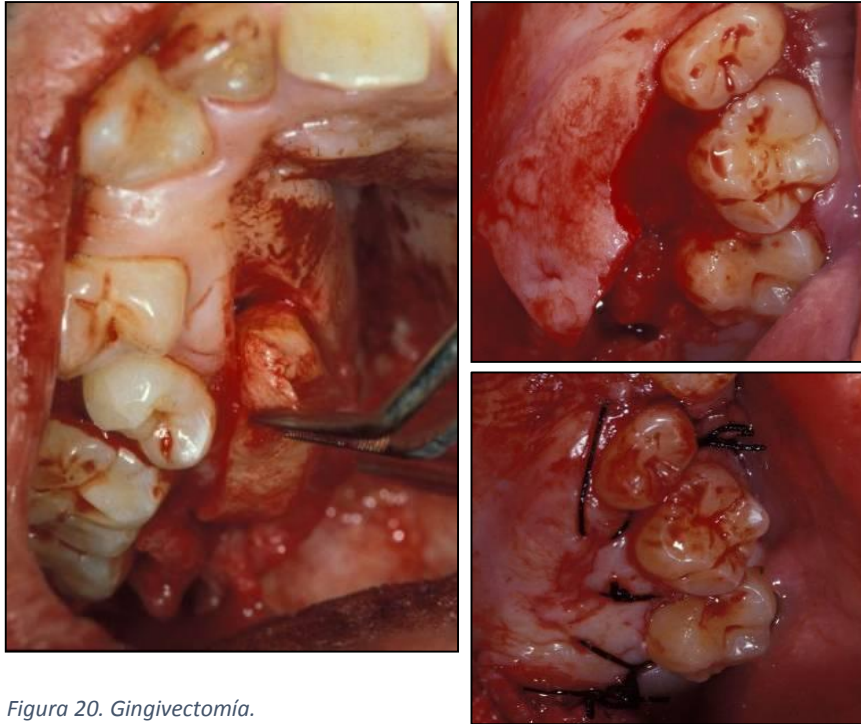


Figura 20. Gingivectomía.

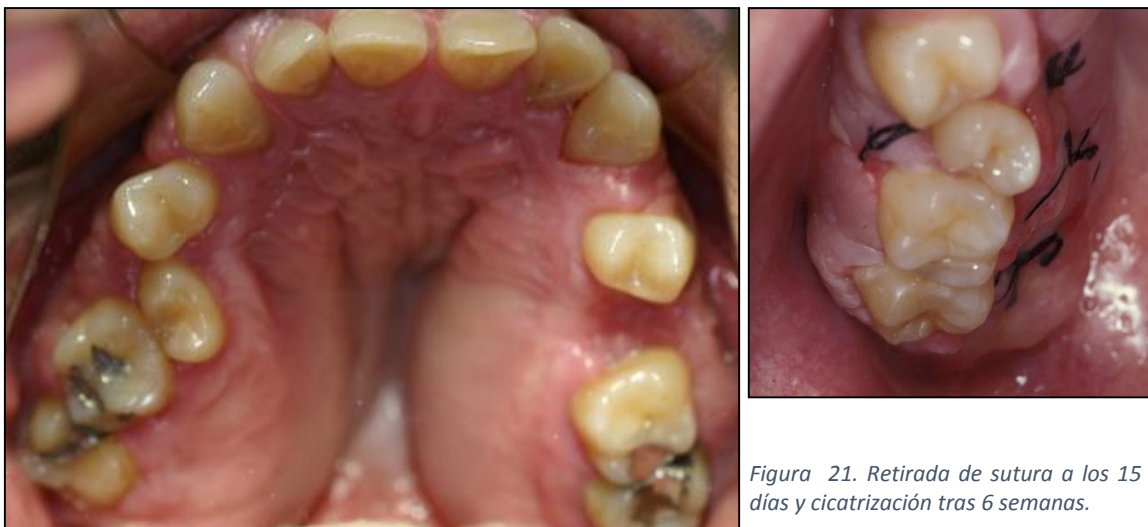


Figura 21. Retirada de sutura a los 15 días y cicatrización tras 6 semanas.

### Hallazgos histopatológicos en la H&E

Los cortes teñidos con H&E muestran la presencia de infiltrado inflamatorio, e imágenes de falta de continuidad de la lámina basal, migración celular desde el epitelio y células de aspecto mesenquimatoso en el interior del tejido conectivo (Figuras 22 y 23). Estas imágenes son compatibles con la teoría de “*Epithelial to Mesenchymal Transition*”.

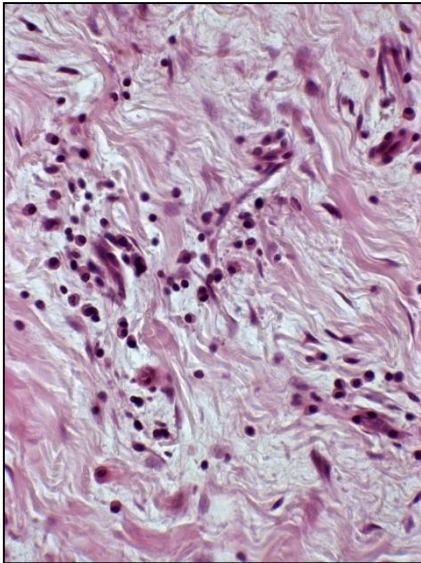


Figura 22. Hematoxilina y eosina en el padre. Se puede observar el infiltrado inflamatorio.

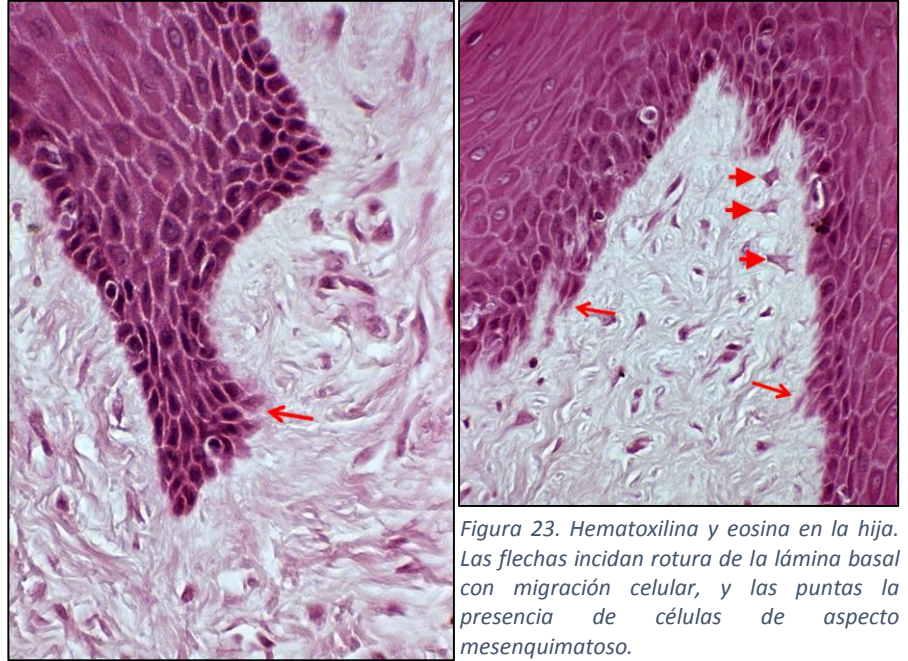


Figura 23. Hematoxilina y eosina en la hija. Las flechas indican rotura de la lámina basal con migración celular, y las puntas la presencia de células de aspecto mesenquimatoso.

A nivel ultraestructural del tejido, se observan imágenes compatibles con autofagosomas y acumulación de vesículas en la célula (Figura 24).

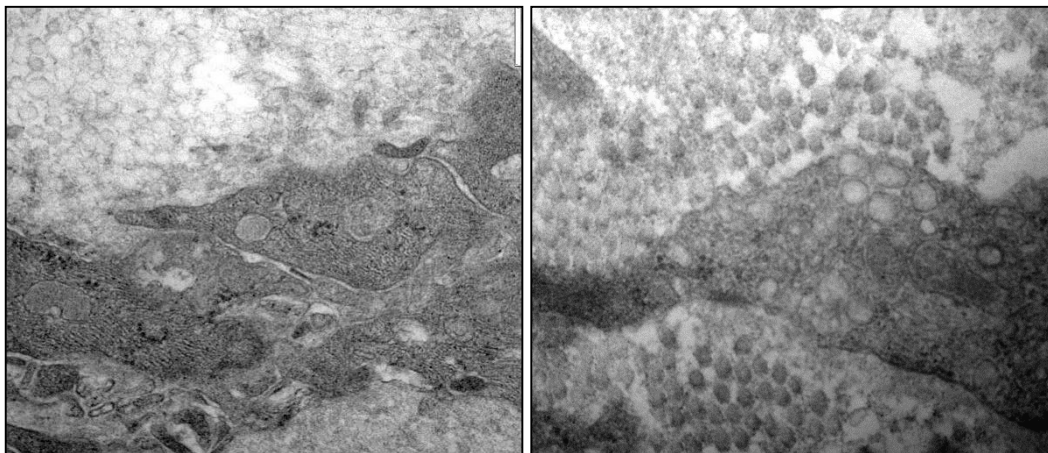


Figura 24. Microscopía electrónica de las biopsias gingivales, a la izquierda el padre, y a la derecha la hija.

### **Análisis de los PBMC**

En el caso del paciente que manifestaba los signos clínicos más severos (el padre) se observó una mayor presencia de peroxidación lipídica y una disminución de los niveles de CoQ<sub>10</sub>, un importante antioxidante y transportador de electrones mitocondrial (Figura 25). Lo que es indicativo de presencia de estrés oxidativo.

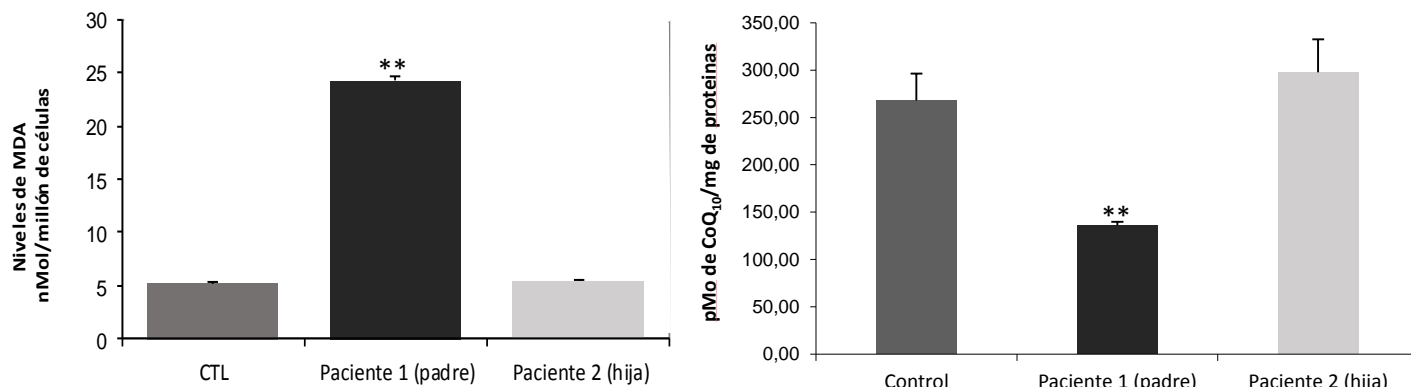


Figura 25. Evaluación del estrés oxidativo en células mononucleares periféricas, a la izquierda vemos los niveles de lípidos peróxidos (MDA), y a la derecha los niveles de coenzima Q (CoQ<sub>10</sub>). \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p > 0.001$ .

### Evaluación de la síntesis de colágeno

Se observó que la presencia de nuevo colágeno en el tejido gingival de los pacientes era significativamente mayor que en los controles. Y la cantidad se relacionaba directamente con el grado de agrandamiento clínico (Figura 26).

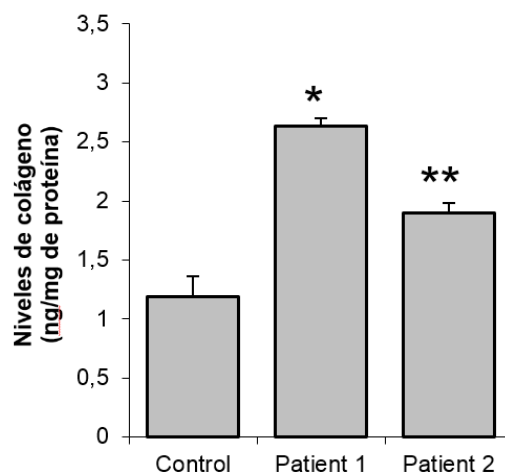


Figura 26. Evaluación de la síntesis de colágeno. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p > 0.001$ .

### Influencia de las ROS en la síntesis de colágeno

Para comprobar la relación entre el incremento de estrés oxidativo y la síntesis de colágeno, realizamos un modelo experimental *in vitro*. Para ello, sometimos a estrés oxidativo a fibroblastos sanos, así como a un potente antioxidante. La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, precursor de la peroxidación lipídica, indujo la síntesis de colágeno en los fibroblastos gingivales del donante sano, restaurándose a los valores normales cuando se administraba junto a CoQ<sub>10</sub> (Figura 27).

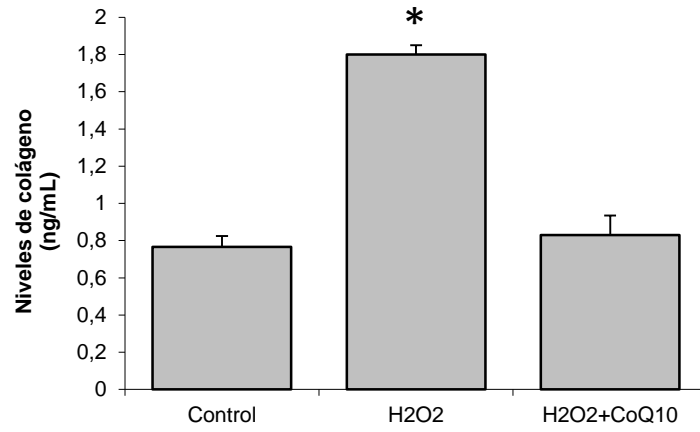


Figura 27. Ensayo sobre la influencia del estrés oxidativo ( $H_2O_2$ ) sobre la síntesis de colágeno. \* =  $p < 0.001$ .



# Discusión

---



## 6. DISCUSIÓN

Con la investigación desarrollada en la presente tesis doctoral hemos tratado de aclarar el papel que desempeña la mitocondria y el estrés oxidativo dentro del agrandamiento gingival. La mitocondria es una organela que ha sido recientemente redescubierta y a la que cada vez se le asocian más funciones tanto fisiológicas como patológicas (170). Por otro lado, el agrandamiento gingival es una entidad clínicamente bien definida de la que cada vez tenemos más conocimiento, se van aclarando ciertas vías moleculares del proceso, pero seguimos sin tener una idea totalmente clara de lo que está sucediendo (42).

Para aportar nuestro grano de arena al estudio de esta entidad patológica hemos utilizado un modelo animal sano al que le hemos inducido la patología. Observamos en primer lugar el grado de agrandamiento conseguido, para posteriormente evaluar las mitocondrias a nivel ultraestructural y realizar una serie de determinaciones bioquímicas comparando los resultados con los de otro tejido importante en nuestro organismo como es el corazón, del que no tenemos una visión clínica tan directa como en el caso de la encía. Finalmente utilizamos un modelo de agrandamiento gingival en humanos para compararlo con los resultados obtenidos en las ratas.

El uso de ratas como modelo animal en el estudio de la patogenia de la enfermedad periodontal está ampliamente extendido (171). Este modelo resulta particularmente útil debido a su fácil disponibilidad y manejo, a una anatomía periodontal que a nivel de los molares se asemeja mucho al humano, y a que el agrandamiento ocurre con una incidencia de prácticamente el 100% sin necesidad de ningún factor local irritante (172). En menores ocasiones se han utilizado perros

beagles, pero la respuesta a los fármacos no parece ser constante en los diferentes ensayos (173, 174).

Este modelo animal sobre rata wistar de agrandamiento gingival inducido por CsA y N ya ha sido utilizado previamente por Bullón et al (67), quienes encontraron variaciones en la anchura del tejido gingival a nivel de la encía adherida, siendo más acentuada para CsA. Nosotros hemos evaluado la altura y anchura a nivel de la encía libre, ya que parece ser la porción que se ve inicialmente afectada por el agrandamiento. Ayanoglou & Lesty (175), usando las mismas dosis de CsA en ratas y una técnica histomorfométrica similar, observaron que a partir de la cuarta semana de administración del fármaco ya se producía un agrandamiento moderado. También con N se ha evaluado histomorfométricamente el tejido con la misma técnica pero usando unas dosis más elevadas a las nuestras y apareciendo aumentos estadísticamente significativos respecto a los controles (176). En nuestro caso, sí vemos un claro agrandamiento con la administración de CsA, no siendo así para el grupo N. Fernandes et al (35), utilizando también una técnica histomorfométrica parecida, sí encontró un agrandamiento significativo en los grupos a los que había administrado N respecto al grupo CTL, pero en este caso les incorporó un factor local irritante como es la colocación de una ligadura de algodón alrededor del molar. Los ensayos parecen estar de acuerdo en que uno de los factores más asociado a la aparición del agrandamiento es la presencia de placa bacteriana (177), de ahí que este autor a diferencia de nosotros sí que haya encontrado un aumento significativo en el tamaño del tejido gingival para el tratamiento con N. Por otro lado, Bencivenni et al (178) usando unas dosis de N inferiores a las nuestras e inyectadas directamente sobre la encía en un periodo experimental de tres semanas, tampoco encontraron cambios morfométricos significativos respecto al grupo control.

Los datos histomorfométricos obtenidos en el presente ensayo se correlacionan con los datos de prevalencia descritos por la literatura, donde el agrandamiento inducido por CsA es el que se presenta de manera más severa y en un mayor porcentaje de pacientes (179).

En anteriores ocasiones se ha valorado el tejido gingival a nivel ultraestructural sin encontrar grandes diferencias respecto a los controles (180). En un ensayo previo en el que se compararon biopsias de tejido gingival de tres grupos de pacientes: sanos, con patología cardiovascular y con patología cardiovascular pero tratados con N, se observaron cambios a nivel de la morfología mitocondrial, concluyendo que el tratamiento con bloqueantes de los canales de calcio restauraba la morfología mitocondrial en el paciente con patología cardiovascular (165). En nuestro caso, hemos encontrado que a nivel cardíaco la morfología mitocondrial se ha preservado para los 3 grupos. En el caso de los fibroblastos del tejido gingival, en concordancia con el estudio de Bullon et al (165), las ratas tratadas con N presentan una morfología mitocondrial similar a los CTL o ligeramente inferior, en cambio en el grupo CsA las mitocondrias parecen aumentar de tamaño. No obstante, sí que observamos cierta desestructuración en la morfología interna mitocondrial para todos los grupos de tratamiento, más marcada para el grupo que recibió CsA. En un ensayo previo en el que se trató a ratas wistar con las mismas dosis de CsA, también se observó desestructuración de las crestas pero en este caso de las mitocondrias hepáticas (181), demostrando en cierto modo algún efecto sistémico en cuanto a mitocondrias.

Los datos morfológicos de microscopía electrónica se complementaron con los datos bioquímicos de actividad de la enzima citrato sintasa. Esta enzima de la matriz mitocondrial se relaciona directamente con la masa mitocondrial (168).

Sabiendo esto, parece que a pesar del mayor tamaño de las mitocondrias en los fibroblastos de las ratas tratadas con CsA, el número de mitocondrias está ligeramente disminuido sin llegar a ser significativo. Esto podría explicarse por un aumento en los procesos de fusión mitocondrial. En el caso de los cardiomiocitos, aunque la morfología parece mantenerse estable, disminuye el número de mitocondrias para ambos grupos de tratamiento respecto a los CTL, aunque estas diferencias tampoco son significativas. No teniéndose constancia de ensayos previos similares. El músculo cardíaco es un tejido cuyo funcionamiento lleva consigo una alta demanda energética, y el ratio de mitocondrias por células es de los mayores que encontramos en el organismo. La mitocondria es una organela con gran capacidad de adaptación a los requerimientos celulares, siendo altamente sensible a los cambios en el sustrato, como puede ser la administración de estos fármacos (182). Así, a pesar de ciertos cambios morfológicos en tamaño y estructura interna, vemos que no se encuentra afectado el rendimiento energético, ya que los niveles de ATP permanecieron constantes: sin diferencias significativas respecto a los CTL. Esto podría significar que aunque el funcionamiento mitocondrial no sea el óptimo, la células podría estar tirando de vías moleculares menos eficientes para la obtención energética como es la glicólisis (paso previo al ciclo de Krebs).

Respecto al análisis del colágeno, de su recambio y densidad, ha sido objeto de estudio en muchas investigaciones, usando técnicas como las de inmunohistoquímica (183) o RT-PCR para ver la expresión de genes que controlan el recambio del colágeno (184). Para determinar el colágeno hemos utilizado un kit comercial que evalúa la presencia de nuevo colágeno. Este mismo método de determinación de colágeno ya ha sido validado anteriormente por Lin et al (185) y Liu et al (186), pero en este caso aplicado al sobrenadante de cultivos celulares de

pacientes con esta patología a las que tratan con N e IL1 $\beta$ , por lo que sus resultados no son comparables a nuestros datos extraídos directamente de homogenados de tejido de ratas sanas tratadas.

Todos los estudios previos indican que existe un aumento en la cantidad de colágeno total (42). Según nuestros hallazgos, parece que la producción de nuevo colágeno no se ve afectada por el tratamiento con los fármacos ni a nivel gingival ni cardíaco. Esto estaría en concordancia con los estudios que hablan de una afectación de la degradación del colágeno que conlleva una mayor acumulación del mismo, mediado por una fagocitosis reducida del fibroblasto (187), pudiendo esto explicar el acúmulo de autofagosomas/vacuolas internas observadas en la microscopia electrónica. Este acúmulo de vesículas en la célula podría relacionarse con la disminución de la autofagia celular en este agrandamiento gingival inducido por fármacos. En un ensayo en ratas a las que se les administró de forma concomitante a CsA un tratamiento con sirolimus (fármaco inhibidor del *mammalian target of rapamycin* o mTOR) se observó que el agrandamiento gingival era menos severo (188). mTOR es un modulador de una de las vías moleculares que inhibe la autofagia (189), por lo que podría estar implicado en la acumulación de autofagosomas/vesículas en el interior celular y a la falta de degradación de todos estos componentes de la matriz extracelular que se acumulan y producen el agrandamiento.

Como aportación al estudio de la etiopatogenia de este proceso, hemos querido evaluar la afectación mitocondrial y el estrés oxidativo. Previamente, diversos autores han tratado de relacionar a este agrandamiento gingival con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (165, 181, 190), existiendo poca literatura acerca de esta relación. No tenemos constancia de que se haya realizado un análisis

exhaustivo de los parámetros mitocondriales, por ello planteamos este estudio sobre modelo animal, que nos permita acercarnos un poco más a la evidencia científica.

Los niveles de peroxidación lipídica nos van a resultar un indicador útil del estrés oxidativo, ya que la presencia de lipoperoxidación es una de las consecuencias más conocidas de la generación de ROS (191). Los lípidos, principales componentes estructurales de las membranas celulares, son compuestos muy susceptibles a la oxidación, de ahí que los lípidos peróxidos se usen como biomarcadores del estrés oxidativo (192). El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de bajo peso molecular formados durante la descomposición de los ácidos grasos polinsaturados inducida por ROS (193). MDA reacciona rápidamente con el ácido tiobarbitúrico produciendo un pigmento rojo que puede ser fácilmente medido por espectrofotometría en forma de sustancia reactiva del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (193). Aunque este ensayo es criticado debida a su baja especificidad y variación según las condiciones del ensayo (194), estas parece que son debidas a las variaciones individuales de concentración de MDA (195), de ahí que siempre refiramos nuestros resultados a la cantidad de proteína de la muestra detectada mediante el método Bradford.

Observando nuestros resultados, en el grupo N hay un ligero aumento de los niveles sólo a nivel del tejido gingival, mientras que en el grupo CsA hay un aumento significativo de lípidos peróxidos respecto a los controles tanto para encía como para tejido cardíaco. A través de la evaluación de los lípidos peróxidos con una técnica similar, Josephine et al (196) han relacionado los daños renales secundarios a la administración de CsA con el estrés oxidativo. Esto parece indicar que la mitocondria trata de mantener el rendimiento energético (niveles de ATP) con una dinámica que



la lleva aumentar los niveles de lípidos peróxidos y consecuente, mayor estrés oxidativo en el tejido.

Para completar el análisis del funcionamiento mitocondrial hemos evaluado varias proteínas mediante técnicas de western blot. Esta técnica está universalmente extendida como el método más idóneo para detección de proteínas, ya que nos aporta datos fiables tanto de cuantificación como de actividad proteica. Lo que nos interesa saber es cuánto se están expresando las proteínas relacionadas con el daño mitocondrial y antioxidantes. Para ello hemos evaluado la presencia de OGG-1/2, un enzima reparadora del ADN que actúa como protectora de los ácidos nucleicos frente al daño oxidativo, siendo la forma OGG1 más prevalente en el núcleo, mientras que OGG2 es una forma específica de la mitocondria (197); TFAM, es una proteína mitocondrial que a través de su interacción con el ADN mitocondrial está directamente relacionada con la biogénesis mitocondrial; MnSOD, antioxidante específico mitocondrial; y catalasa, antioxidante regulador de estrés oxidativo e inflamación. Todo ello normalizado mediante un control de carga con GAPDH.

En cuanto al tejido gingival, se ha observado que tanto N como CsA van a incrementar la presencia de OGG, su acumulación es indicativo de que se está produciendo daño oxidativo. Por otro lado observamos que TFAM también se encuentra aumentado, pero sólo de forma significativa para CsA, en este grupo, ante una situación de estrés reflejada por los cambios ultraestructurales, presencia de ROS y daño oxidativo, se observa una mayor demanda de biogénesis mitocondrial. Otra forma de valorar la respuesta al daño oxidativo es mediante la presencia de antioxidantes, observamos que en ambos grupos de tratamiento existe mayor presencia de catalasa y MnSOD en respuesta a la situación de estrés oxidativo. En el caso del grupo CsA la presencia de MnSOD es menor que en N, al ser específica

mitocondrial puede asociarse que en este grupo las mitocondrias presenten mayor desestructuración en sus crestas.

Respecto a los datos de western blot en el tejido cardiaco, los cambios más llamativos se producen en el grupo tratado con CsA, donde se produce un descenso significativo en los niveles de ambos antioxidantes respecto a los grupos N y CTL. Esto, unido al aumento significativo de ROS (en forma de lípidos peróxidos) en este grupo indica una clara presencia de estrés oxidativo en el tejido cardiaco, no siendo así para el corazón de las ratas tratadas con N.

Comparando nuestros datos con los de ensayos anteriores, no existen estudios previos que hagan un análisis exhaustivo en tejido gingival y cardiaco del daño oxidativo de estos fármacos. Otros autores han demostrado que CsA induce estrés oxidativo a dosis superiores a  $1\mu\text{M}$  en cultivos de células endoteliales de aorta bovina (198), parece que estas dosis son las que se suelen manejar en los pacientes en tratamiento que sufren agrandamiento gingival secundario. Otros ensayos en cultivos celulares han observado que el tratamiento con CsA aumenta el estrés oxidativo, viéndose una disminución en el nivel de antioxidantes, en este caso de glutatión reductasa, con un aumento concomitante en los niveles de ROS en forma de glutatión peroxidasa, asociando al estrés oxidativo como posible factor determinante en la incidencia del agrandamiento gingival (190). Battino et al (199), tratando con las mismas dosis de CsA a ratas wistar y analizando las mitocondrias hepáticas encontró que estas también presentaban anomalías morfológicas en sus crestas y que los niveles de antioxidantes de tipo lipofílico estaban ligeramente aumentados (vitamina E, CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>). Otros autores han evaluado también en ratas el estrés oxidativo producido por CsA en otros órganos como el riñón (196) y el hígado (200), llegando a resultados similares sobre el estrés oxidativo. Queda bien establecida la relación

directa entre la nefrotoxicidad de la CsA con el daño oxidativo (201). Como podemos ver, son mayores los estudios que relacionan a CsA con el daño oxidativo, en cambio, y en concordancia con nuestros datos, se ha observado que una de las vías de actuación de la N para mejorar la patología cardíaca del paciente es a través del control del estrés oxidativo, ofreciendo una protección al paciente frente a este a nivel cardíaco (202). Tal como apoyan otros estudios, las vías de señalización molecular que conducen al agrandamiento gingival son diferentes en función del fármaco (42).

Respecto a los datos de los pacientes con fibromatosis, la histología de las biopsias muestran ciertas características que han sido previamente asociadas con la teoría de EMT, como son la falta de continuidad en la lámina basal, migración de células epiteliales hacia el conectivo y presencia en tejido conectivo de células epitelioide (203).

Comparando los resultados en las ratas con los de los pacientes con fibromatosis gingival hereditaria, observamos que al contrario de lo que sucede en las ratas tratadas con N y CsA, en estos sí existe un aumento en la producción de colágeno asociado a la severidad clínica del agrandamiento. Otros autores han observado que en estos pacientes se produce un aumento en la síntesis de colágeno (204, 97), que unida a una disminución en la degradación de la matriz extracelular (100) produce un gran acumulo de colágeno en el paciente. En general, se ha observado que existe gran variabilidad individual en los pacientes con fibromatosis (205). Queda claro que las vías moleculares de uno y otro proceso son diferentes.

Por otro lado, hemos evaluado *in vitro*, mediante el uso de fibroblastos gingivales de un donante sano, como el estrés oxidativo puede influir la producción de colágeno, a través de la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parece que este estrés oxidativo

induce un aumento en la producción de colágeno y que esta se restaura a niveles normales cuando se aplican antioxidantes. No tenemos constancia de ensayos similares anteriores. Algunos autores defienden que existe aumento de la matriz de colágeno a consecuencia de un descenso en su degradación (206).

En general, la aparición de este efecto no deseado a nivel gingival, no suele ser motivo suficiente para cambiar el fármaco que ayuda a tratar una patología sistémica que sí llega a comprometer la vida del paciente. Además, se espera que la prescripción de estos fármacos continúe aumentando en los próximos años. Se hace necesario identificar la etiopatogenia del proceso para llevar a cabo un manejo adecuado del mismo y mejorar la calidad de vida de estos pacientes médicamente comprometidos. En el presente estudio, y a pesar de un periodo experimental de tan sólo 6 semanas, los datos parecen indicar que existe cierto grado de disfunción mitocondrial como consecuencia de la administración de N y CsA, además de observarse que en una situación de agrandamiento idiopático como es el caso de la fibromatosis gingival hereditaria, parece tener cierta influencia el estrés oxidativo. Por otro lado, y observando los datos en el tejido cardíaco, podríamos considerar un cotratamiento con antioxidantes en los pacientes a los que se administra CsA, para mejorar los efectos secundario al fármaco a nivel cardíaco. Se siguen necesitando más ensayos que terminen de aclarar todas las vías moleculares que tienen lugar en este proceso.

# Conclusiones

---



## 7. CONCLUSIONES

- I. El estrés oxidativo y los cambios en el metabolismo mitocondrial podrían estar relacionados con la etiopatogenia del agrandamiento gingival.
- II. El agrandamiento gingival inducido por CsA en ratas, presenta una clínica más severa en cuanto al grado de aumento en la altura del tejido respecto a N, y esta clínica se asocia a cambios más severos en la morfología mitocondrial y desestructuración interna, y a mayores valores de estrés oxidativo y biogénesis mitocondrial.
- III. El agrandamiento gingival inducido por N en ratas, no llegó a producir un agrandamiento significativo del tejido, ni cambios a nivel ultraestructural. El tratamiento con N se asoció a mayor daño oxidativo y mayor presencia de antioxidantes.
- IV. El rendimiento energético celular en forma de ATP se mantuvo en valores adecuados a pesar de los tratamientos.
- V. La síntesis de colágeno no se ve afectada por el tratamiento con N y CsA en ratas.
- VI. El tratamiento con CsA induce estrés oxidativo a nivel cardíaco, por lo que el paciente podría beneficiarse de un cotratamiento con antioxidantes para mejorar los efectos secundarios a nivel cardíaco.
- VII. El tratamiento con N induce mayores niveles de antioxidantes a nivel cardíaco.

- VIII. En la fibromatosis gingival hereditaria se produce un aumento del estrés oxidativo, y este está directamente relacionado con la severidad en manifestación clínica del agrandamiento gingival.
- IX. Los pacientes con fibromatosis presentaron mayores niveles de síntesis de colágeno.
- X. La presencia de ROS induce una mayor tasa de producción de colágeno en fibroblastos sanos, y esta es capaz de ser restaurada con el tratamiento con antioxidantes.
- XI. El tratamiento con antioxidantes podría ser un posible enfoque terapéutico en el agrandamiento gingival de los pacientes con fibromatosis gingival hereditaria.
- XII. El estrés oxidativo está aumentado en la fibromatosis gingival hereditaria de forma directamente proporcional a la severidad de la clínica.
- XIII. Aunque fibromatosis gingival hereditaria, CsA y N comparten la misma entidad clínica, presenta vías moleculares muy diferentes y se comportan de distinta manera en función del tejido.

Es crítico entender cómo se desarrolla este proceso a nivel tisular, celular y molecular para poder desarrollar estrategias terapéuticas específicas que reduzcan la incidencia de este agrandamiento gingival y mejoren la calidad de vida de estos pacientes que, en general, ya se encuentra comprometida por los motivos que los llevan al consumo de estos fármacos.



Un manejo eficaz de estos pacientes reside en la colaboración activa del médico especialista y el odontólogo, logrando minimizar la aparición de posibles complicaciones.



# Bibliografía

---



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>1</sup> Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4:1-6.
- <sup>2</sup> Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Periodontología clínica e implantología odontológica*, Tomo 1. Parte 1. Capítulo 1. Editorial Médica Panamericana. 5º Edición 2009.
- <sup>3</sup> Doufexi A, Mina M, Ioannidou E. Gingival overgrowth in children: Epidemiology, pathogenesis, and complications. A literature review. *J Periodontol.* 2005;76:3-10.
- <sup>4</sup> Marshall RI, Bartold PM. A clinical review of drug-induced gingival overgrowths. *Aust Dent J.* 1999;44:219-232.
- <sup>5</sup> Wright G, Welbury RR, Hosey MT. Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children. *Int J Paediatr Dent.* 2005;15: 403-411.
- <sup>6</sup> Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agents. *Agents Actions.* 1976;6:468-475.
- <sup>7</sup> Hallmon WW, Rossmann JA. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. *Periodontol 2000.* 1999;21:176-196.
- <sup>8</sup> Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Capítulo 24. farmacología de la respuesta inmunitaria. In: *Farmacología Humana*. 5º ed. España: Elsevier Masson; 2008. p. 457.
- <sup>9</sup> Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol.* 1992;19:1-11.
- <sup>10</sup> Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;23:807-902.
- <sup>11</sup> Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: A comprehensive review. *Quintessence Int.* 1999;30:775-783.
- <sup>12</sup> Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Capítulo 37: Fármacos antagonistas del calcio. In: *Farmacología Humana*. 5º ed. España: Elsevier Masson; 2008. p. 737.

- 
- <sup>13</sup> Deen-Duggins L, Fry HR, Clay JR, Turner JR. Nifedipine-associated gingival overgrowth: A survey of the literature and report of four cases. *Quintessence Int.* 1996;27:163-170.
- <sup>14</sup> Kimball OP. The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoinate. *J Am Med Assoc.* 1939;112:1244-1245.
- <sup>15</sup> Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Lortscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol.* 1983;10:237-46.
- <sup>16</sup> Lederman D, Lumerman H, Reuben S, Freedman PD. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy: report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57:620-622.
- <sup>17</sup> Ramon Y, Behar S, Kishon Y, Engelberg IS. Gingival hyperplasia caused by nifedipine--a preliminary report. *Int J Cardiol.* 1984;5:195-206.
- <sup>18</sup> 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 Oral Radiol Endod.* 1995;79:715-722.
- <sup>19</sup> Seymour RA, Thomason JM, Nolan A. Oral lesions in organ transplant patients. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:297-304.
- <sup>20</sup> Dongari A, McDonnell HT, Langlais RP. Drug-induced gingival overgrowth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1999;76:543-548.
- <sup>21</sup> Nakib N, Ashrafi SS. Drug-induced gingival overgrowth. *Dis Mon* 2011;57:225-230.
- <sup>22</sup> Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 2000;27:217-223.
- <sup>23</sup> Seymour RA. Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2006;40:120-129.
- <sup>24</sup> Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, Escudero N, Bascones A, Lo Muzio L. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12:E19-25.

- 
- <sup>25</sup> Somacarrera ML, Hernandez G, Acero J, Moskow BS. Factors relating to the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival overgrowth in transplant patients. A longitudinal study. *J Periodontol.* 1994;65:671–675.
- <sup>26</sup> 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 Paediatr Dent.* 1995;5:217–222.
- <sup>27</sup> Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry GJD, Idle JR. Iatrogenic gingival overgrowth in cardiac transplantation. *J Periodontol* 1995;66:742–746.
- <sup>28</sup> Ellis J, Seymour R, Steele J, Robertson P, Butler T, JM T. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community based study. *J Periodontol* 1999;70:63–67.
- <sup>29</sup> 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.
- <sup>30</sup> O'Valle F, Mesa F, Aneiros J, Gomez-Morales M, Lucena MA, Ramirez C, Revelles F, Moreno E, Navarro N, Caballero T, Masseroli M, García del Moral R. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporine A. Clinical and morphometric study with image analysis. *J Clin Periodontol.* 1995;22:591–597.
- <sup>31</sup> Wilson RF, Morel A, Smith D, Koffman CG, Ogg CS, Rigden SP, Ashley FP. Contribution of individual drugs to gingival overgrowth in adult and juvenile renal transplant patients treated with multiple therapy. *J Clin Periodontol.* 1998;25:457–464.
- <sup>32</sup> Pernu HE, Pernu LM, Knuuttila ML, Huttunen KR. Gingival overgrowth among renal transplant recipients and uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1993;8:1254–1258.
- <sup>33</sup> Hassell TM, Hefti AF. Drug induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2:103–137.
- <sup>34</sup> Daley TD, Wysocki GP, Mamandras AH. Orthodontic therapy in the patient treated with cyclosporine. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100:537–541.

- 
- <sup>35</sup> Fernandes MI, Gaio EJ, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Rados PV. Effect of nifedipine on gingival enlargement and periodontal breakdown in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010;55:523-529.
- <sup>36</sup> 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.
- <sup>37</sup> Yng-Tzer L, Fang-Tai Y. Gingival enlargement in children administered cyclosporine after liver transplantation. *J Periodontol.* 2010;81:1250–1255.
- <sup>38</sup> Kaur G, Verhamme KM, Dieleman JP, Vanrolleghem A, van Soest EM, Stricker BH, Sturkenboom MC. Association between calcium channel blockers and gingival hyperplasia. *J Clin Periodontol.* 2010;37:625-630.
- <sup>39</sup> Charles NC, Chavan R, Moon NJ, Nalla S, Mali J, Prajapati A. Drug-Induced gingival overgrowth: The genetic dimension. *North Am J Med Sci.* 2014;6:478-80.
- <sup>40</sup> 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.* 1996;23:737–742.
- <sup>41</sup> Dannewitz B, Kruck EM, Staehle HJ, Eickholz P, Giese T, Meuer S, et al. Cyclosporine-induced gingival overgrowth correlates with NFAT-regulated gene expression: A pilot study. *J Clin Periodontol.* 2011;38:984-991.
- <sup>42</sup> Trackman PC, Kantarci A. Molecular and clinical aspects of drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2015;94:540-546.
- <sup>43</sup> 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.
- <sup>44</sup> Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:165-175.
- <sup>45</sup> Kantarci A, Augustin P, Firatli E, Sheff MC, Hasturk H, Graves DT, Trackman PC. Apoptosis in gingival overgrowth tissues. *J Dent Res.* 2007;86:888-892.



- 
- <sup>46</sup> Castro LA, Elias LS, Oton-Leite AF, de Spindula-Filho JV, Leles CR, Batista AC, Mendonça EF. Long-term effects of nifedipine on human gingival epithelium: A histopathological and immunohistochemical study. *J Oral Sci.* 2010;52:55-62.
- <sup>47</sup> Shimizu T, Kubota T, Nakasone N, Abe D, Morozumi T, Yoshie H. Microarray and quantitative RT-PCR analyses in calcium-channel blockers induced gingival overgrowth tissues of periodontitis patients. *Arch Oral Biol.* 2011;56:277-284.
- <sup>48</sup> Sukkar TZ, Thomason JM, Cawston TE, Lakey R, Jones D, Catterall J, Seymour RA. Gingival fibroblasts grown from cyclosporin-treated patients show a reduced production of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) compared with normal gingival fibroblasts, and cyclosporin down-regulates the production of MMP-1 stimulated by pro-inflammatory cytokines. *J Periodontal Res.* 2007;42:580-588.
- <sup>49</sup> Emingil G, Afacan B, Tervahartiala T, Toz H, Atilla G, Sorsa T. GCF and serum myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-13 levels in renal transplant patients. *Arch Oral Biol.* 2001;55:719-727.
- <sup>50</sup> Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA, Thomason JM. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2004;83:322-326.
- <sup>51</sup> Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol.* 1991;148:157-173.
- <sup>52</sup> Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-791.
- <sup>53</sup> Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18:816-827.
- <sup>54</sup> Eickelberg O. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett.* 2001;506:11-14.
- <sup>55</sup> Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol.* 2001;99:308-319.

- 
- <sup>56</sup> Khanna A, Li B, Stenzel KH, Suthanthiran M. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation*. 1994;57:577-582.
- <sup>57</sup> Wolf G, Thaiss F, Stahl RA. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor-beta in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation*. 1995;60:237-241.
- <sup>58</sup> Kantarci A, Black SA, Xydas CE, Murawel P, Uchida Y, Yucekal-Tuncer B, Atilla G, Emingil G, Uzel MI, Lee A, Firatli E, Sheff M, Hasturk H, Van Dyke TE, Trackman PC. Epithelial and connective tissue cell CTGF/CCN2 expression in gingival fibrosis. *J Pathol*. 2006;210:59-66.
- <sup>59</sup> Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. 1999. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*. 1999;81:153–159.
- <sup>60</sup> Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol*. 2002;21:473-482.
- <sup>61</sup> Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, Mohri T, Nonen S, Maeda M, Azuma J. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370:274-278.
- <sup>62</sup> Bahammam M, Black SA Jr, Sume SS, Assaggaf MA, Faibish M, Trackman PC. Requirement for active glycogen synthase kinase-3beta in TGF-beta1 upregulation of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) levels in human gingival fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013;305:C581–C590
- <sup>63</sup> Elliott CG, Hamilton DW. Deconstructing fibrosis research: do profibrotic signals point the way for chronic dermal wound regeneration? *J Cell Commun Signal* 2011;5:301-315.
- <sup>64</sup> Kim SS, Jackson-Boeters L, Darling MR, Rieder MJ, Hamilton DW. Nifedipine induces periostin expression in gingival fibroblasts through TGF-beta. *J Dent Res*. 2013;92:1022–1028.

- 
- <sup>65</sup> Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2003;82:454-459.
- <sup>66</sup> Yoshida T, Nagata J, Yamane A. Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontal Res.* 2005;40:11-19.
- <sup>67</sup> Bullon P, Gallardo I, Goteri G, Rubini C, Battino M, Ribas J, Newman HN. Nifedipine and cyclosporin affect fibroblast calcium and gingiva. *J Dent Res.* 2007;86:357-362.
- <sup>68</sup> Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:1947-1958.
- <sup>69</sup> Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest.* 2002;109:787-796.
- <sup>70</sup> Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost.* 2004;92:262-274.
- <sup>71</sup> Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS J.* 2005;272:6297-6309.
- <sup>72</sup> Sume SS, Kantarci A, Lee A, Hasturk H, Trackman PC. Epithelial to mesenchymal transition in gingival overgrowth. *Am J Pathol.* 2010;177:208-218.
- <sup>73</sup> Kantarci A, Nseir Z, Kim YS, Sume SS, Trackman PC. Loss of basement membrane integrity in human gingival overgrowth. *J Dent Res.* 2011;90:8870-893.
- <sup>74</sup> Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Tenenbaum H. Expression of RNAs encoding for alpha and beta integrin subunits in periodontitis and in cyclosporin A gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 2003;30:937-943.
- <sup>75</sup> Alptekin NO, Ustun K, Yaprak E, Avunduk MC, Ataoglu T. Immunohistochemical analysis of CD45RO+ T cells and vascular endothelial growth factor expression in cyclosporin A-induced rat gingival tissue. *J Periodontol.* 2012;83:248-255.

---

<sup>76</sup> Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:11-21.

<sup>77</sup> Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 2007;131:1047-1058.

<sup>78</sup> Lu HK, Tseng CC, Lee YH, Li CL, Wang LF. Flutamide inhibits nifedipine- and interleukin-1 beta-induced collagen overproduction in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2010;45:451-457.

<sup>79</sup> Gross SD. Case of hypertrophy of the gums. *Louisville Rev.* 1856;1:232-237.

<sup>80</sup> Singer SL, Goldblatt J, Hallam LA, Winters JC. Hereditary gingival fibromatosis with a recessive mode of inheritance: Case reports. *Aust Dent J.* 1993;38:427-432.

<sup>81</sup> Kharbanda P, Sidhu SS, Panda SK, Deshmukh R. Gingival fibromatosis: Study of three generations with consanguinity. *Quintessence Int.* 1993;24:161-164.

<sup>82</sup> Goldblatt J, Singer SL. Autosomal recessive gingival fibromatosis with distinctive facies. *Clin Genet.* 1992;42:306-308.

<sup>83</sup> Takagi M, Yamamoto H, Mega H, Hsieh KJ, Shioda S, Enomoto S. Heterogeneity in the gingival fibromatoses. *Cancer.* 1991;68:2202-2212,

<sup>84</sup> Bozzo L, Machado MA, de Almeida OP, Lopes MA, Coletta RD. Hereditary gingival fibromatosis: Report of three cases. *J Clin Pediatr Dent.* 2000;25:41-46.

<sup>85</sup> Fletcher J. Gingival abnormalities of genetic origin: A preliminary communication with special reference to hereditary generalized gingival fibromatosis. *J Dent Res.* 1966;45:597-612.

<sup>86</sup> Danesh-Meyer MJ, Holborow DW. Familial gingival fibromatosis: A report of two patients. *N Z Dent J.* 1993;89:119-122.

<sup>87</sup> Soory M. Hormone mediation of immune responses in the progression of diabetes, rheumatoid arthritis and periodontal diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002;2:13-25.

<sup>88</sup> Martelli-Junior H, Lemos DP, Silva CO, Graner E, Coletta RD. Hereditary gingival fibromatosis: Report of a five-generation family with cellular proliferation analysis. *J Periodontol.* 2005;76:2299-2305.

- 
- <sup>89</sup> Araujo CS, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Histomorphometric characteristics and expression of epidermal growth factor and its receptor by epithelial cells of normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol Res.* 2003;38:237-241.
- <sup>90</sup> Barros SP, Merzel J, de Araujo VC, de Almeida OP, Bozzo L. Ultrastructural aspects of connective tissue in hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92:78-82.
- <sup>91</sup> Pego SP, Coletta RD, Mendes DC, de Faria PR, Melo-Filho MR, Alves LR, Martelli-Júnior H. Hereditary gingival fibromatosis: Clinical and ultrastructural features of a new family. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20:e150-155.
- <sup>92</sup> Coletta RD, Graner E. Hereditary gingival fibromatosis: a systematic review. *J Periodontol.* 2006 ;77:753-764.
- <sup>93</sup> de Andrade CR, Cotrin P, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Transforming growth factorbeta1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2001;72:1726-1733.
- <sup>94</sup> Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK. Increased proliferation, collagen, and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol.* 1997;68:524-530.
- <sup>95</sup> Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, Graner E. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005;76:272-278.
- <sup>96</sup> 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.
- <sup>97</sup> Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Effect of transforming growth factorbeta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2003;74:296-306.

---

<sup>98</sup> van der Pauw MT, van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Phagocytosis of fibronectin and collagens type I, III, and V by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2001;72:1340-1347.

<sup>99</sup> Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol.* 2003;74:188-195.

<sup>100</sup> 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-beta 1 autocrine stimulation. *J Periodontal Res.* 1999;34:457-463.

<sup>101</sup> Coletta RD, Reynolds MA, Martelli-Junior H, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ. Testosterone stimulates proliferation and inhibits interleukin-6 production of normal and hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:186-192.

<sup>102</sup> Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors in drug-induced and hereditary gingival overgrowth. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:281-289.

<sup>103</sup> 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-beta1. *J Periodontol.* 2003;74:1625-1633.

<sup>104</sup> Zhang C, Meng X, Zhu Z, Liu J, Deng A. Connective tissue growth factor regulates the key events in tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. *Cell Biol Int.* 2004;28:863-873.

<sup>105</sup> Badid C, Mounier N, Costa AM, Desmouliere A. Role of myofibroblasts during normal tissue repair and excessive scarring: Interest of their assessment in nephropathies. *Histol Histopathol* 2000;15:269-280.

<sup>106</sup> Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13:7-12.

<sup>107</sup> Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol.* 2004;48:509-517.

<sup>108</sup> Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986; 25:1058-1071.

- 
- <sup>109</sup> Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature*. 2001;414:807-812.
- <sup>110</sup> Goffart S and Wiesner RJ. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol*. 2003;88: 33-40.
- <sup>111</sup> Nisoli E, Clementi E, Moncada S, and Carruba MO. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol*. 2004;67: 1-15.
- <sup>112</sup> Picca A, Lezza AM. Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion*. 2015;25:67-75.
- <sup>113</sup> Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:1928-1939.
- <sup>114</sup> McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More than just a powerhouse. *Curr Biol*. 2006;16:R551-R560.
- <sup>115</sup> Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol*. 2011;13:589–598.
- <sup>116</sup> Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:870-879.
- <sup>117</sup> Cereghetti GM, Scorrano L. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene*. 2006;25:4717-4724.
- <sup>118</sup> Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*. 2012;46:265-287.
- <sup>119</sup> Pizzo P, Drago I, Filadi R, Pozzan T. Mitochondrial Ca<sup>2</sup> homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflugers. Arch* 2012;464:3-17.
- <sup>120</sup> Santo-Domingo J, Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797:907-912.
- <sup>121</sup> Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:566-578.
- <sup>122</sup> Santo-Domingo J, Wiederkehr A, De Marchi U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca(2.). *World J Biol Chem*. 2015;6:310-323.

---

<sup>123</sup> Mailloux RJ, Jin X, Willmore WG. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol.* 2014;2:123-139.

<sup>124</sup> Schwarzlander M, Dick TP, Meye AJ, Morgan B. Dissecting Redox Biology using Fluorescent Protein Sensors. *Antioxid Redox Signal.* 2015;13 [Epub ahead of print].

<sup>125</sup> Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry.* 2012;51:2959-2973.

<sup>126</sup> Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 2006;16:141-147.

<sup>127</sup> Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principios de bioquímica.* Capítulo 19. Editorial Omega. 5<sup>o</sup> Edición.

<sup>128</sup> Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:458-476.

<sup>129</sup> Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.* 1993;76:2812-23.

<sup>130</sup> Sugino N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim Sci J.* 2006;77:556-565.

<sup>131</sup> Halliwell B. Antioxidants: The basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol.* 1997;38:3-20.

<sup>132</sup> Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-344.

<sup>133</sup> Limon-Pacheco J, Gonsbatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009;674:137-147.

<sup>134</sup> Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.

<sup>135</sup> Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jul;1201:166-176.



- 
- <sup>136</sup> Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, Morillo JM, del Carmen Ramirez-Tortosa M, Battino M. Mitochondrial dysfunction promoted by porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:1336-1343.
- <sup>137</sup> Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol 2000.* 2014;64:139-153.
- <sup>138</sup> Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2002;162:221-225.
- <sup>139</sup> Atabek ME, Keskin M, Yazici C, et al. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr.* 2006;165:753-756.
- <sup>140</sup> Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002;51:597-604.
- <sup>141</sup> Shi XY, Hou FF, Niu HX, et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology.* 2008;149:1829-1839.
- <sup>142</sup> Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1201:166–176.
- <sup>143</sup> de Oliveira El-Warrak A, Rouma M, Amoroso A, Boysen SR, Chorfi Y. Measurement of vitamin A, vitamin E, selenium, and L-lactate in dogs with and without osteoarthritis secondary to ruptured cranial cruciate ligament. *Can Vet J.* 2012;53:1285-1288.
- <sup>144</sup> Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2011;6:191-198.
- <sup>145</sup> Moller P, Folkmann JK, Forchhammer L, et al. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008;266:84-97.
- <sup>146</sup> Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major

---

causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10:3886-1907.

<sup>147</sup> Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-820.

<sup>148</sup> Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17:24-38.

<sup>149</sup> Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058-1070.

<sup>150</sup> Avignon A, Hokayem M, Bisbal C, Lambert K. Dietary antioxidants: do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism? *Nutrition*. 2012;28:715-721.

<sup>151</sup> Krishnan K, Reeve A, Samuels D, Chinnery P, Blackwood J, Taylor R et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nature Genetics*. 2008;40:275-279.

<sup>152</sup> Harrison CM, Pompilius M, Pinkerton KE, Ballinger SW. Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine-induced oxidant production. *Environ Health Perspect*. 2010;119:676-681.

<sup>153</sup> Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283:1482-1488.

<sup>154</sup> Rodrigues SF, Granger DN. Cerebral microvascular inflammation in DOCA salt-induced hypertension: role of angiotensin II and mitochondrial superoxide. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;32:368-375.

<sup>155</sup> Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*. 2014;436:332-347.

<sup>156</sup> Nguyen HT, Hsieh MH, Gaborro A, Tinloy B, Phillips C, Adam RM. JNK/SAPK and p38 SAPK-2 mediate mechanical stretch-induced apoptosis via caspase-3 and-9 in NRK-52E renal epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;102:49-61.

- 
- <sup>157</sup> Matsuzawa A, Ichijo H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2008;1780:1325-1336.
- <sup>158</sup> Yu E, Mercer J, Bennett M. Mitochondria in vascular disease. *Cardiovascular Res*. 2012;95:173–182.
- <sup>159</sup> Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Grohn S, Sulkava R. Oral health in hospitalized and nonhospitalized community-dwelling elderly patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88:437-443.
- <sup>160</sup> Ibandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999;70:13-29.
- <sup>161</sup> D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res*. 2010; 89: 1241–1246.
- <sup>162</sup> Masi S, Salpea KD, Li K, Parkar M, Nibali L, Donos N, Patel K, Taddei S, Deanfield JE, D\_Aiuto F, Humphries SE. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis. *Free Radic Biol Med*. 2011;50:730–735.
- <sup>163</sup> Govindaraj P, Khan NA, Gopalakrishna P, Chandra RV, Vanniarajan A, Reddy AA, Singh S, Kumaresan R, Srinivas G, Singh L, Thangaraj K. Mitochondrial dysfunction and genetic heterogeneity in chronic periodontitis. *Mitochondrion*. 2011;11:504–512.
- <sup>164</sup> Canakçi CF, Tatar A, Canakç,i V, Cicek Y, Oztas S, Orbak R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2006;77:1894–1900.
- <sup>165</sup> Bullon P, Pugnali A, Gallardo I, Machuca G, Hevia A, Battino M. Ultrastructure of the gingiva in cardiac patients treated with or without calcium channel blockers. *J Clin Periodontol*. 2003;30:682-690.
- <sup>166</sup> Quiles JL, Pamplona R, Ramírez-Tortosa MC, Naudí A, Portero-Otín M, Araujo-Nepomuceno E, López-Frías M, Battino M, Ochoa JJ. Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart. *Mech Aging Dev*. 2010;131:38-47.

---

<sup>167</sup> Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.

<sup>168</sup> Barrientos A. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 2002;26:307–316.

<sup>169</sup> Garrabou G, Soriano A, López S, Guallar JP, Giralt M, Villarroya F, Martínez JA, Casademont J, Cardellach F, Mensa J, Miró O. Reversible inhibition of mitochondrial protein synthesis during linezolid-related hyperlactatemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:962–967.

<sup>170</sup> Pagliarini DJ, Rutter J. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev.* 2013;27:2615-2627.

<sup>171</sup> Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J.* 2010;4:37-47.

<sup>172</sup> 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.

<sup>173</sup> Seibel W, Yahia NA, McCleary LB, Lesko LJ, Hassell TM. Cyclosporine-induced gingival overgrowth in beagle dogs. *J Oral Pathol Med.* 1989;18:240-245.

<sup>174</sup> Heijl L, Sundin Y. Nitrendipine-induced gingival overgrowth in dogs. *J Periodontol.* 1989;60:104-112.

<sup>175</sup> Ayanoglou CM, Lesty C. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: a histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. *J Periodontal Res.* 1999;34:7-15.

<sup>176</sup> Pamuk F, Cetinkaya BO, Gulbahar MY, Gacar A, Keles GC, Erisgin Z, Arik N. Effects of tacrolimus and nifedipine, alone or in combination, on gingival tissues. *J Periodontol.* 2013;84:1673-1682.

<sup>177</sup> Moffitt ML, Bencivenni D, Cohen RE. Drug-induced gingival enlargement: an overview. *Compend Contin Educ Dent.* 2013;34:330-336.

- 
- <sup>178</sup> Bencivenni D, Neiders ME, Andreana S, Moffitt ML, Cohen RE. Effect of local nifedipine administration on rat gingiva. *J Int Acad Periodontol.* 2012;14:1-6.
- <sup>179</sup> Nakib N, Ashrafi SS. Drug-induced gingival overgrowth. *Dis Mon.* 2011;57:225-230.
- <sup>180</sup> 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.
- <sup>181</sup> Battino M, Bompadre S, Leone L, Pugnaroni A, Rubini C, Ferreiro MS, et al. The effect of cyclosporine A chronic administration on the antioxidant pattern of rat liver mitochondria: Structural and functional consequences. *Biofactors.* 2003;18:271-275.
- <sup>182</sup> Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell.* 2016;61:683-694.
- <sup>183</sup> Kanno CM, Oliveira JA, Garcia JF, Castro AL, Crivelini MM. Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tufted capuchin monkeys (*cebus apella*): Histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *J Periodontol.* 2008;79:114-122.
- <sup>184</sup> Gagliano N, Costa F, Tartaglia GM, Pettinari L, Grizzi F, Sforza C, et al. Effects of aging and cyclosporin a on collagen turnover in human gingiva. *Open Dent J.* 2009;3:219-226.
- <sup>185</sup> Lin SJ, Lu HK, Lee HW, Chen YC, Li CL, Wang LF. Nitric oxide inhibits androgen receptor-mediated collagen production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2012;47:701-710.
- <sup>186</sup> Lu HK, Tseng CC, Lee YH, Li CL, Wang LF. Flutamide inhibits nifedipine- and interleukin-1 beta-induced collagen overproduction in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2010;45:451-457.
- <sup>187</sup> Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T. Drug-induced gingival overgrowth-a review. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:1817-1821.

---

<sup>188</sup> Pamuk F, Cetinkaya BO, Ayas B, Keles GC, Gacar A. Evaluation of gingival alterations in rats medicated with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus: a stereological study. *J Periodont Res.* 2015; 50: 629–636.

<sup>189</sup> Chagin AS. Effectors of mTOR-autophagy pathway: targeting cancer, affecting the skeleton. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;28:1-7.

<sup>190</sup> Sardarian A, Andisheh Tadbir A, Zal F, Amini F, Jafarian A, Khademi F, Mostafavi-Pour Z. Altered oxidative status and integrin expression in cyclosporine A-treated oral epithelial cells. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25:98-104.

<sup>191</sup> Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M. Metabolic syndrome and periodontitis: Is oxidative stress a common link? *J Dent Res.* 2009;88:503-18.

<sup>192</sup> Georgieva NV. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems—a review. *Bulg J Vet Med.* 2005;8:1-11.

<sup>193</sup> Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9:515-540.

<sup>194</sup> Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:715S–724S.

<sup>195</sup> Castillo C, Hernández J, Valverde I, et al. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res Vet Sci.* 2006;80:133–139.

<sup>196</sup> Josephine A, Veena CK, Amudha G, Preetha SP, Varalakshmi P. Evaluating the effect of sulphated polysaccharides on cyclosporine a induced oxidative renal injury. *Mol Cell Biochem.* 2006;287:101-108.

<sup>197</sup> Yasukawa T, Nakahara Y, Hirai J, Inoue YH. *Drosophila* Ogg1 is required to suppress 8-oxoguanine accumulation following oxidative stress. *Genes Genet Syst.* 2015;90:11-20.

<sup>198</sup> Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera O, Navarro-Antolin J, Perez de Lema G, Rodriguez-Puyol M, Lamas S, Rodriguez-Puyol D. Role of reactive oxygen species in the signalling

---

cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1998;124:447–54.

<sup>199</sup> Battino M, Bompadre S, Leone L, Pugnali A, Rubini C, Ferreiro MS, et al. The effect of cyclosporine A chronic administration on the antioxidant pattern of rat liver mitochondria: Structural and functional consequences. *Biofactors.* 2003;18:271-275.

<sup>200</sup> Mostafavi-Pour Z, Zal F, Monabati A, Vessal M. Protective effects of a combination of quercetin and vitamin E against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Hepatol Res.* 2008;38:385-392.

<sup>201</sup> Damiano S, Ciarcia R, Montagnaro S, Pagnini U, Garofano T, Capasso G, Florio S, Giordano A. Prevention of nephrotoxicity induced by cyclosporine-A: role of antioxidants. *J Cell Biochem.* 2015;116:364-9.

<sup>202</sup> Imanishi M1, Ishizawa K, Sakurada T, Ishizawa Y, Yamano N, Kihira Y, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T. Drug development for cardiorenal disease based on oxidative stress control. *Yakugaku Zasshi.* 2014;134:715-719.

<sup>203</sup> Fu MM, Chin YT, Fu E, Chiu HC, Wang LY, Chiang CY, Tu HP. Role of Transforming Growth Factor-beta1 in Cyclosporine-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Gingival Epithelium. *J Periodontol.* 2015;86:120-128.

<sup>204</sup> Coletta RD, Almeida OP, Ferreira LR, Reynolds MA, Sauk JJ. Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. *Connect Tissue Res.* 1999;40:237-249.

<sup>205</sup> Pascu EI, Pisoschi CG, Andrei AM, Munteanu MC, Rauten AM, Scrieci M, Taisescu O, SurpăȚeanu M, BaniȚă IM. Heterogeneity of collagen secreting cells in gingival fibrosis--an immunohistochemical assessment and a review of the literature. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56:49-61.