



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO PROLIFERATIVO Y CITOTÓXICO DE LA
CICLOSPORINA A SOBRE FIBROBLASTOS GINGIVALES
HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

SANDY NALLELY GARCÍA CEBRERO

TUTORA: Dra. EILEEN URIBE QUEROL

ASESOR: Mtro. SAÚL CANO COLÍN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi ser por haberme permitido vivir este momento, por su perseverancia, dedicación y pasión y por abrirme el camino para lograr mis objetivos.

A mi madre Naty por haber estado conmigo en todo momento, por su apoyo incondicional, por su motivación constante que me ayudó a siempre seguir adelante, pero sobre todo por su amor y confianza.

A mi padre Viko por su ejemplo de lucha constante, por su apoyo para lograr mis metas y por su amor incondicional.

A mi hermano Ricardo, por sus consejos para seguir adelante, por no dejarme caer, por el apoyo incondicional que siempre me ha mostrado, por su amor y cariño, por demostrarme que pase lo que pase siempre va a estar conmigo y por enseñarme que la unión familiar es la base de cualquier meta.

A mi hermano Rodrigo por enseñarme que la vida es maravillosa y que de nosotros depende como queremos vivirla, por su alegría, buen humor y positivismo pero sobre todo por su amor y confianza.

A mis familiares: tíos (as), primos (as) y abuelitos por siempre estar y por su apoyo y cariño siempre.

A mis amigos, por apoyarme y acompañarme para lograr mis metas. Gracias a Magali, Erendira, Giss, Jacky, Anahí, Jerónimo, Joaquín, Alejandro, Alex Brizuela, Daniel y Víctor por formar parte de mi vida y por haber hecho el camino divertido.

A mis maestros por sus enseñanzas, apoyo, constancia, perseverancia, paciencia y motivación para lograr mis metas.

A la Dra. Eileen Uribe Querol por su gran apoyo y motivación constante para la culminación de mis estudios y para la elaboración de esta tesis, porque además de ser una excelente docente es un gran ser humano; al Dr. Saúl Cano por el apoyo ofrecido en este trabajo y al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por apoyarnos en su momento.

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 El Agrandamiento Gingival y su clasificación	7
3.2 Agrandamiento gingival inducido por fármacos	8
3.3 Fármacos inmunosupresores: Ciclosporina A	11
3.4 Mecanismo de acción de la Ciclosporina A	12
3.5 Efectos adversos de la Ciclosporina A	13
3.6 Histopatología del agrandamiento gingival causado por Ciclosporina A	14
3.7 Mecanismo molecular del agrandamiento gingival causado por Ciclosporina A	15
3.8 Proliferación Celular	16
3.8.1 Ciclo celular	
3.8.2 Curva de proliferación	19
3.8.3 Fases de la cinética de crecimiento celular	19
3.8.4 Medición de la proliferación celular	21
3.9 Apoptosis	24
3.10 Citotoxicidad	26
3.10.1 Citotoxicidad celular	26
3.10.2 Citotoxicidad por agentes tóxicos	27
3.10.3 Pruebas de citotoxicidad	28
3.10.4 Ensayo de MTT	29
4. ANTECEDENTES	31
4.1 Proliferación celular y Ciclosporina A	31
4.2 Cambios en los fibroblastos y en la matriz extracelular	31
4.3 Citotoxicidad y Ciclosporina A	33
5. JUSTIFICACIÓN	35
6. HIPÓTESIS	36

7. OBJETIVOS	36
8. MATERIALES Y MÉTODOS	37
8.1 Generación de líneas celulares a partir de biopsias de fibroblastos gingivales humanos	37
8.2 Conteo celular utilizando un Hemocitómetro	40
8.3 Cinética de proliferación de fibroblastos	42
8.4 Ensayo de viabilidad: Dosis – respuesta a ciclosporina A	43
8.5 Análisis Estadístico	45
9. RESULTADOS	47
9.1 Morfología de líneas celulares generadas a partir de biopsias de fibroblastos gingivales humanos	47
9.2 Tasa de proliferación de líneas celulares de fibroblastos generadas a partir de biopsias gingivales humanas	50
9.3 Efecto tóxico de la Ciclosporina A en las líneas celulares Cntrl_001 y GOCys_001	51
10. DISCUSIÓN	54
11. CONCLUSIONES	56
12. AGRADECIMIENTOS	56
13. BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

El agrandamiento gingival asociado al consumo de Ciclosporina A (CsA) provoca un incremento en el tamaño de la encía y se presenta en aproximadamente un 30% de los pacientes que la consumen. A pesar de la alta incidencia y recurrencia de estos agrandamientos gingivales, no se conoce como es que el fármaco altera el metabolismo de los fibroblastos gingivales para provocar el desarrollo de un agrandamiento. Los fibroblastos gingivales son el principal tipo celular de la encía y son los encargados de establecer el balance entre la síntesis y degradación de colágena. Se conoce que el balance se desregula en los agrandamientos gingivales. Sin embargo, no se conoce si existen alteraciones en la proliferación de los fibroblastos gingivales. El presente trabajo tiene como objetivo conocer el grado de proliferación de fibroblastos gingivales humanos de un paciente tratado con CsA en comparación con los de un paciente sano. Esto se logrará mediante la generación de líneas celulares GOCyc_001 y Cntrl_001 correspondientes a un paciente que consume CsA y uno control. Además, se buscará la dosis de Ciclosporina A que permita tener un cultivo con un tratamiento crónico con CsA midiendo la capacidad citotóxica de la CsA sobre estas líneas celulares. Los resultados de la investigación muestran que la proliferación de la línea GOCyc_001 es mayor en la de la línea control. Además, al parecer la concentración de 100ng/ml de ciclosporina A es la menos citotóxica. En conclusión, el tratamiento con CsA aumenta la proliferación de fibroblastos gingivales humanos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la cantidad de trasplantes de órganos ha ido en aumento en los pasados 20 años. Los pacientes trasplantados necesitan ser inmunosuprimidos para no rechazar el trasplante. La Ciclosporina A es uno de los fármacos inmunosupresores más utilizados para este fin. Sin embargo, dentro de los efectos secundarios que posee se encuentra el desarrollo de agrandamiento gingival.

El presente trabajo busca contribuir a entender como la Ciclosporina A afecta la tasa de división celular de los fibroblastos gingivales humanos y de postular un modelo de exposición crónica a la Ciclosporina A que nos permita entender mejor los eventos celulares y moleculares que subyacen a este crecimiento exacerbado de la encía.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Agrandamiento gingival y su clasificación

Las enfermedades gingivales son padecimientos relacionados con la encía. La clasificación de las enfermedades gingivales ha sufrido modificaciones importantes en los pasados 20 años.⁽⁴⁾ En 1999, la Academia Americana de Periodontología propuso la clasificación de las enfermedades gingivales en enfermedades gingivales inducidas por placa y enfermedades gingivales no inducidas por placa.⁽⁵⁾

Dentro de la clasificación de enfermedades gingivales inducidas por placa se localiza el agrandamiento gingival. El agrandamiento gingival se pueden clasificar de acuerdo a su etiología y a los cambios fisiológicos que se presentan como:

- I. Agrandamiento inflamatorio
 - A. Crónico
 - B. Agudo
- II. Agrandamiento inducido por fármacos
- III. Agrandamientos relacionados con enfermedades o padecimientos sistémicos
 - A. Agrandamiento condicionado
 - 1. Embarazo
 - 2. Pubertad
 - 3. Deficiencia de vitamina C
 - 4. Gingivitis de célula plasmática
 - 5. Agrandamiento condicionado no específico (granuloma piógeno)
 - B. Enfermedades sistémicas que provocan agrandamiento gingival
 - 1. Leucemia
 - 2. Enfermedades granulomatosas (p. ej., granulomatosis de Wegener, sarcoidosis)

IV. Agrandamiento neoplásico (tumores gingivales)

A. Tumores benignos

B. Tumores malignos

V. Agrandamiento falso

El agrandamiento gingival también se ha clasificado de acuerdo a su ubicación y distribución en:

- Localizado: limitado a la encía adyacente a un solo diente o un grupo de dientes.
- Generalizado: afecta la encía en toda la boca.
- Marginal: se confina a la encía marginal.
- Papilar: se confina a la papila interdental.
- Difuso: afecta a la encía marginal e insertada y a las papilas.
- Discreto: un agrandamiento aislado sésil o pedunculado tipo tumor.

La severidad del agrandamiento gingival se valora con base en la siguiente clasificación:⁽⁶⁾

- Grado 0: no hay signos de agrandamiento gingival.
- Grado I: el agrandamiento se confina a las papilas interdentales
- Grado II: el agrandamiento afecta las papilas y la encía marginal.
- Grado III: el agrandamiento cubre tres cuartas partes o más de la corona.

3.2 Agrandamiento Gingival inducido por fármacos

El agrandamiento gingival inducido por fármacos es un efecto adverso del fármaco sobre la fisiología de la encía. Clínicamente, el crecimiento es un agrandamiento indoloro, con forma circular de la papila interdental y que se extiende al margen gingival vestibular y lingual conforme progresa la

enfermedad. Los agrandamientos marginal y papilar llegan a unirse provocando así que la encía cubra una porción considerable de las coronas y así, interferir con el proceso de oclusión. El agrandamiento gingival suele ser generalizado y depende de la presencia de órganos dentarios. Pacientes edéntulos no presentan agrandamiento gingival ⁽⁶⁾.

El agrandamiento gingival es crónico y aumenta de tamaño de forma lenta. El único tratamiento es la cirugía, con una alta tasa de recidiva del agrandamiento.

La presencia de agrandamiento gingival puede provocar un difícil control de placa por lo que el agrandamiento puede volverse una combinación de un aumento en tamaño, por efecto del fármaco y por la inflamación provocada por las bacterias.

El agrandamiento gingival es una enfermedad que provoca desfiguración estética de la encía, asociado a fármacos como:

- Anticonvulsivos (p. ej., fenitoína, valproato de sodio, etc.)
- Inmunosupresores (p. ej., Ciclosporina A) (Figura 1)
- Bloqueantes de los canales del calcio (p. ej., nifedipina, verapamilo, etc.)



Figura 1. Agrandamiento gingival importante asociado a un tratamiento con ciclosporina A en un paciente con trasplante renal. (Lindhe. Periodontología clínica e implantología odontológica).

La primera descripción de un medicamento que causó agrandamiento gingival fue informada en 1939 y se asoció con el uso de fenitoína.⁽⁷⁾ La fenitoína induce agrandamiento gingival en el 50% de los pacientes que la utilizan. Estudios *in vitro* indican que la fenitoína actúa provocando los siguientes efectos: 1) estimula la proliferación de los fibroblastos y del epitelio; 2) promueve una mayor síntesis de glicosaminoglicanos y; 3) induce una disminución de la degradación de colágena, como resultado de la síntesis y activación de una colagenasa fibroblástica inactiva.⁽⁶⁾

Una teoría sobre la etiología de los agrandamientos gingivales inducidos por fenitoína sugiere que ésta promueve la acumulación de poblaciones de fibroblastos genéticamente diferentes, que presentan un metabolismo perturbado de la matriz extracelular (MEC), generando la acumulación de tejido conjuntivo como consecuencia de una reducción del catabolismo de la molécula de colágena.⁽⁸⁾

Los bloqueantes de los canales de calcio se asociaron por primera vez con agrandamiento gingival en 1984.⁽⁹⁾ Los bloqueantes son prescritos como antihipertensivos, antiarrítmicos y agentes antianginosos. Los bloqueadores ejercen sus efectos principalmente sobre los canales de calcio sensibles a voltaje, localizados en la membrana plasmática. La nifedipina es el principal bloqueador asociado con agrandamiento gingival.⁽¹⁰⁾ La nifedipina incrementa el número de los fibroblastos gingivales y esto se refleja en un aumento en la producción de matriz extracelular .

Otro de los fármacos asociado con agrandamiento gingival es la Ciclosporina A (CsA), un inmunosupresor usado principalmente para la prevención del rechazo de órganos trasplantados⁽³⁾. Las características clínicas del agrandamiento gingival causadas por este fármaco fueron descritas por primera vez en 1983.⁽¹¹⁾ La Ciclosporina A afecta la encía en un 25-30% de los pacientes tratados.^(12, 13) Existen diversas hipótesis para explicar por qué este fármaco compromete la encía pero la más aceptada es la que sugiere que el principal metabolito de la Ciclosporina A, la hidroxiciclosporina (M-17), estimula la proliferación de los

fibroblastos.⁽¹⁴⁾ Se ha postulado que este incremento del número de células se acompaña por una reducción de la degradación del tejido conjuntivo gingival ⁽¹²⁾ y podría considerarse la causa principal de la acumulación excesiva de matriz extracelular en los pacientes con agrandamiento gingival tratados con este inmunosupresor.

3.3 Fármacos inmunosupresores: Ciclosporina A

La Ciclosporina A es un endecapéptido cíclico lipofílico (Figura 2). Fue aislada del hongo *Tolypocladium inflatum* como parte de una investigación sobre antibióticos anti-fúngicos. Sus efectos inmunosupresores fueron descubiertos por J.F. Borel en 1976 y hasta 1983 fue aprobada para su uso clínico como un potente inmunosupresor.⁽¹⁵⁾ Desde entonces, la Ciclosporina A ha sido la principal herramienta para prevenir el rechazo de órganos trasplantados.

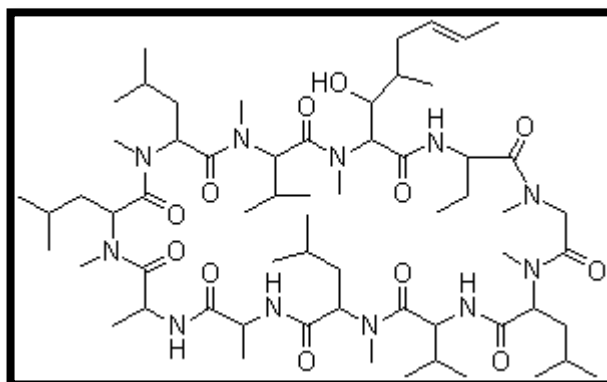


Figura 2. Estructura química de la Ciclosporina A.

La Ciclosporina A modificada es lipofílica e hidrofóbica por lo que para su administración es necesario solubilizarla. La administración vía oral en cápsulas de gelatina blanda se absorbe lenta y parcialmente. La biodisponibilidad del producto varía del 20 al 50% y su vida media es de seis horas. El fármaco circula en la sangre unido en un 60% a eritrocitos y el 40% restante se encuentra en el plasma unido principalmente a lipoproteínas. La difusión a tejidos es elevada y se metaboliza en hígado a través del citocromo P450, isoenzima 3A4 y su excreción es vía biliar a

las 6 horas a través de las heces y sólo un 10% por el riñón.⁽¹⁶⁾ En cuanto a la posología, se recomienda monitorizar las concentraciones en sangre con el fin de conocer el perfil de absorción en cada paciente.

El rango terapéutico depende del tipo de trasplante, del tiempo transcurrido y del tratamiento inmunosupresor concomitante.⁽¹⁷⁾

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

A partir de entonces, se va reduciendo la dosis mensualmente hasta llegar a una dosis de mantenimiento de 6-8 mg/kg/día. La presentación por vía oral es en cápsulas de 25mg, 50mg y 100mg y en solución 100mg/ml.⁽¹⁸⁾

La Ciclosporina A modificada actúa sobre el sistema inmune. Posee un efecto inhibitor selectivo sobre los linfocitos T ayudadores y sobre la activación de los macrófagos. Así mismo, inhibe la producción de interleucina-1 (IL-1) y disminuye la producción de IL-2 (19) y la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

3.4 Mecanismo de acción de la Ciclosporina A

El mecanismo de acción de la Ciclosporina A consiste en la inhibición de la calcineurina fosfatasa, la cual es necesaria para la producción de IL-2, que a su vez es necesaria para la activación de los linfocitos T ayudadores y de los linfocitos T citotóxicos.

La ciclosporina basa su efecto de acción inmunosupresora, primero, en la unión a un receptor de la inmunofilina intracelular [ciclofilina(CpN)] y, segundo, como parte de un complejo ciclosporina-ciclofilina que inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina (CaN) que normalmente promueve la migración del factor nuclear de células T activas del citoplasma al

núcleo, donde activa la transcripción del gen de la *IL-2*. De este modo, la ciclosporina actuaría bloqueando el paso de la fase G0 a G1 del ciclo celular (Figura 3).⁽²⁰⁾

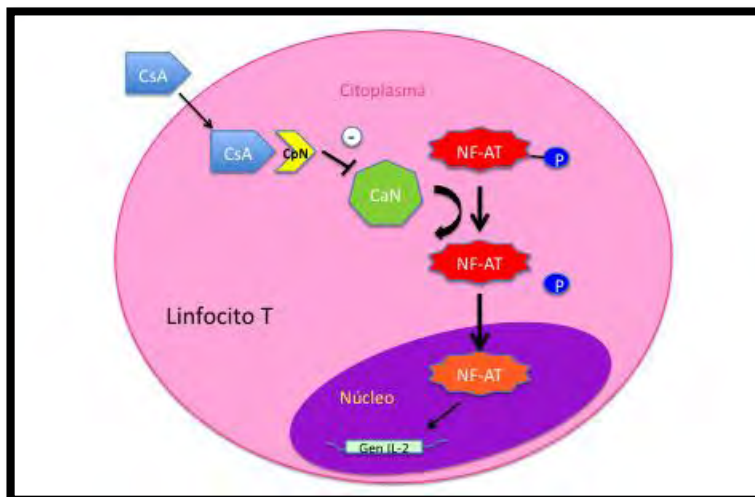


Figura 3. Mecanismo de acción de la Ciclosporina A. El complejo CsA-CpN inhibe la actividad fosfatasa de CaN, por lo tanto se inhibe la transcripción de IL-2. Tomado de (2)

3.5 Efectos adversos de la Ciclosporina A

El uso clínico de la Ciclosporina A es a menudo complicado pues se han documentado varios efectos secundarios como la nefrotoxicidad, la hipertensión arterial asociada generalmente a una retención de sodio y lípidos; la hepatotoxicidad, la formación de cálculos biliares, la diabetes mellitus, la neurotoxicidad, la epilepsia y el agrandamiento gingival.^(17, 21) Entre el 30% y el 80% de los pacientes que toman este medicamento presentan agrandamiento gingival. De las personas con este padecimiento, más del 70% es presentado por adultos.^(22, 23)

Además la supresión de la respuesta inmune provoca un aumento de la incidencia de infecciones y de neoplasias, principalmente linfomas de células B (en relación con la infección de virus de Epstein Bar, y que revierten total o parcialmente al disminuir o interrumpir el tratamiento) y tumores cutáneos (carcinomas y sarcoma de Kaposi).⁽¹⁷⁾

3.6 Histopatología del agrandamiento gingival causado por Ciclosporina A

De acuerdo a exámenes histopatológicos realizados sobre biopsias del tejido que presenta agrandamiento gingival causado por ciclosporina se muestran alteraciones del epitelio y tejido conectivo, observándose aumento de la matriz de colágena y engrosamiento epitelial. Además se han observado zonas de tejido de granulación en casos asociados a placa microbiana.⁽²⁴⁾

Otros estudios revelan que el epitelio se presenta con acantosis y con membrana basal íntegra. El tejido conectivo subyacente presenta zonas edematosas con aumento de la matriz extra celular (MEC), vasodilatación, numerosos fibroblastos en la profundidad con depósito de fibras de colágena en diferentes direcciones (Figura 4).

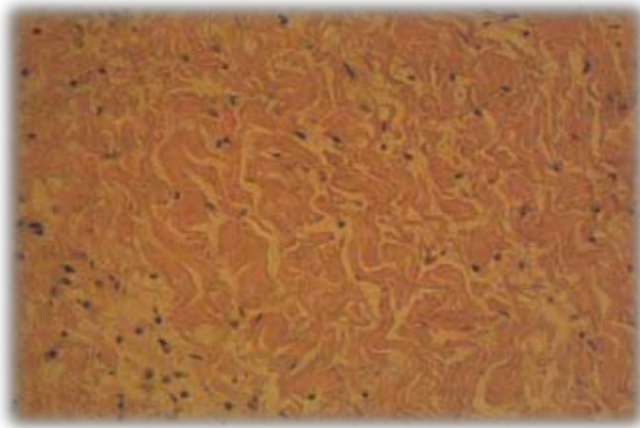


Figura 4. Corte histológico de agrandamiento gingival por Ciclosporina A. Se observa tejido conectivo denso formado por fibras colágenas en diferentes direcciones. Tinción Hematoxilina-eosina. Objetivo 200x. obtenida de (3).

El tejido presenta poca cantidad de fibras elásticas y más cantidad de glicosaminoglicanos que el tejido normal.⁽²⁵⁾

En algunos casos se observan células de Langerhans intra y subepiteliales en relación con sitios inflamados.^(3, 26)

En cortes histológicos de encía de pacientes tratados con Ciclosporina A existe un aumento de la vascularización, una acumulación de sustancias

extracelulares y un cambio en la morfología de la células epiteliales, siendo principalmente elongadas.⁽¹²⁾

3.7 Mecanismo molecular del agrandamiento gingival causado por Ciclosporina A

En el mecanismo molecular del agrandamiento gingival causado por la Ciclosporina A actúan diferentes moléculas, de las cuales se menciona su función en la siguiente tabla:

Molécula	Función	Referencia
Interferón IFN	<ul style="list-style-type: none"> Regula la proliferación y función de los fibroblastos 	(27)
IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> Es citotóxico para la mayor parte de los fibroblastos (requiere de su activación tanto a nivel de síntesis de RNA como de proteína). Inhibe la síntesis de colágena 	(28)
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Aumentan la citotoxicidad inducida por el IFN	(28)
Interleucina 1	<ul style="list-style-type: none"> Aumentan la citotoxicidad inducida por el IFN Mitogénico para los fibroblastos y aumenta la producción de colágena Estimula a los fibroblastos para liberar PGE₂ Promueve la proliferación celular a través de linfocitos T 	(28-30)

PGE ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Producido de manera endógena inhibe la síntesis de colágena • Disminución de colágena producida por IL-1 	(31, 32)
TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> • Antagoniza la acción de IL secretada por linfocitos T y promueve el agrandamiento gingival gracias a una migración de fibroblastos y al aumento en la síntesis de colágena. 	(33)
EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula el crecimiento y la síntesis de proteínas de matriz diferentes a la colágena, inhibiendo la producción de colágena. 	(33)

3.8 Proliferación Celular

3.8.1 Ciclo celular

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Consiste en una sucesión de etapas por las que transcurre la vida de una célula, la cual nace a partir de la división de una predecesora, pasa por una serie de etapas donde crece, duplica su tamaño y por último se divide para dar dos células hijas que comenzarán un nuevo ciclo.

Un ciclo celular típico se da en dos fases que son: la interfase que se divide en tres fases: G1, S y G2 y la mitosis que se divide en profase,

prometáfase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En la interfase, en G1 se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del DNA nuclear; finalmente, en G2, que es el tiempo que transcurre entre la fase S y el inicio de la Mitosis, la célula se prepara para mitosis.

Por último, el ciclo celular culmina con la mitosis, donde se divide la cromatina duplicada de modo tal que cada célula hija obtenga una copia del material genético o sea un cromosoma de cada tipo. El final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en fase G0 que corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Figura 5).

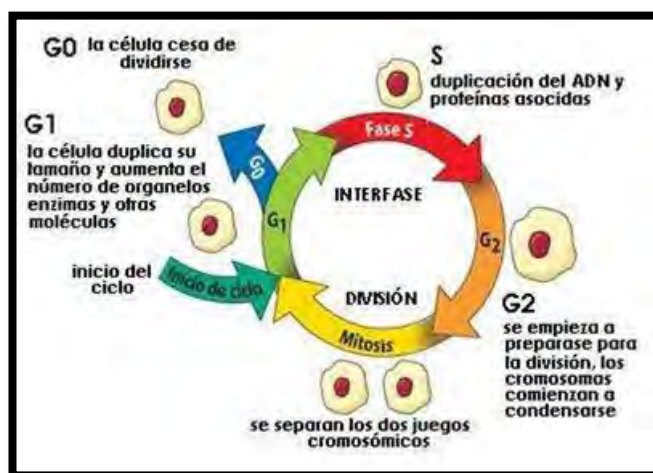


Figura 5. Las cuatro fases sucesivas del ciclo de una célula eucariota típica. Durante la interfase la célula crece continuamente; durante la fase M se divide. La replicación del ADN se produce únicamente durante la fase S de la interfase. (tomado de <http://benitobios.blogspot.mx/2009/05/ciclo-celular.html>)

La regulación del ciclo celular es realizada en sitios específicos llamados puntos de control, que pueden frenar o disparar diversos procesos que le permitan a la célula proseguir con su ciclo normal de replicación del material genético, crecimiento y división. Los puntos de control actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente; uno de ellos se encuentra en G1, justo antes de entrar en fase S y el otro en G2 antes de la mitosis. En estos puntos de

control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, estados de las partículas, entre otros elementos necesarios para a un ciclo celular típico normal. (Figura 6)



Figura 6. Regulación del ciclo celular. Los procesos básicos tales como la replicación del DNA, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular.

La función de la regulación del ciclo celular es realizada por dos familias de proteínas específicas. La primera es la familia de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (kdc), las cuales sufren fosforilación sobre sus aminoácidos (serinas y treoninas). La segunda familia son las ciclinas (cdc) (llamadas así debido a que aparecen y desaparecen a lo largo del ciclo), las cuales se unen a las kdc y controlan sus reacciones de fosforilación. El ensamblaje cíclico entre estos dos compuestos, ciclinas y kdc, su activación y desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular.^(1, 34)

3.8.2 Curva de proliferación

La medición de las tasas de proliferación celular se utiliza para determinar la respuesta de las células a un estímulo particular o toxina. La cuantificación del crecimiento poblacional del cultivo también es importante en el mantenimiento de rutina, ya que es un elemento crucial para el control del cultivo celular y para conocer el mejor momento para el subcultivo y la dilución de la densidad celular óptima.

3.8.3 Fases de la cinética de crecimiento celular

El ciclo de crecimiento se puede dividir en tres fases (Figura 7):

1. *Fase de retardo.* Esta fase es el tiempo después del subcultivo en el cual hay poca evidencia de un aumento en el número de células. Se trata de un período de adaptación durante el cual la célula sustituye elementos de la superficie de la célula y la matriz extracelular perdido durante la tripsinización, se une al sustrato, y se extiende. Durante la difusión vuelve a aparecer el citoesqueleto, una parte integral del proceso de propagación. La actividad de las enzimas, tales como la ADN polimerasa, aumenta, seguido por la síntesis de nuevo ADN y proteínas estructurales. Algunos productos de células especializadas pueden aparecer y desaparecer no hasta el cese de la proliferación celular a una densidad celular elevada.
2. *La fase logarítmica.* Esta fase es el período de crecimiento exponencial en el número de células después del periodo de retardo. Esta fase termina antes de que el cultivo llegue a confluencia (toda la superficie de crecimiento disponible está ocupado y todas las células están en contacto con las células circundantes). La duración de la fase depende de la densidad de

siembra, la tasa de crecimiento de las células, y la densidad de factores que inhiben la proliferación celular. En la fase logarítmica la fracción de crecimiento es alta (generalmente 90 - 100%), y el cultivo está en su forma más reproducible. Es el momento óptimo para el muestreo debido a que la población está más uniforme y la viabilidad es alta.

3. *Fase de meseta o estacionaria.* Hacia el final de la fase logarítmica el cultivo llega a confluencia. La proliferación se reduce al 10%. y en algunos casos cesa casi completamente. Las células son menos móviles, se orientan con respecto al otro y su crecimiento disminuye después del contacto con otras células efecto conocido como inhibición por contacto descrita originalmente por Abercrombie & Heaysman en 1954. Desde entonces se sabe que la reducción en el crecimiento de las células normales después de que se alcanza la confluencia no se debe únicamente al contacto, sino también puede implicar la reducción de difusión celular ^(35, 36), la acumulación de inhibidores, y el agotamiento de nutrientes; en particular los factores de crecimiento. ^(37, 38)

Los fibroblastos de la piel y del pulmón adulto de embriones humanos que expresan la inhibición por contacto de movimiento, continuarán proliferando hasta que se establecen capas de colágeno entre las capas de células y alcancen multicapas de seis o más células. ⁽³⁹⁾

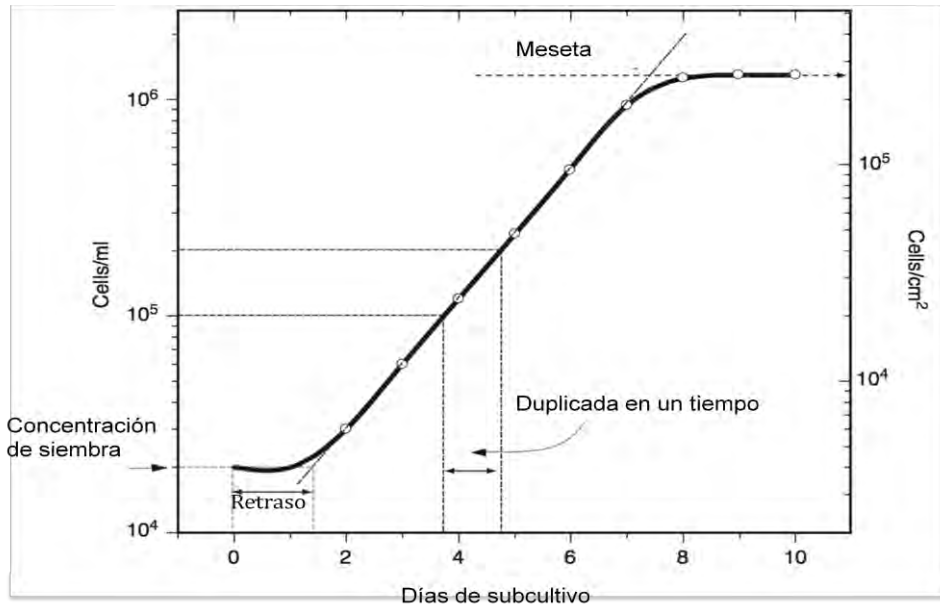


Figura 7. Curva de crecimiento. Se observa el aumento de la concentración de células (eje de la izquierda) y la densidad de células (eje de la derecha) después del subcultivo. La parte recta de la curva representa la fase exponencial en la cual se obtiene el tiempo de duplicación de la población (TDP). El tiempo en la intersección de la línea extrapolada de la fase exponencial con la concentración de la siembra es el tiempo de retraso, y la densidad de saturación se encuentra en la meseta (al menos tres puntos lineales sin un aumento de la concentración de células) en el extremo superior de la curva. Tomado de (40).

3.8.4 Medición de la proliferación celular

Periodo	Definición	Medición
Curva de crecimiento	Gráfica del número de células en función del tiempo de subcultivo	Recuento de células (por tratamiento con tripsina, si es necesario) por contador electrónico o hemocitómetro
Tiempo de duplicación de la población	Tiempo en que la población en cultivo se duplica. Producto de la	Los recuentos de células durante la fase exponencial de la

	división celular, la muerte celular y las células que no se dividen.	curva de crecimiento. Ensayo de MTT de células en crecimiento exponencial.
Tiempo del ciclo celular	Tiempo de un punto del ciclo celular hasta que la célula vuelve a alcanzar el mismo punto.	Porcentaje de mitosis marcados con timidina- ³ H] después de 30-min de incubación y se tomaron durante un lapso de 24-48h La citometría de flujo con células marcadas con BrdU y teñidas con anti-BrdU
Análisis del ciclo celular	Determinación de la duración de cada fase del ciclo celular	Porcentaje de mitosis Citometría de flujo con células marcadas con BrdU
Incorporación de timidina triteada.	Determinación de la cantidad de timidina triteada incorporada al DNA	Recuento de centelleo de las muestras solubilizadas
Fracción de crecimiento	Porcentaje de células capaces de entrar en ciclo celular	Marcaje prolongado (24-48h) con timidina- ³ H], o tinción con anticuerpo a células a las que incorporaron BrdU durante un periodo prolongado

Índice mitótico	Porcentaje de células en mitosis	Contar el porcentaje de la población total en mitosis
Índice de división	Porcentaje de células en cualquier momento del ciclo celular	Teñir con anticuerpos para PCNA o Ki67
Índice de viabilidad	Porcentaje de células excluyendo las células viables teñidas con Azul de tripano, Negro naftaleno o eritrosina.	La observación microscópica de las células teñidas no fijadas con tinción de viabilidad
Eficiencia de la clonación	Número de células capaces de formar clones (colonias derivadas de una célula) después de subcultivo a una densidad celular baja	Tripsinizar y sacar las células de la placa como células individuales Contar las colonias, por encima de un umbral definido (generalmente 50 células), después de 10 días, 3 semanas

(40)

3.9 Apoptosis

Las células en un organismo forman una comunidad organizada, donde el número de células está estrictamente regulado; si una célula ya no es requerida esta muere o se “suicida” por apoptosis. Este fenómeno es bastante común tanto en organismos en desarrollo como en adultos y es un proceso necesario para la homeostasis y la morfogénesis.

La apoptosis a diferencia de la necrosis es un proceso ordenado, la célula muere “limpiamente” sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el DNA se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada.

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva (procaspasas) las cuales son activadas por un corte proteolítico, estas a su vez activan otras procaspasas en una cascada de amplificación. (Figura 8).

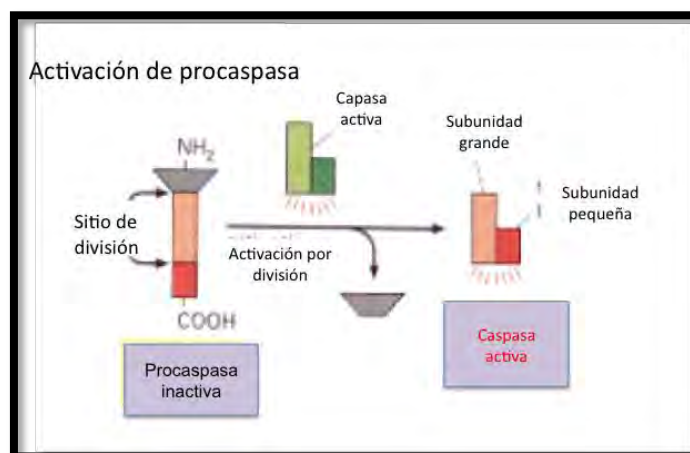


Figura 8. Activación de procaspasa. Son activadas por un corte proteolítico tomado y modificado de (1)

Las caspasas cortan proteínas clave en la célula como la laminina que al romperse desintegra la membrana nuclear y degradan a la enzima que inactiva a la DNAsa ocasionando la degradación del material genético.

La entrada a la apoptosis al igual que la entrada a un nuevo ciclo celular es un “todo o nada”, donde una célula que ha iniciado este proceso no puede detenerse. El mecanismo propuesto de la activación de estas procaspasas gira alrededor de proteínas adaptadoras que juntan múltiples caspasas en un agregado, en este agregado las caspasas se activan entre si mediante un pequeña actividad de proteasa basal; en unos momentos esta caspasas activas desencadenan la cascada de activación amplificando la señal de muerte.

Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles: en algunas células se puede inducir apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana, el cual se une a un receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula blanco, el agregado de Fas y su ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8, caspasa iniciadora clave en la vía de los receptores muerte. (Figura 9)

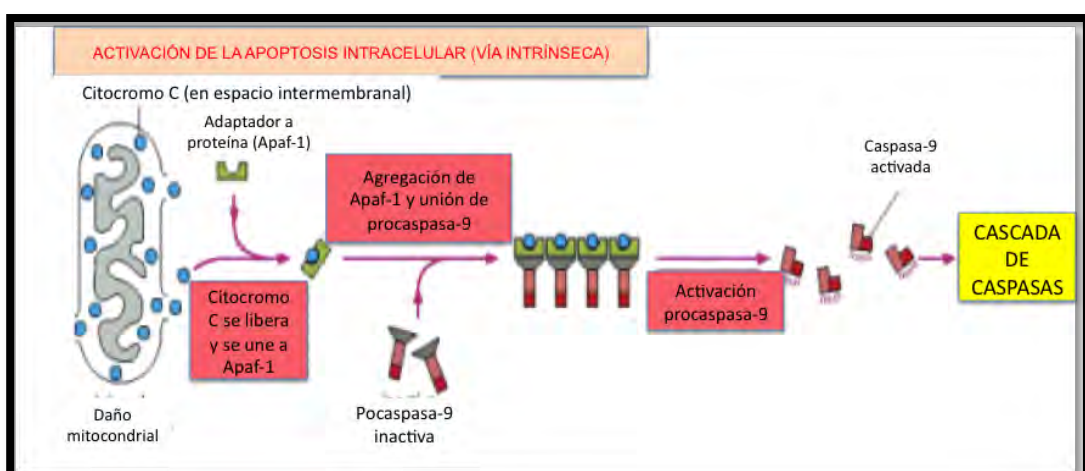


Figura 9. Esquema de la activación de la apoptosis por vía extrínseca.

La célula también en respuesta a daño o estrés puede activar la apoptosis, por ejemplo un daño severo al DNA puede inducirla mediante el gen p53, el cual activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria, en el citoplasma se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa 9 (Figura 10).⁽¹⁾

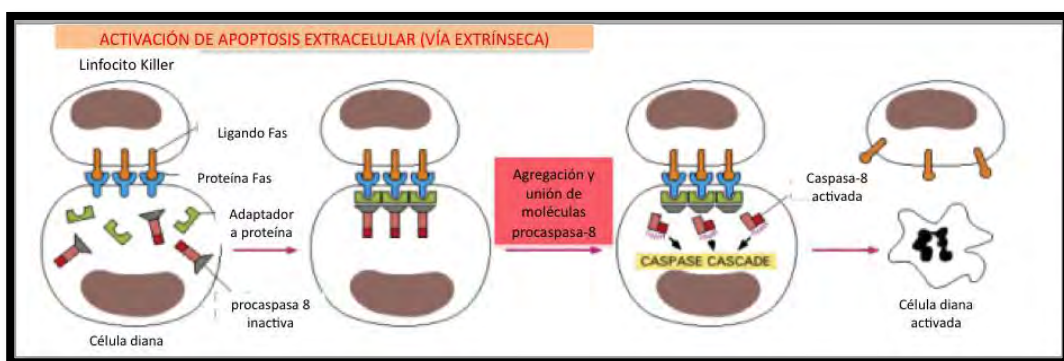


Figura 10. Esquema de la activación de la apoptosis por vía intrínseca.

3.10 Citotoxicidad

La citotoxicidad es un evento complejo *in vivo* donde puede haber daño celular directo. Las definiciones de citotoxicidad varían dependiendo de la naturaleza del estudio y si las células mueren o son alteradas fenotípicamente [Kroemer et al., 2009]. Las células pueden morir por necrosis, apoptosis, autodigestión (autofagia) o puede detenerse su proliferación (citostasis).⁽⁴⁰⁾

3.10.1 Citotoxicidad celular

La citotoxicidad celular es un mecanismo que ejercen determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario y que consiste en la capacidad para interactuar con otras células y destruirlas.

Este mecanismo interviene en la defensa frente a infecciones víricas y células neoplásicas, así como en la destrucción de células alogénicas en trasplante de órganos. Las células involucradas en este mecanismo son: los linfocitos T citotóxicos, las células natural killer (NK) y los macrófagos. La función citotóxica requiere de una actividad metabólica activa de la célula a temperatura fisiológica y necesita la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y la integridad del citoesqueleto. ⁽⁴⁰⁾

Como consecuencia de la interacción con las células citotóxicas hay una permeabilización de la membrana plasmática causada por elementos moleculares presentes en los gránulos de secreción, lo cual altera el intercambio iónico y permite la salida de macromoléculas al exterior, alterando el equilibrio osmótico. En los gránulos de secreción se encuentran las enzimas granulares y las perforinas. Los linfocitos poseen gránulos de secreción. Las enzimas detectadas en los gránulos son: carboxipeptidasas, catepsina D, aril-sulfatasa y beta-glucuronidasa. Las perforinas son proteínas que promueven la formación de poros en la célula blanco, induciendo su lisis. ⁽⁴⁰⁾

3.10.2 Citotoxicidad por agentes tóxicos

La determinación de la citotoxicidad se ha enfocado evaluando el crecimiento o la supervivencia celular. El crecimiento celular se toma generalmente como el potencial de proliferación de las células, que puede medirse por crecimiento clonal, el cambio en el tamaño de la población mediante la obtención de una curva de crecimiento; un cambio en la masa celular (proteína total o DNA) o un aumento en la actividad metabólica (p.e. ADN, ARN, o la síntesis de proteínas; reducción de Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico o MTT).

Muchas sustancias no tóxicas se vuelven tóxicas después de haber sido metabolizadas por el hígado. Las sustancias que son tóxicas *in vitro*

pueden ser metabolizadas por el hígado, y dejar de serlo. Por lo tanto es preferible demostrar que las toxinas potenciales llegan a las células de la misma forma tanto *in vitro* como *in vivo* o cuales son las variaciones ⁽⁴⁰⁾.

Una respuesta tóxica *in vitro* puede ser medida por los cambios en la supervivencia celular o el metabolismo, considerando que el principal problema *in vivo* puede ser una respuesta del tejido (por ejemplo, una reacción inflamatoria, la fibrosis, insuficiencia renal) o una respuesta sistémica (por ejemplo, fiebre, dilatación vascular). Para que los ensayos *in vitro* sean más eficaces, los modelos de estas respuestas deben ser contruidos utilizando cultivos organotípicos reensamblado de varios tipos de células diferentes y mantenerse en el medio hormonal apropiado. ⁽⁴⁰⁾

3.10.3 Pruebas de citotoxicidad

Existen cinco clases principales de ensayos *in vitro*:

1. Viabilidad.

Los ensayos de viabilidad se utilizan para medir la proporción de las células viables después de procedimientos traumáticos como desagregación primaria, separación celular o criopreservación. La mayoría de los ensayos de viabilidad se basan en una ruptura de la integridad de membrana que se mide al incorporar un colorante impermeable para las células, como el azul tripano, eritrosina, naftaleno negro, yoduro de propidio, entre otros.

2. Supervivencia.

Estas pruebas se utilizan para demostrar la sobrevivencia a largo plazo en lugar de la toxicidad a corto plazo. La supervivencia implica la capacidad proliferativa de varias generaciones de células (5-10 generaciones o más).

3. Metabólico.

Los ensayos, por lo general, de microtitulación pueden medir la respuesta metabólica (por ejemplo, la actividad de deshidrogenasas; la síntesis de DNA, RNA, o de proteínas) en el momento de la exposición. La supervivencia en estos casos se define como la retención de la capacidad metabólica o proliferativa de la población de células algún tiempo después de la eliminación de la influencia tóxica.

4. Genotoxicidad y transformación.

Genotoxicidad implica daño al DNA (mutagénesis) que conduce a la alteración permanente en la expresión génica (transformación) que puede conducir a la malignidad (carcinogénesis).

5. Irritación.

Una respuesta análoga a la inflamación, alergia, o irritación *in vivo*, aún difíciles de modelar *in vitro*, pero el ensayo puede ser posible por la liberación de citocinas realizados en cultivos organotípicos.⁽⁴⁰⁾

3.10.4 Ensayo de MTT

El ensayo de MTT se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.

El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. El producto de la reacción, el formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es

cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

El período de exposición de la sustancia de ensayo varia, puede ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h. La densidad óptica (D.O) debe medirla al concluir el tiempo de incubación 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia.⁽⁴⁰⁾

4. ANTECEDENTES

4.1 Proliferación celular y Ciclosporina A

La Ciclosporina A es un fármaco inmunosupresor usado en pacientes trasplantados para evitar el rechazo del injerto y para el tratamiento de las diversas enfermedades inmunológicas. Uno de los efectos secundarios de la terapia con Ciclosporina A es el agrandamiento gingival, que se caracteriza básicamente por la acumulación de matriz extracelular dentro de los tejidos conectivos y la proliferación exacerbada de fibroblastos gingivales humanos (FGH).

Se realizó un estudio para investigar los cambios en el proteoma de los FGH inducido por el tratamiento con Ciclosporina A mediante un análisis proteómico, que se emplea para detectar posibles cambios a nivel proteínico en los FGH después del tratamiento con Ciclosporina A. Los resultados mostraron que la Ciclosporina A promueve la proliferación de FGH sobre 0,1-10mM en la dosis y de forma dependiente del tiempo. La Ciclosporina A aumentó la viabilidad de los FGH aproximadamente 120-150% en comparación con el control y mostró la tasa de supervivencia máxima es de 10 mM. Estos resultados demuestran que la Ciclosporina A tiene un efecto estimulante sobre los FGH, lo cual demuestra que la Ciclosporina A aumenta la proliferación de pro-fibroblastos gingivales humanos *in vitro*.⁽⁴¹⁾

Estudios demuestran que la Ciclosporina A estimula significativamente la proliferación celular dependiente de la dosis.⁽⁴²⁾

4.2 Cambios en los fibroblastos y en la matriz extracelular

El agrandamiento gingival tiene los mismos signos clínicos que el edema local. Estudios ultraestructurales muestran que el aumento en las dimensiones de la encía se debe principalmente a la sobreproducción de proteoglicanos y glicosaminoglicanos, principalmente por los fibroblastos. Este hecho puede ser el resultado de una mayor liberación de histamina

por los mastocitos. Estudios in vitro muestran que fibroblastos derivados de pacientes tratados con Ciclosporina A tienen niveles más altos de glicosaminoglicanos.⁽²⁵⁾ Estudios clínicos en animales muestran diferencias en el grado de agrandamiento gingival con el uso de ciclosporina y tacrolimus.⁽⁴³⁾ El tacrolimus no promueve agrandamiento gingival a corto plazo pero después de 180 y 240 días de exposición se pudo observar un agrandamiento gingival asociado con un aumento significativo del epitelio gingival y del tejido conjuntivo.⁽⁴⁴⁾

La inflamación gingival favorece una reducción de la actividad fagocítica de los fibroblastos en el tejido tratado con Ciclosporina A, lo que podría explicar el aumento de volumen como resultado de más tejido sintetizado.
(45, 46)

Se observa un exceso de la matriz extracelular conectiva a consecuencia de un incremento en la proliferación de fibroblastos con mayor capacidad de síntesis y secreción o simplemente un exceso de producción de glicosaminoglicanos (GAG).⁽⁴⁵⁾

Hay estudios de muestras de agrandamiento gingival causado por Ciclosporina A y factores de crecimiento TGF que comprueban un aumento en la concentración de GAG y matriz no colagénica al compararlos con muestras de encía sana.^(14, 47)

En un estudio en el que se analizó la expresión génica de esta matriz extracelular en muestras de AG por ciclosporina, se comprobó por técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), un aumento de la transcripción de perlecan al compararla con la de un grupo control de encía sin AG. La función de esta macromolécula estaría en las interacciones con otros proteoglicanos mediante la intervención de factores de crecimiento con influencia en la síntesis de fibras de colágena.
(48, 49)

En el desarrollo del AG podrían intervenir proteínas ácidas ricas en cisteína a nivel de la matriz extracelular, según se comprobó en un estudio in vitro con fibroblastos sometidos a la acción de ciclosporina,

tacrolimus y a su vehículo por la técnica de RTPCR. La presencia de estas glicoproteínas específicas sólo se produjo en los cultivos tratados con ciclosporina que inducen AG, y no en aquéllos sometidos a tacrolimus o a su vehículo. Se puede considerar que este fármaco inmunosupresor – tacrolimus- estabilizaría la matriz extracelular sin provocar sobrecrecimiento gingival por falta de transcripción de estas proteínas acídicas.⁽⁵⁰⁾

4.3 Citotoxicidad y Ciclosporina A

La ciclosporina A (CsA) tiene efectos sobre el crecimiento excesivo de fibroblastos gingivales humanos *in vitro*.

Con base en un estudio realizado para determinar la correlación con la vía de señal apoptótica inducida por CsA en el sobrecrecimiento de fibroblastos gingivales humanos, se evaluó la viabilidad celular por el método de la reducción del 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 - difeniltetrazolio (MTT). La viabilidad celular aumentó gradualmente de una manera dependiente de la dosis cuando los fibroblastos gingivales humanos fueron expuestos a CsA 0.1-10 mM durante 24h. La supervivencia máxima se observó a 10 mM de CsA , que promovió la viabilidad de los fibroblastos de un modo dosis-tiempo- dependiente. Para investigar su efecto sobre la proliferación celular como una función en el crecimiento excesivo de fibroblastos gingivales humanos por CsA, se realizó un ensayo de incorporación de BrdU para examinar un aumento de la proliferación después del tratamiento con CsA.

Los fibroblastos humanos tratados con Ciclosporina A mostraron una sobreexpresión de peroxirredoxina 1, esta proteína causa una reducción de especies reactivas del oxígeno promoviendo la viabilidad celular. Además, el tratamiento con Ciclosporina A promovió un aumento en la proteína antiapoptótica Bcl-2 y una disminución en la proteína apoptótica Bax.⁽⁵¹⁾ Sin embargo, el tratamiento con Ciclosporina A no tiene efecto en

la proliferación.⁽⁵²⁾ Estos hallazgos sugieren que la disminución de la apoptosis desempeña un papel más importante que el aumento de la proliferación celular inducida por Ciclosporina A.

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de fármacos inmunosupresores en México ha ido en aumento debido a la alta incidencia de pacientes que necesitan trasplantes. Uno de los efectos secundarios de los tratamientos con inmunosupresores como las Ciclosporina A es el desarrollo de agrandamiento gingival. El primer paso para conocer los efectos celulares y moleculares que la ciclosporina A posee sobre fibroblastos gingivales fue implementar un modelo in vitro. Este trabajo permitirá conocer como se afecta la tasa de recambio de fibroblastos utilizando cultivos primarios de fibroblastos gingivales. Al mismo tiempo y para generar cultivos crónicos a una dosis no tóxica del medicamento, se realizó una curva dosis-respuesta.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis nula 1 (H_0) La tasa de división celular es mayor en los fibroblastos expuestos a Ciclosporina A *in vitro*.

Hipótesis alterna 1 (H_1) La tasa de división celular en los fibroblastos sanos y en los fibroblastos expuestos a Ciclosporina A *in vitro* no difiere.

Hipótesis nula 2 (H_0) El grado de citotoxicidad de la Ciclosporina A sobre los fibroblastos gingivales, depende de la dosis.

Hipótesis alterna 2 (H_1) El grado de citotoxicidad de la Ciclosporina A sobre los fibroblastos gingivales, es independiente de la dosis.

7. OBJETIVOS

- 1) Generar dos líneas de fibroblastos gingivales humanos, derivadas de biopsias, una de ellas de un varón tratado con Ciclosporina A y la otra de un varón sano.
- 2) Conocer la tasa de proliferación de las líneas de fibroblastos gingivales humanos, mantenidas en condiciones estándares de cultivo
- 3) Conocer la dosis de Ciclosporina A necesaria para mantener cultivos de fibroblastos de manera crónica.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Generación de líneas celulares a partir de biopsias de fibroblastos gingivales humanos

Dos individuos varones aceptaron participar permitiendo que se les tomara una biopsia de su encía para este estudio de la cual se derivaron fibroblastos gingivales, como se describirá a continuación.

Cada biopsia se enjuagó un par de veces en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con una mezcla de antibióticos y un antimicótico un par de veces y se fragmentó con un bisturí hoja # 22 en porciones de aproximadamente 1 mm³ sobre una caja de petri. En seguida, se tomó el contenido de la caja de petri y se centrifugó a 1500 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de solución de colagenasa IV al 0.25% (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo DMEM. Después, se incubó en un baño con agitación constante a una temperatura de 37°C por dos horas, durante las cuales cada 15 minutos se agitó la muestra en un agitador mecánico por 30 segundos. Transcurridas las dos horas se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores y el botón celular obtenido se resuspendió en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina y la mezcla de antibióticos y antimicótico, para posteriormente sembrarse en una botella de cultivo de 75 cm² (T75, Corning, NY, USA). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (NuairTM) a 37°C y una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire (Figura 11).

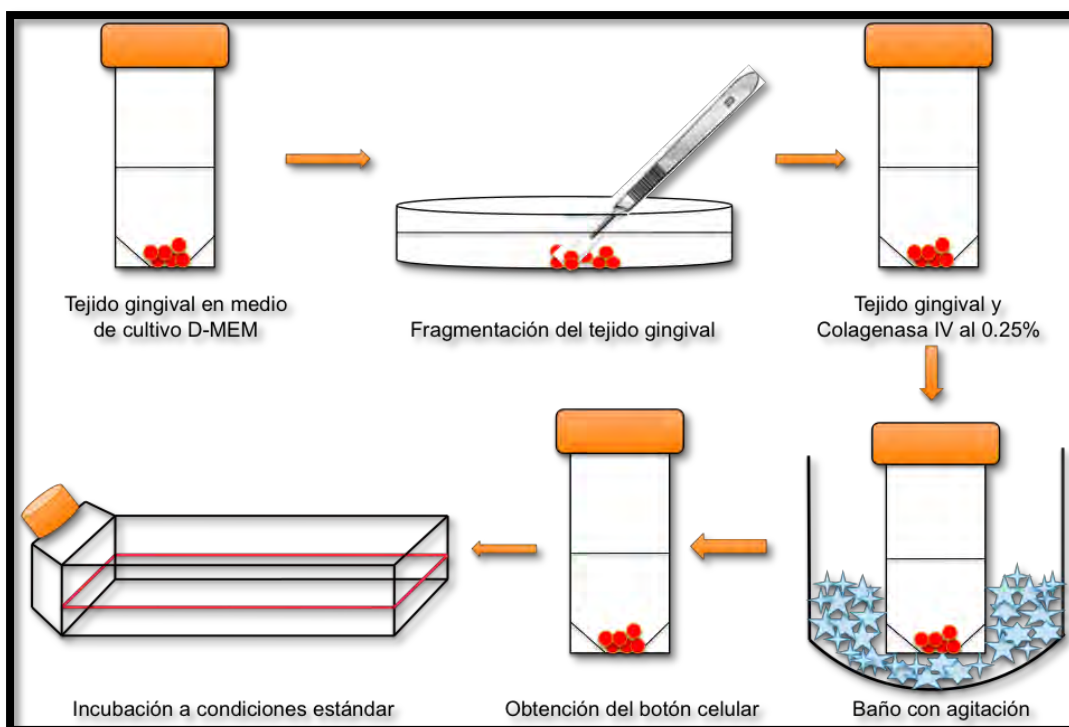


Figura 11. Esquema que muestra la obtención de fibroblastos gingivales humanos por método enzimático rápido. Modificado de (40)

La línea celular derivada de un donador sano se denominó Cntrl_001 y la que se derivó de un paciente tratado con ciclosporina se GOCyc1.

Cuando los cultivos llegaron a confluencia (Figura 12B), las células fueron subcultivadas. El medio se retiró del frasco T-25 y se enjuagó con verseno (ácido etilen-diamino-tetracético; EDTA y solución amortiguadora de fosfatos) por 30 segundos. Posteriormente, se agregó la solución de tripsina al 0.25% en verseno y se enjuagó con ésta por lo menos 30 segundos. Posteriormente la suspensión de células se colocó en un tubo con DMEM y se centrifugó a 1500 rpm por cinco minutos. Subsecuentemente, se procedió a tomar una alícuota para contar el número de células mediante un hemocitómetro (ver más adelante) y se sembró el número deseado dependiendo del experimento.

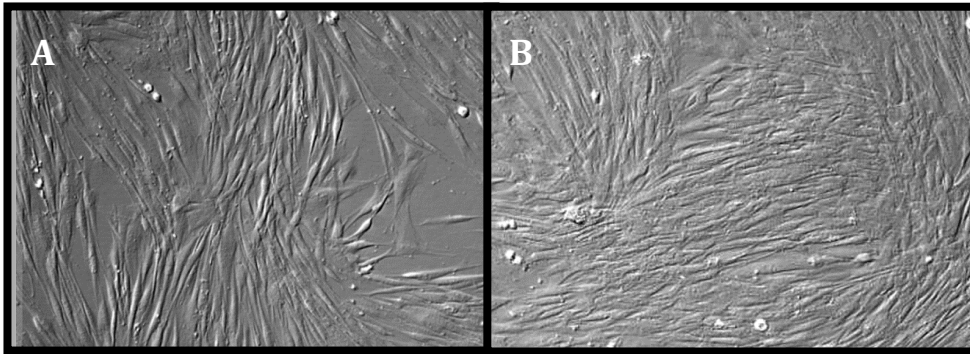


Fig. 12. fotomicrografía a 200x de cultivo de fibroblastos. A. Fibroblastos en semi- confluencia. B. Fibroblastos en confluencia

Las líneas celulares se utilizaron para realizar los experimentos y también fueron criopreservadas (un millón de células en 1ml de 5% de dimetil sulfóxido; DMSO y 95% de SFB) en un contenedor de nitrógeno líquido (Figura 13).

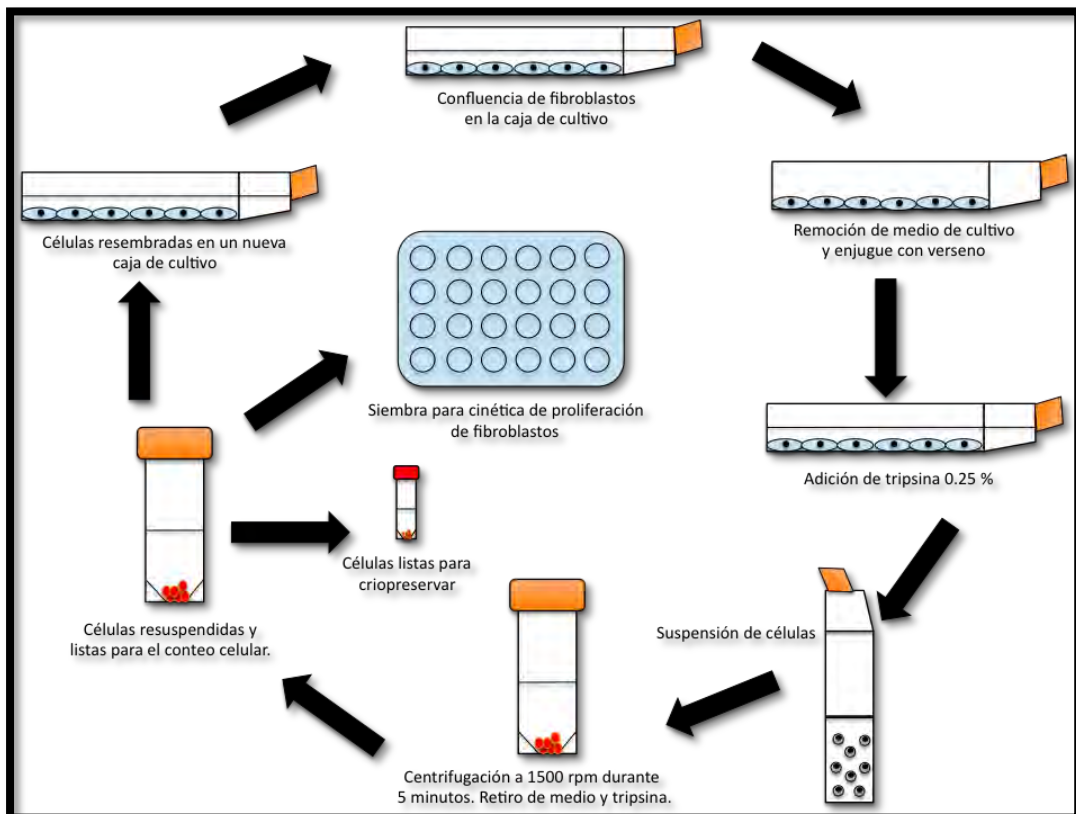


Figura 13. Esquematación de subcultivo y criopreservación de células. Mediante tripsinización se obtuvo el botón celular, se resuspendieron con medio D-MEM y se contaron mediante un hemocitómetro para realizar la siembra de la proliferación de fibroblastos con la cantidad de células deseada. Parte de las células restantes se subcultivaron en una caja T-75 y cierto número de células fueron criopreservadas. Modificado de (40)

8.2 Conteo celular utilizando un Hemocitómetro

El hemocitómetro es un instrumento utilizado en cultivo celular para realizar conteo de células, consta de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas en las cuales hay una cuadrícula donde se añade la suspensión de células (10 μ l) para después ser contadas a través de un microscopio (Olympus IX70, Olympus American Inc. USA).

Para realizar el conteo celular, se retiró el medio, se enjuagaron las células con verseno y se despegaron con solución de tripsina, se añadió medio y la suspensión de células fue colocada en un tubo eppendorf para ser centrifugada a 1500 rpm durante 2 minutos. Se retiró el medio y la tripsina para obtener el botón celular y se añadió PBS, se resuspendieron perfectamente las células. Posteriormente se tomaron 20 μ L de la suspensión de células y se colocaron en un tubo con 20 μ L de azul de tripano (GIBCO), se mezcló perfectamente y se colocaron 10 μ L en cada lado del hemocitómetro (Figura 14).

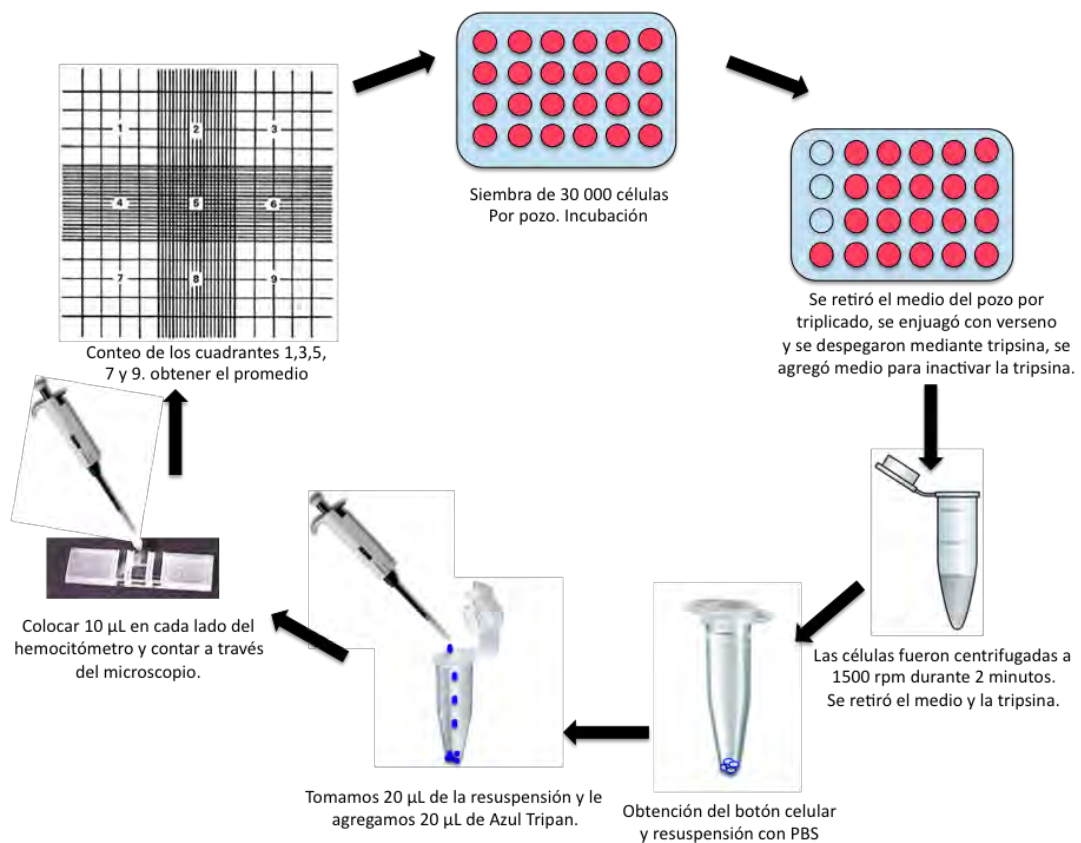


Figura 14. Representación esquemática del conteo celular en el experimento de proliferación de fibroblastos gingivales. Después del tiempo indicado, se despegaron las células mediante tripsinización, se centrifugaron para la obtención del botón celular, se diluyeron en PBS, se tomó una parte que fue mezclada con azul de tripan para ser colocada en hemocitómetro y realizar el conteo.

El hemocitómetro posee una cuadrícula. Esta cuadrícula consta de 9 cuadros, cada uno con un área de 1 mm^2 , los cuadros de las esquinas se dividen en 16 cuadrados, y el cuadrado central está dividido en 25 cuadrados, los cuales a su vez están divididos en 16 cuadrados pequeños. El cálculo se realizó obteniendo el promedio de los 5 cuadrantes contados por 10 que es el factor de la cámara, por el factor de dilución que en este caso es 2 porque se diluyeron las células en de Azul Tripano.

Este número es equivalente al número de células por μL . Se observó al microscopio y se realizó el conteo de cada cuadrante. Se calculó el

promedio de células de los cinco cuadrantes y se obtuvieron las cuantificaciones para observar la proliferación de los fibroblastos. (Figura 15)

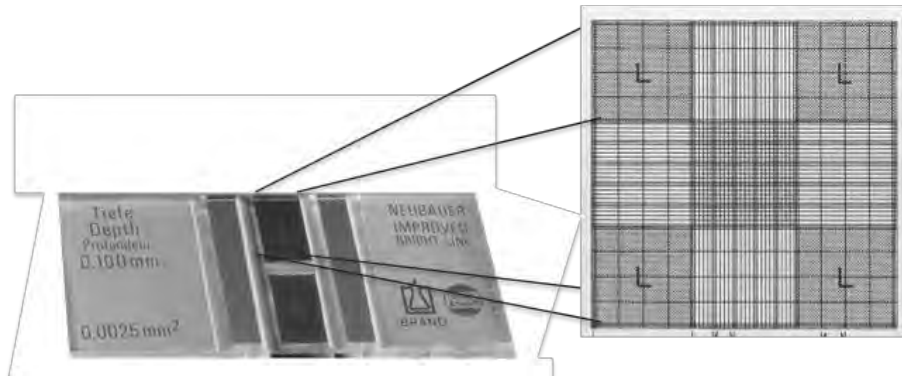


Figura 15. Se realiza el conteo de los cuadrantes de las esquinas (L) y del cuadrado central y se obtiene el promedio, el cual se promedia con la otra zona del hemocitómetro, se multiplica por 10 que es el factor de la cámara y por 2 que es el factor de dilución.

8.3 Cinética de proliferación de fibroblastos

Para la cinética de proliferación, tanto los fibroblastos de GOCyc_001 como los de Cntrl_001 se sembraron a una concentración de 30,000 fibroblastos/pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Corning, New York, NY). Los cultivos fueron mantenidos en un incubador bajo condiciones estándares. Para conocer el grado de proliferación celular, se realizaron conteos de cada una de las líneas utilizando el hemocitómetro a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas. Cada punto del experimento fue realizado por triplicado (Figura 16).

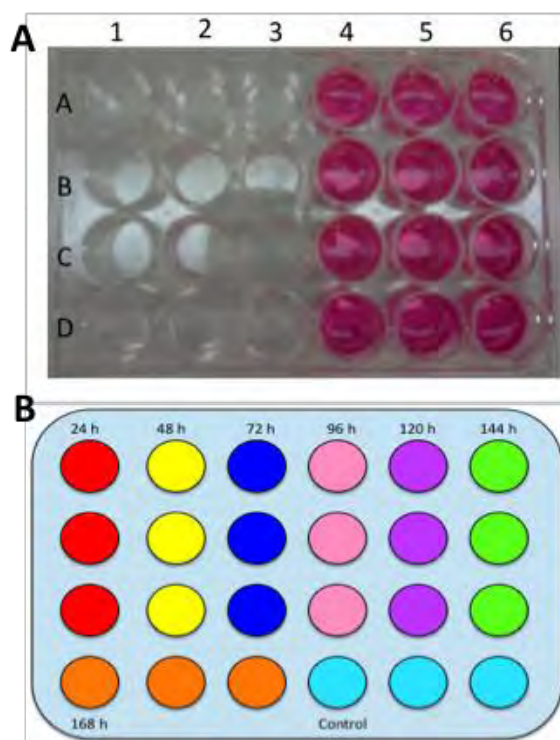


Figura16. A) Patrón de siembra de las células para determinar la cinética de proliferación de fibroblastos y B) representación esquemática de los cultivos de fibroblastos gingivales y el tiempo al que se despegaron y contaron los mismos.

8.4 Ensayo de viabilidad: Dosis - respuesta a Ciclosporina A

Con el propósito de conocer la dosis para generar cultivos tratados en condiciones crónicas expuestos a Ciclosporina A, se documentó el efecto citotóxico. Se sembraron 10,000 fibroblastos por pozo en placas de 96 pozos (Conring), (Figura 17) y se incubaron con Ciclosporina A (Gel pharma, Zapopan, Jalisco, México. Presentación de 100mg/ml) en dosis crecientes (100 ng/ml (8.3×10^{-11} M), 250 ng/ml (2.07×10^{-10} M), 500 ng/ml (4.1×10^{-10} M), y 2000 ng/ml (1.6×10^{-9} M) (42). Este efecto fue evaluado a las 12, 24, 36 y 48h (Figura 18). Utilizando el método de reducción del MTT, para lo cual se agregaron 100 μ l de una solución de 0.5% de MTT en PBS y se incubaron por dos horas en condiciones estándares. Se eliminó el MTT y se adicionaron 100 μ l de DMSO para disolver los cristales de

formazán. La placa se leyó a 560nm en un lector de placas de ELISA (Figura 19).

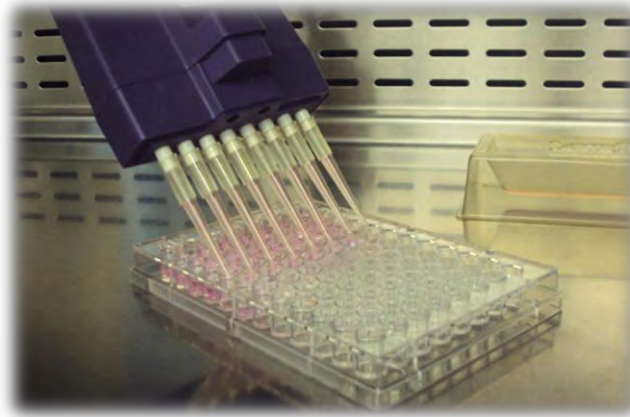


Figura 17. Siembra de 10,000 fibroblastos por pozo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 ng/ml											
B	100 ng/ml											
C	250 ng/ml	12h			24h			36h			48h	
D	500 ng/ml											
E	2000 ng/ml											
F	0 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml	500 ng/ml	2000 ng/ml							
G			0h									
H												

Figura 18. Representación esquemática de las dosis de ciclosporina A que se agregó a cada pozo y el tiempo de incubación.

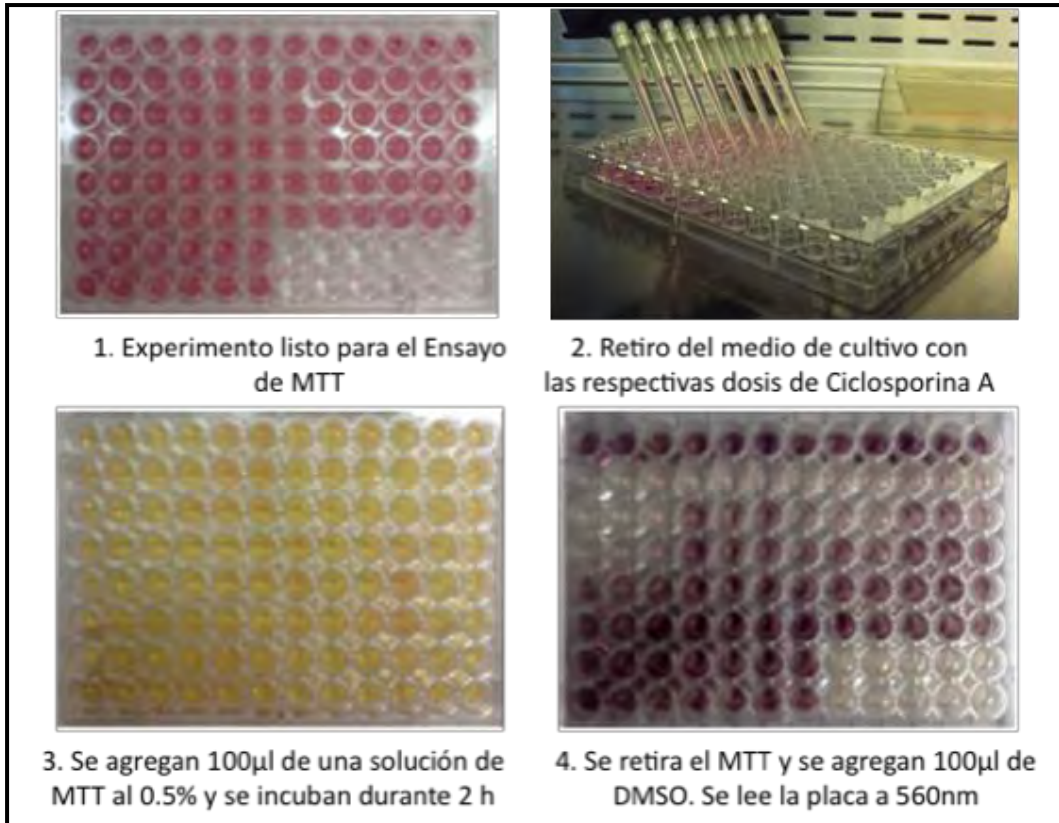


Figura 19. Procedimiento para ensayo de MTT. 1) Se sembraron fibroblastos y se expusieron a las diferentes dosis y tiempo con ciclosporina A; 2) Se retiró el medio de cultivo; 3) Se agregó MTT al 0.5% 4) Se retira el MTT y se le agregó DMSO para solubilizar el formazán

Todos los reactivos no especificados son de la compañía Sigma-Aldrich.

8.5 Análisis Estadístico

Para realizar los análisis estadísticos se compararon dos grupos de cultivos de líneas celulares. El grupo 1 corresponde a los cultivos de fibroblastos gingivales GOCyc_001 derivados de encía de un paciente tratado con CsA. El grupo 2 corresponde a los cultivos de fibroblastos gingivales Cntrl_001 derivados de paladar de un individuo sano. Para la curva de crecimiento se cuantificó el número de células cada 24 horas por 7 días. Esta variable de tiempo se consideró para hacer un análisis de varianza (ANOVA) entre los grupos a cada uno los tiempos. La prueba

post hoc utilizada es la de Tukey, que considera varianzas semejantes entre las condiciones de los grupos. La probabilidad considerada para postular una diferencia fue de $p > 0.05$. La prueba post hoc nos permite conocer entre que grupos y condiciones se presenta la diferencia.

Para determinar citotoxicidad de la Ciclosporina A también utilizaron pruebas de ANOVA donde se compararon los dos grupos de cultivos celulares (Cntrl_001 y GOCyc_001), con las 5 dosis de Ciclosporina A (0, 100, 250, 500 y 2000 ng/mL) y los 4 tiempos de incubación con Ciclosporina A (12, 24, 36 y 48 horas). En este caso también se consideró una $p > 0.05$ y se utilizó la prueba post hoc de Tukey.

9. RESULTADOS

9.1 Morfología de líneas celulares generadas a partir de biopsias de fibroblastos gingivales humanos

La morfología de los fibroblastos de ambas líneas celulares se documentó fotográficamente durante siete días. Al primer día, los fibroblastos de ambas líneas celulares presentaron una forma alargada, de huso y se observaba perfectamente su núcleo celular (Figura 20 y 21A). Al quinto día de cultivo se observó que los fibroblastos Cntrl_001 formaban un entramado donde la mayoría de los fibroblastos corren en la misma dirección (Figura 20D). Por el contrario, los fibroblastos de la línea GOCyc_001 no presentaban ese mismo orden, formaron un entramado muy denso migrando en diferentes direcciones (Figura 21C). Para el séptimo día, los fibroblastos de la línea Cntrl_001 formaron una monocapa muy densa en la que se distinguieron los fibroblastos muy ordenados. Además, algunos de ellos empezaron a morir porque su morfología era de una típica célula apoptótica, células redondas y más oscuras (Figura 20F). En cambio, los fibroblastos de la línea celular GOCyc_001 después de siete días de cultivo, siguieron mostrando una desorganización, y el entramado que formaron corresponde a de varias capas de células. Además, se observaron pocas células con características apoptóticas (Figura 21F).

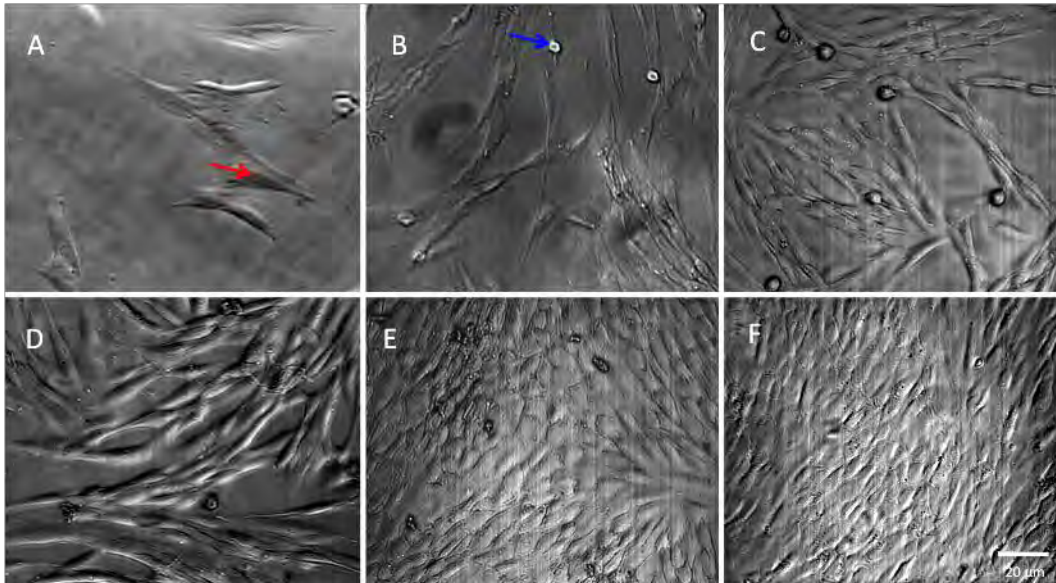


Figura 20. Fotografía de fibroblastos Cntrl_001 en cinética de crecimiento tomadas en microscopio invertido a 200x con una escala de 20µm. A) Pocos fibroblastos, forma alargada con núcleo bien definido(flecha roja); B) Mayor número de fibroblastos, se observan células en división (flecha azul); C) los fibroblastos se encuentran en semiconfluencia y forman un entramado que migran en una misma dirección; D) Aun existen espacios entre las células y se observa como las células migran en la misma dirección; E)Fibroblastos en confluencia; F) Fibroblastos forman un entramado denso y dejan de crecer.

En el primer día se observaron pocos fibroblastos adheridos a la superficie, tienen forma ahusada con núcleo bien definido (Figura 20A). En el segundo día se observaba un crecimiento en el número de fibroblastos y con células en división (Figura 20B). En el tercer día se observaba una semiconfluencia de los fibroblastos y siguieron existiendo células en división, presentan una forma más alargada con respecto a los días anteriores (Figura 20C). En el cuarto día seguía existiendo semiconfluencia de las células aunque con mayor cantidad en comparación con el día anterior. Se observó cómo las células corren en la misma dirección (Figura 20D). En el sexto día se observaron los fibroblastos en confluencia, de forma alargada pero se restringió su extensión debido a que el espacio ya no es suficiente (Figura 20E). En el día 7 se pudieron observar características similares al día 6 debido a la inhibición por contacto que sufrieron las células. Se empezaron a observar algunas células muertas (Figura 20F).

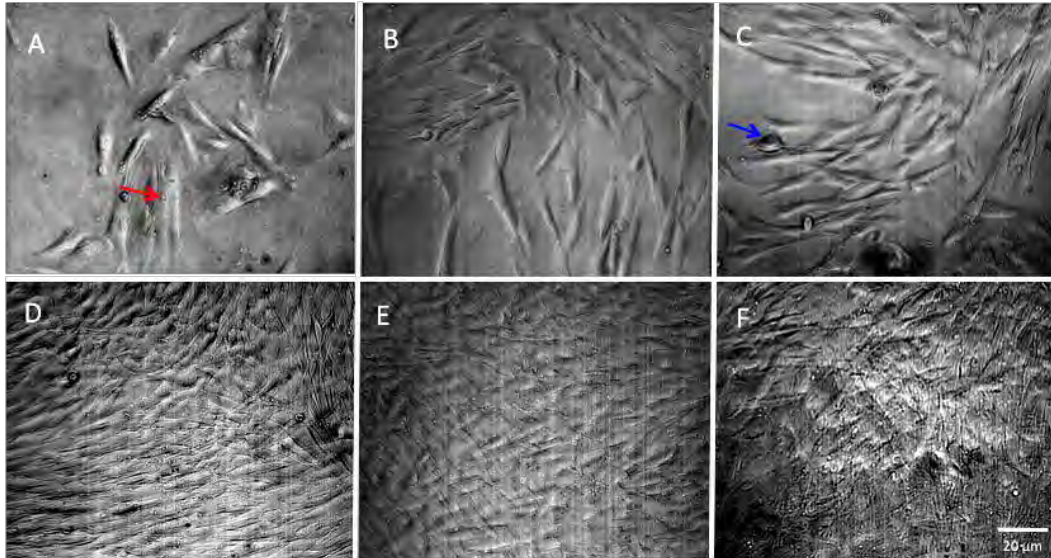


Figura 21. Fotografías de fibroblastos GOCyc_001 tomadas en microscopio invertido 200x con una escala de 20 μ m. A) los fibroblastos tienen forma de huso y se diferencia su núcleo (flecha roja); B) los fibroblastos conservan su forma ausada con núcleo bien definido; C) Los fibroblastos migran en diferentes direcciones y hay células en división (flecha azul) D) los fibroblastos forman entramado denso; E) los fibroblastos comienzan a crecer unos sobre otros y no se puede distinguir bien el núcleo; F) El entramado es aun mas denso donde los fibroblastos migran en diferentes direcciones.

En el primer día (Figura 21A) se observaron los fibroblastos adheridos al campo, de forma ahusada y con núcleo bien definido (flecha roja). En el segundo día (Figura 21B) se observó un crecimiento considerable en la cantidad de fibroblastos con respecto al día 1, los fibroblastos presentaron forma de huso con núcleo bien definido. En el tercer día (Figura 21C) se distinguió un aumento en el número de fibroblastos con respecto al día 2, comenzó a formarse un entramado donde las células corren hacia diferentes direcciones y se distinguieron células en división (flecha azul). En el cuarto día (Figura 21D) había confluencia de los fibroblastos formando un entramado denso y células en división. En el sexto día (Figura 21E) se observó que las células siguieron creciendo unas sobre otras formando un entramado donde las células iban en diferentes direcciones y en el cual ya no se distinguían los núcleos. En el día 7 se ve como los fibroblastos siguieron creciendo unos sobre otros corriendo en

diferentes direcciones de tal manera que no se distinguía su morfología característica (Figura 21F).

9.2 Tasa de proliferación de líneas celulares de fibroblastos generadas a partir de biopsias gingivales humanas

Para conocer la tasa de proliferación de los fibroblastos GOCyc_001 se cuantificó el número de fibroblastos cada 24hr durante siete días. Los resultados mostraron que los fibroblastos GOCyc_001 tienen una tasa de proliferación mayor a los Cntrl_001. En un principio, la cantidad de fibroblastos es muy parecida. Este fenómeno se presentó hasta el día tres de cultivo. A partir del día cuatro, se observó una proliferación significativamente mayor en GOCyc_001 comparado con Cntrl_001 (239,733 células y 176,266 células, respectivamente; $p < 0.05$).

En el caso del cultivo Cntrl_001 la meseta de proliferación se alcanzó al sexto día (219,200 células), mientras que para GOCyc_001 el crecimiento disminuye la tasa de proliferación pero no se estabiliza (368,266 células). El crecimiento de GOCyc_001 casi duplicó en número al de los fibroblastos del Cntrl_001 para el séptimo día ($p < 0.05$) como lo muestra la curva de crecimiento (Figura 23).

Los resultados muestran que los fibroblastos Cntrl_001 tienen un crecimiento menor al de los GOCyc_001. La cantidad de fibroblastos es muy parecida hasta el día tres. A partir del día 4 se observa una proliferación mayor. Para el Cntrl_001 la meseta se alcanzó al sexto día mientras que en el caso de GOCyc_001 el crecimiento parece también estarse estabilizando. El crecimiento de GOCyc_001 casi duplicó el número de los fibroblastos del Cntrl_001 para el séptimo día.

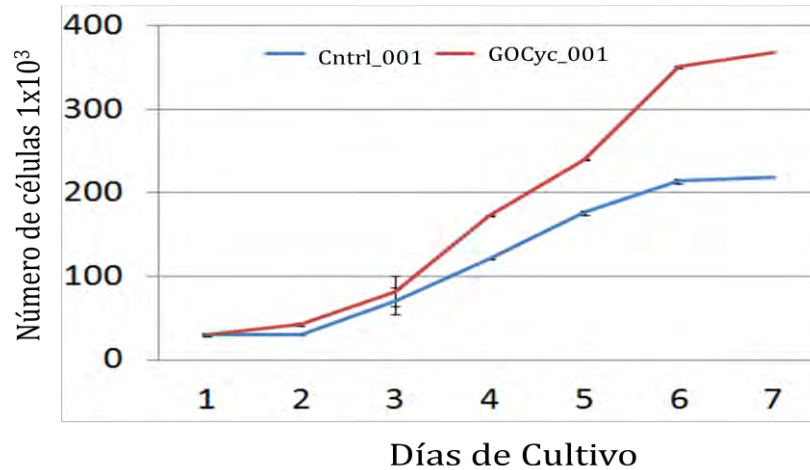


Figura 23. Gráfica de la cinética de crecimiento de los cultivos de fibroblastos de un paciente sano (Cntrl_001) y de un paciente con agrandamiento gingival (GOCyc_001). Se observa que hasta el día 3 el crecimiento es similar, pero al cuarto día hubo una proliferación de células mayor en GOCyc_001. Al sexto día de cultivo del Cntrl_001 alcanzó su meseta, mientras que el GOCyc_001 siguió proliferando.

9.3 Efecto tóxico de la Ciclosporina A en las líneas celulares

Cntrl_001 y GOCys_001.

El ensayo de viabilidad dosis-respuesta a Ciclosporina A sobre los fibroblastos Cntrl_001 nos arrojó datos representados en la gráfica representada en la Figura 24, donde se mostró que a una concentración de 100ng/ml a las 24hr, las células empezaron a disminuir su viabilidad; en la concentración de 250ng/ml después de las 12hr, las células comenzaron a reducir su viabilidad; en la concentración de 500ng/ml a las 12hr las células comenzaron a perder su viabilidad y a una concentración 2000ng/ml la viabilidad empezaron a perderse antes de las 12hr.

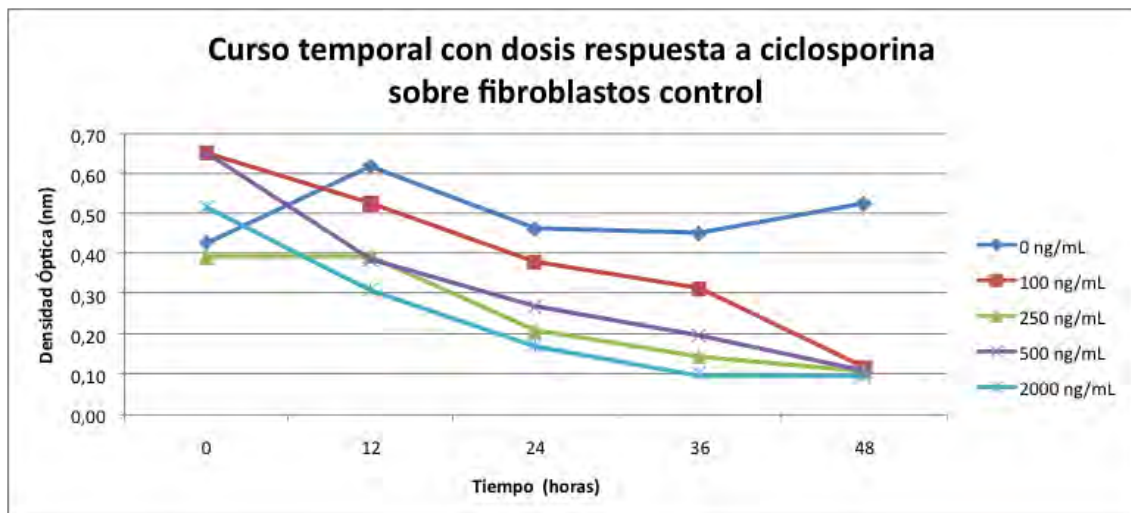


Figura 24. Gráfica del ensayo de viabilidad dosis-respuesta a Ciclosporina A en PS, donde se observa que a una concentración de 100ng/ml se a las 24hr las células empiezan a disminuir su viabilidad, mientras que a dosis mayores de 250, 500 y 2000ng/ml la viabilidad empieza a disminuir a partir de las 12hr.

El ensayo de viabilidad dosis-respuesta a Ciclosporina A sobre los fibroblastos GOCyc_001 nos arrojó datos representados en la gráfica (Figura 25) donde se mostró que a una concentración de 100ng/ml después de las 12h las células empezaron a perder su viabilidad; en la concentración de 250ng/ml después de las 12h las células comenzaron a perder su viabilidad; en la concentración de 500ng/ml después de las 12h las células comenzaron a perder su viabilidad y a una concentración 2000ng/ml la viabilidad empezó a perderse antes de las 12h.

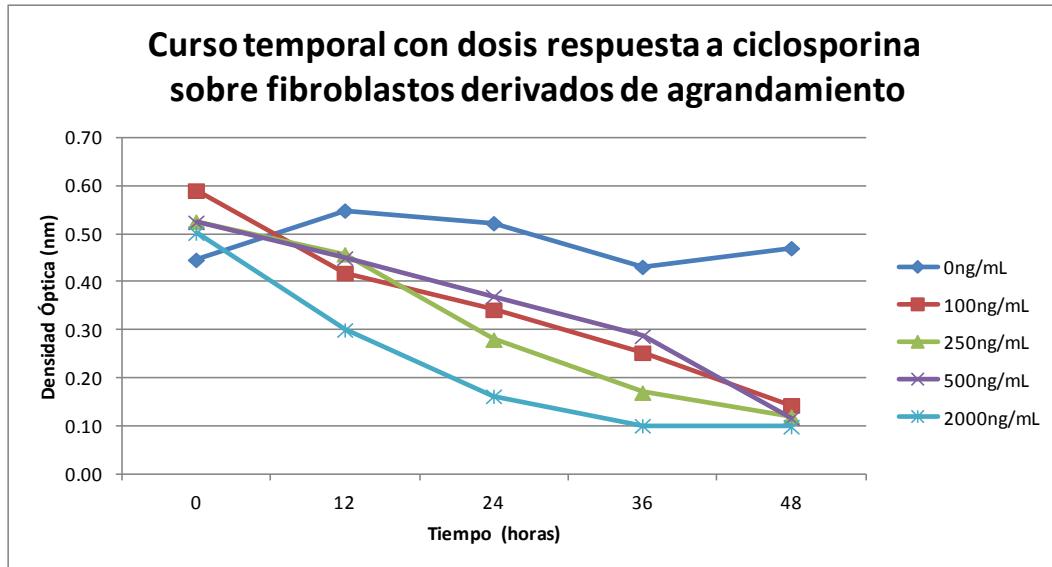


Figura 25. Gráfica del ensayo de viabilidad dosis-respuesta a Ciclosporina A en fibroblastos GOCyc_001 donde nos muestra que a una concentración de 100, 250 y 500ng/ml la viabilidad de las células comienza a perderse después de las 12 h, mientras que a una concentración de 2000ng/ml la viabilidad celular se pierde antes de las 12h.

10. DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación comprueban la hipótesis de que la CsA tiene un efecto sobre el aumento en la proliferación de fibroblastos en cultivo. Además, comprueban la hipótesis de que la citotoxicidad depende de la concentración de CsA.

Nuestros resultados muestran que la tasa de proliferación de fibroblastos de la línea celular GOCys_001 es mayor a la tasa de proliferación que el de la línea celular control. Este dato concuerda con estudios donde se mostró que la Ciclosporina A tiene un efecto estimulante de la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos ^(41, 42). Las células GOCyc_001 derivadas de un paciente tratado con ciclosporina se comportan de manera similar a las células expuestas a ciclosporina *in vitro*. Por lo tanto, la Ciclosporina A aumenta la proliferación de fibroblastos gingivales humanos *in vitro*.

La morfología de los fibroblastos de ambas líneas celulares es muy parecida. Los fibroblastos se muestran de forma alargada o forma de huso, con su núcleo celular bien definido. Los fibroblastos en su fase apoptótica se muestran redondos y de un tono más oscuro. Al menos morfológicamente no se observan cambios relevantes, por lo que los cambios que se generan en el agrandamiento gingival se deben probablemente a una sobreproducción de proteoglicanos y glicosaminoglucanos, principalmente por los fibroblastos, como se muestra en un estudio de Mariani en 1996. ⁽²⁵⁾

En cuanto a nuestros resultados del efecto tóxico de CsA sobre los fibroblastos, tanto sanos como los derivados de biopsia de paciente con agrandamiento gingival, nos muestra que en el primer caso, a una concentración de 100ng/mL a las 24hr las células empiezan a reducir su viabilidad, mientras que los fibroblastos con agrandamiento gingival causado por CsA a la misma concentración decrece su viabilidad a las 12hr.

Comparando las concentraciones y las dosis con un estudio realizado por Jung en 2008, usamos 10 veces menos CsA y el resultado fue que la viabilidad celular se mejoró gradualmente de una manera dependiente de la dosis cuando los fibroblastos gingivales fueron expuestos a CsA durante 24hr, por el contrario en nuestro estudio el resultado fue que las células van reduciendo su viabilidad al ser expuestas a CsA a partir de las 12hr. ⁽⁵¹⁾

La diferencia de resultados puede deberse al tipo de ciclosporina utilizado. Para este trabajo se utilizó la misma ciclosporina que tomaba el paciente y en el otro caso se utilizó ciclosporina pura. Por lo tanto, el grado de pureza del fármaco o los componentes del excipiente pueden ser los cuasantes del efecto tóxico. Las concentraciones utilizadas en nuestro estudio fueron 10 veces menores a las utilizadas por Jung, por lo que nuestro resultado pudo haber variado por las diferencias de las concentraciones.

Otro factor que pudo influir en el resultado es que los fibroblastos de ambos estudios no provienen de una misma población. No se especifican los sitios de donde se tomaron las biopsias en los trabajos citados.

11. CONCLUSIONES

En este estudio concluimos que la tasa de división celular es mayor en los fibroblastos expuestos a Ciclosporina A *in vitro* en comparación con los fibroblastos sanos.

No existen cambios morfológicos significativos de los fibroblastos de ambas líneas celulares.

La dosis de CsA propuesta para poder mantener un cultivo de fibroblastos es 100ng/ml, ya que es la que menos efecto tóxico muestra.

12. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el financiamiento del Proyecto IACOD IB200811 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) número IA202013-2.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B. Essential cell biology. 3rd ed. New York: Garland Science; 2009.
2. Cambridge Clinical School. Clinical and Biomedical Computing Unit. Expert reviews in molecular medicine. Cambridge, UK: Published by Cambridge University Press in association with the Clinical and Biomedical Computing Unit of the University of Cambridge School of Clinical Medicine; 1997.
3. Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol.* 1992 Jan;19(1):1-11.
4. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc.* 2000 Dec;66(11):594-7.
5. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):1-6.
6. Newman MG, Takei HH, Carranza FnA. Carranza's clinical periodontology. 11th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2012. xlv, 825 p. p.
7. Kimball RF. A Delayed Change of Phenotype following a Change of Genotype in *Paramecium Aurelia*. *Genetics.* 1939 Jan;24(1):49-58.
8. Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th ed. / edited by Jan Lindhe, Niklaus P. Lang, Thorkild Karring. ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.

9. Ramon Y, Behar S, Kishon Y, Engelberg IS. Gingival hyperplasia caused by nifedipine--a preliminary report. *Int J Cardiol.* 1984 Feb;5(2):195-206.
10. Ellis JS, Seymour RA, Steele JG, Robertson P, Butler TJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. *J Periodontol.* 1999 Jan;70(1):63-7.
11. Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Lörtscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol.* 1983 May;10(3):237-46.
12. Hassell TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):103-37.
13. Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effects of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. A longitudinal study. *J Clin Periodontol.* 1987 Nov;14(10):610-3.
14. Mariotti A, Hassell T, Jacobs D, Manning CJ, Hefti AF. Cyclosporin A and hydroxycyclosporine (M-17) affect the secretory phenotype of human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med.* 1998 Jul;27(6):260-6.
15. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. 1976. *Agents Actions.* 1994 Dec;43(3-4):179-86.

16. Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int.* 1999 Nov;30(11):775-83.
17. Sádaba B. [Monitoring and secondary effects of immunosuppressants in the transplant]. *An Sist Sanit Navar.* 2006;29 Suppl 2:207-18.
18. Spolidorio LC, Spolidorio DM, Massucato EM, Neppelenbroek KH, Campanha NH, Sanches MH. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. *Oral Dis.* 2006 May;12(3):309-14.
19. Bostanci N, Ilgenli T, Pirhan DC, Clarke FM, Marcenes W, Atilla G, et al. Relationship between IL-1A polymorphisms and gingival overgrowth in renal transplant recipients receiving Cyclosporin A. *J Clin Periodontol.* 2006 Nov;33(11):771-8.
20. Braun WE. Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *J Clin Apher.* 2003;18(3):141-52.
21. Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, et al. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 Jan;12(1):E19-25.
22. Hefti AF, Eshenaur AE, Hassell TM, Stone C. Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. *J Periodontol.* 1994 Aug;65(8):744-9.
23. Marshall RI, Bartold PM. Medication induced gingival overgrowth. *Oral Dis.* 1998 Jun;4(2):130-51.

24. Fu E, Nieh S, Chang HL, Wang SL. Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. *J Periodontol.* 1995 Jul;66(7):594-8.
25. Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Bergamini L, Calastrini F, Stabellini G. Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1996 Jan;67(1):21-7.
26. Bueno R. Agrandamientos Gingivales Medicamentosos. *Avances en Odontoestomatología*2001.
27. Kohase M, May LT, Tamm I, Vilcek J, Sehgal PB. A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1. *Mol Cell Biol.* 1987 Jan;7(1):273-80.
28. Amento EP, Bhan AK, McCullagh KG, Krane SM. Influences of gamma interferon on synovial fibroblast-like cells. Ia induction and inhibition of collagen synthesis. *J Clin Invest.* 1985 Aug;76(2):837-48.
29. Schmidt JA, Oliver CN, Lepe-Zuniga JL, Green I, Gery I. Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. *J Clin Invest.* 1984 May;73(5):1462-72.
30. Saklatvala J, Pilsworth LM, Sarsfield SJ, Gavrilovic J, Heath JK. Pig catabolin is a form of interleukin 1. Cartilage and bone resorb, fibroblasts make prostaglandin and collagenase, and thymocyte proliferation is

- augmented in response to one protein. *Biochem J.* 1984 Dec;224(2):461-6.
31. Baum BJ, Moss J, Breul SD, Crystal RG. Association in normal human fibroblasts of elevated levels of adenosine 3':5'-monophosphate with a selective decrease in collagen production. *J Biol Chem.* 1978 May;253(10):3391-4.
32. Baum BJ, Moss J, Breul SD, Berg RA, Crystal RG. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J Biol Chem.* 1980 Apr;255(7):2843-7.
33. Hata R, Sunada H, Arai K, Sato T, Ninomiya Y, Nagai Y, et al. Regulation of collagen metabolism and cell growth by epidermal growth factor and ascorbate in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Biochem.* 1988 Apr;173(2):261-7.
34. Lomanto LO, Oscar. Bretón César. Gómez, Álvaro. Mesa, Viviana. *El ciclo celular*2003; 6.
35. Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature.* 1978 Jun;273(5661):345-9.
36. Stoker M. Growth regulating substances for animal cells in culture. Introduction. *Wistar Inst Symp Monogr.* 1967;7:1-2.
37. Dulbecco R, Elkington J. Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature.* 1973 Nov;246(5430):197-9.
38. Westermark B, Wasteson A. The response of cultured human normal glial cells to growth factors. *Adv Metab Disord.* 1975;8:85-100.

39. Kruse PF, Keen LN, Whittle WL. Some distinctive characteristics of high density perfusion cultures of diverse cell types. *In Vitro*. 1970 Jul-Aug;6(1):75-88.
40. Freshney RI. *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley- Blackwell; 2010. xxxi, 732 p., 28 p. of plates p.
41. Jung JY, Kang GC, Jeong YJ, Kim SH, Kwak YG, Kim WJ. Proteomic analysis in cyclosporin A-induced overgrowth of human gingival fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2009 Aug;32(8):1480-5.
42. 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 Nov;74(11):1625-33.
43. Prabhu A, Mehta DS. A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporin and tacrolimus in rats: an experimental study. *J Periodontol*. 2006 Feb;77(2):265-70.
44. Nassar CA, Nassar PO, Andia DC, Guimarães MR, Spolidorio LC. The effects of up to 240 days of tacrolimus therapy on the gingival tissues of rats--a morphological evaluation. *Oral Dis*. 2008 Jan;14(1):67-72.
45. Varga E, Lennon MA, Mair LH. Pre-transplant gingival hyperplasia predicts severe cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Clin Periodontol*. 1998 Mar;25(3):225-30.

46. McGaw WT, Porter H. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988 Feb;65(2):186-90.
47. Stabellini G, Calastrini C, Mariani G, Gioia M, Caramelli E, Gagliano N, et al. Extracellular glycosaminoglycan changes in healthy and overgrown gingiva fibroblasts after cyclosporin A and cytokine treatments. *J Oral Pathol Med.* 2004 Jul;33(6):346-53.
48. Kähäri VM, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1991 Jun;266(16):10608-15.
49. Gnoatto N, Lotufo RF, Toffoletto O, Marquezini MV. Gene expression of extracellular matrix proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1747-53.
50. Gagliano N, Moscheni C, Torri C, Dellavia C, Stabellini G, Ferrario VF, et al. Differential effect of Cyclosporin A and FK506 on SPARC mRNA expression by human gingival fibroblasts. *Biomed Pharmacother.* 2005 Jun;59(5):249-52.
51. Jung JY, Kang GC, Jeong YJ, Kim SH, Kwak YG, Kim WJ. Proteomic analysis in cyclosporin A-induced overgrowth of human gingival fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2009 Aug;32(8):1480-5.

52. Jung JY, Jeong YJ, Jeong TS, Chung HJ, Kim WJ. Inhibition of apoptotic signals in overgrowth of human gingival fibroblasts by cyclosporin A treatment. *Arch Oral Biol.* 2008 Nov;53(11):1042-9.