



**COMPARACIÓN DEL EFECTO PROLIFERATIVO DE MICRODOSIS
DE FÁRMACOS INDUCTORES DE HIPERPLASIA GINGIVAL SOBRE
CULTIVOS DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS:
CICLOSPORINA, FENITOÍNA Y NIFEDIPINO**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Nicol Escudero Aguilera
Camila López Barría

Docente Guía: Prof. Dr. Jaime Sarmiento Cornejo
Cátedra de Operatoria Dental

Valparaíso, 2014

Dedicado a mis padres y hermana, por su esfuerzo y entrega, por su amor a toda prueba, por guiarme y sobretodo no rendirse en querer hacer de mí una mejor persona de lo que soy...muchísimas gracias por todo...

A mi familia por su apoyo incondicional...

A mis compañeros de U, aquellos que hicieron mejor esta etapa y hoy son compañeros de vida, en especial a ti, Christian Maluenda, colega, amigo y amor....

A Marco Chávez por su tiempo, paciencia, consejos y buenos momentos durante estos largos años...

A toda la comunidad Universitaria...

Nicol

Dedicado a mis padres, por todo el amor que me han entregado, por las enseñanzas, los valores, las aventuras, su paciencia eterna y por siempre llevarme de la mano en el camino de la vida. Los amo infinito.

A mis hermanos que siempre han estado a mi lado enseñándome de la vida, los buenos momentos y el amor fraternal. Sin ustedes mi vida no estaría completa.

*A Martín por amarme como lo haces y por todo lo hermoso que me has entregado.
Amarte siempre amarte.*

A Marcela por traer al mundo lo más hermoso que hay, Marianito bebé. Te adoro.

A mi Nero y Bianca que siempre me reciben con muchísima alegría.

*A Dios por permitir que todo lo que escribí sea posible y por nunca dejarme de lado.
Gracias por todo.*

Camila

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a nuestro profesor guía Dr. Jaime Sarmiento, por creer en nosotras, guiarnos, comprendernos y ayudarnos durante todo este proceso de tesis. Agradecer también a nuestro docente informante Dr. Mauricio Embry, por aceptar participar de este trabajo.

Especiales agradecimientos a la Profesora Caroline Weinstein O., por ser una gran persona, recibirnos con los brazos abiertos en su “casa de investigación”, dedicarse a enseñarnos, guiarnos, darnos todo su apoyo y mucho más.

A Mauricio Reyna por ser un excelente guía, genio y apasionado en todo lo que hace. Gracias por tu paciencia infinita, tus consejos, por las conversaciones “sitcom” y por ser simplemente tú.

A Miguel Fuentes, que a pesar de no tener nada que ver con nuestra tesis, se agradece su orientación desinteresada en el mundo de la investigación, la buena onda y las risas.

Gracias a nuestro querido Marco Chávez, simplemente no hay palabras. Muchas gracias, te adoramos. A ti Verito por ser una excelente persona, por tus consejos y regalones. Sin ustedes la Universidad no hubiese sido lo mismo.

Agradecemos a los amigos de la Universidad y de la vida por ser un bonito obstáculo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

En general, agradecemos a todas las personas que de alguna u otra manera han formado parte de nuestra vida universitaria: Auxiliares, asistentes dentales, secretarías y administrativos.

INDICE

Introducción	1
Capítulo I. Tejido Gingival	3
1.1. Características Clínicas de la Encía	4
1.2. Características Histológicas del Tejido Gingival Sano	7
1.2.1. Unión Dentogingival	10
1.3. Fibroblasto: Generalidades	11
1.4. Renovación del Epitelio	14
Capitulo II. Hiperplasia Gingival	15
2.1. Hiperplasia inducida por fármacos	16
2.2. Comparación histológica de tejidos gingivales	17
Capítulo III. Fármacos Inductores de Hiperplasia Gingival	19
3.1. Fármacos bloqueadores de los canales de calcio	19
3.1.1. Nifedipino	20
3.2. Fármacos Antiepilépticos	23
3.2.1. Fenitoína	24
3.3. Fármacos Inmunosupresores	27
3.3.1. Ciclosporina	27
Capítulo IV. Técnicas de Estudio	31
4.1. Cámara de Bioseguridad (CBS)	31
4.2. Medio de Cultivo: DMEM+F12+ Glutamax	32
4.3. Buffer Fosfato Salino (PBS)	32
4.4. Incubador CO2 Thermo Scientific Forma Series 310	33
4.5. Tripsina	33
4.6. Técnica Azul de Tripán y Cámara de Neubauer	33

4.7. Método fluorométrico de Resazurina	34
4.8. Appliskan ®, Thermo Scientific	35
Capítulo V. Definición de las Variables	36
5.1. Microdosis Farmacológica	36
5.2. Concentración de DMSO	36
5.3. Proliferación celular	37
Hipótesis	38
Objetivo General	38
Objetivos Específicos	38
Materiales y Métodos	39
Resultados	47
Análisis Descriptivo	50
Análisis de Estadístico	59
Discusión	66
Conclusiones	68
Limitaciones	69
Sugerencias	69
Resumen	70
Referencias Bibliográficas	71
Anexo 1	78
Anexo 2	80
Anexo 3	88

INTRODUCCION

La hiperplasia gingival es una patología periodontal multifactorial y principalmente se da como efecto secundario a la administración de ciertos fármacos, los cuáles, provocan lesiones fibróticas en el tejido periodontal. Se han asociado a este efecto adverso tres tipos de drogas (Nakib & Ashrafi, 2011):

- Drogas Antiepilépticas, principalmente la Fenitoína.
- Bloqueadores de los canales de calcio como Nifedipino.
- Drogas Inmunosupresoras, principalmente Ciclosporina.

El mecanismo exacto por el cual se produce este tipo de hiperplasia aún no se ha establecido del todo y la literatura se muestra contradictoria, aún así a través de la evidencia, se ha demostrado que existe una activación del fibroblasto mediante la acción de mediadores químicos locales y circulantes tales como : angiotensina II, endotelina I, factores de crecimiento y proteasas de mastocito, lo que desencadenaría la excesiva producción y remodelación de la matriz extracelular, ocasionando el agrandamiento gingival como signo clínico.

Al evaluar los efectos de ciclosporina, fenitoína, y nifedipino, en muestras gingivales de mono, se ha observado una modificación metabólica del colágeno, con alteración de las metaloproteinasas de matriz (MMP-1 Y -2) y aumento de fibras colágenas inmaduras (Kanno et al., 2008).

El desarrollo de la hiperplasia ocurre dentro de los primeros tres meses una vez iniciada la medicación y empieza con un agrandamiento de la papila interdental (Nishikawa et al., 1996). Esta reacción en cuanto a los grados de inflamación, fibrosis y celularidad, depende del tipo de droga, duración de tratamiento, dosis, calidad de la higiene oral y una posible predisposición genética (Subramani et al., 2013).

Si bien existen estudios in vitro sobre la hiperplasia gingival inducida por fármacos (Oliveira et al., 2007, Kanno et al., 2008, Cota et al., 2010, Kaur et al., 2010, Nakib & Ashrafi, 2011, Salman et al., 2013, Subramani et al., 2013, Bharti & Bansal, 2013, Vahabi et al., 2013) no existe un estudio que evalúe los efectos de estos tres medicamentos sobre Fibroblastos gingivales humanos, bajo condiciones estándares. Además, gran parte de los estudios disponibles están enfocados en comprender los fenómenos que intervienen en la hiperplasia gingival para poder crear métodos que limiten o eviten su aparición y en estudios que analizan los cambios exclusivos de la matriz celular bajo inducción de fármacos. Sin embargo, la principal motivación de este trabajo de investigación, es ser la base para dar paso a estudios futuros que busquen transformar este efecto adverso no deseado, en una

alternativa terapéutica que consista en la aplicación de microdosis de estos medicamentos a nivel local, y que permitan de esta forma, atenuar las secuelas de enfermedad periodontal o mejorar el aspecto estético de rehabilitaciones con aparatología fija en el tiempo que por iatrogenia no han respetado las dimensiones biológicas, entre otras posibles aplicaciones en el campo odontológico y en establecer si además de cambios en la matriz celular de los fibroblastos existe un aumento de proliferación de estos, de manera que la hiperplasia gingival no solo se genere por aumento de matriz sino que también por un aumento de células.

La relevancia del estudio se centra en la frecuencia de las secuelas de daño periodontal. A modo de ejemplo, podemos referirnos al estudio de Susin et al., en el año 2004 donde se examinaron a 1460 personas, determinando que el 83,4% presentaba al menos una recesión gingival igual o mayor a 1 mm. Similares fueron los resultados obtenidos por Marini et al., el año 2004 donde determinaron que el 89% de los pacientes examinados presentaban recesiones. En un estudio realizado en Chile por Beltrán et al, 2013 se evaluaron 105 pacientes de ambos sexos, con edades entre 18 y 64 años, donde la prevalencia de recesión gingival fue del 92,38%, afectando 530 dientes.

Es necesario comprender los fenómenos involucrados en la hiperplasia gingival, para permitir estudios que busquen establecer este proceso como una alternativa no quirúrgica a alteraciones como la recesión gingival. Con esta finalidad, y como un primer paso, se pretende evaluar el comportamiento proliferativo de los fibroblastos gingivales humanos estimulados con distintas dosis farmacológicas en distintos tiempos de medición.

MARCO TEORICO

CAPITULO I: TEJIDO GINGIVAL

El periodoncio se forma con los tejidos de soporte y protección del diente (encía, ligamento periodontal, cemento, hueso alveolar). Se divide en dos partes: la encía, cuya función principal es proteger los tejidos subyacentes, y el aparato de inserción, compuesto por el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar, como se puede apreciar en la Figura 1 (Periodontología Clínica, Carranza, 2004).

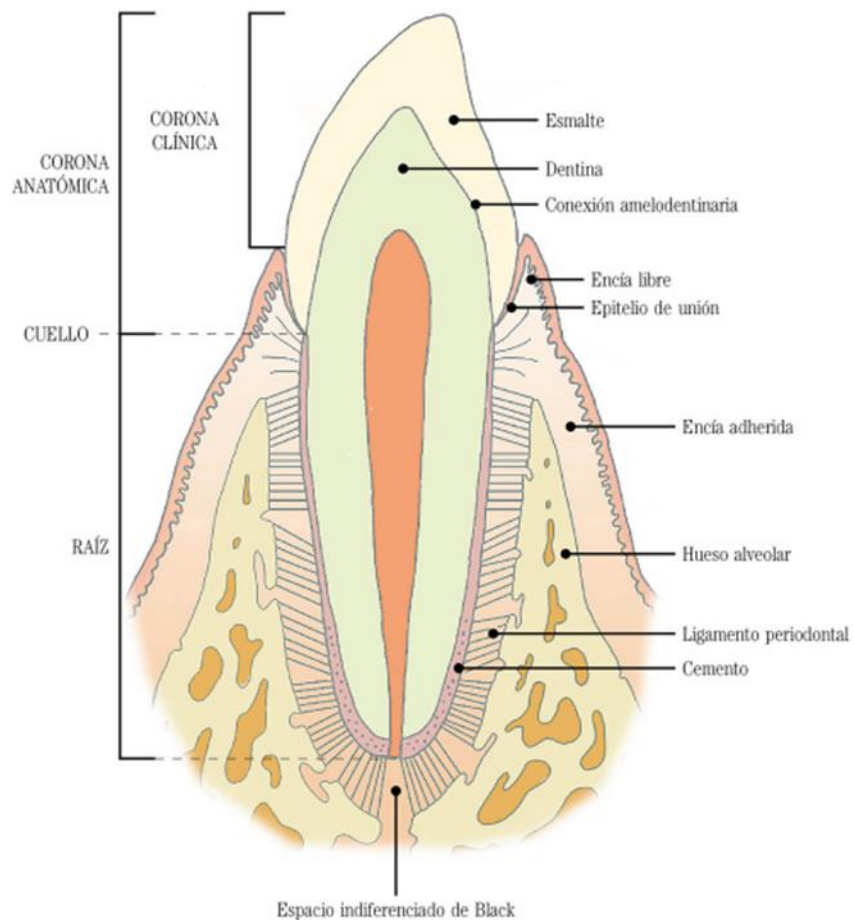


Figura 1. Esquema del diente y de sus estructuras de sostén y protección. Fuente *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*, Gómez de Ferraris, 2009.

La encía corresponde a la mucosa masticatoria, junto con el paladar duro, la cual recibe todo los roces y fuerzas que se realizan durante la masticación. El epitelio que la constituye es plano, estratificado y paraqueratinizado; y el corion puede ser más o menos fibroso. La submucosa está ausente y, por lo tanto, se fija fuertemente al hueso y carece de movilidad (Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental, Gómez de Ferraris, 2009). Este tejido recubre los procesos alveolares y es el único que bajo condiciones de salud es directamente visible bajo inspección visual. Una encía sana es color rosa, salmón o rosa coral pálida, sin embargo las variaciones de estos son comunes y se ven afectados por el grosor del epitelio, nivel de queratinización, vascularidad y pigmentaciones (Fundamentals of Periodontics, Thomas G. Wilson & Kenneth G. Kornmann, 2003). La encía está compuesta por una capa de tejido epitelial y un tejido conjuntivo subyacente denominado lámina propia.

La encía adquiere su forma y textura definitiva con la erupción de los dientes. En sentido coronario el color rosado coralino termina en el *margen gingival libre*, que presenta contornos festoneados. En sentido apical, la encía se continúa con la *mucosa alveolar* (mucosa de revestimiento) la cual es laxa y de color rojo oscuro, de la cual está separada por una línea demarcatoria por lo general fácilmente reconocible llamada *unión mucogingival* o *línea mucogingival* (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009).

Por ser la encía una membrana mucosa, epitelio – conectiva, desde el punto de vista estructural, posee un doble origen embriológico. El tejido epitelial de revestimiento deriva del ectodermo que tapiza la cavidad bucal primitiva o estomodeo, y el tejido conectivo subyacente del mesénquima cefálico o ectomesénquima (Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental, Gómez de Ferraris, 2009).

Cap. 1.1 Características Clínicas de la Encía

Desde el punto de vista clínico/ anatómico, la encía se puede dividir en 4 partes (Figura 2 y 3):

- Encía marginal (encía libre, encía no adherida)
- Surco gingival
- Encía insertada (encía adherida)
- Encía interdental

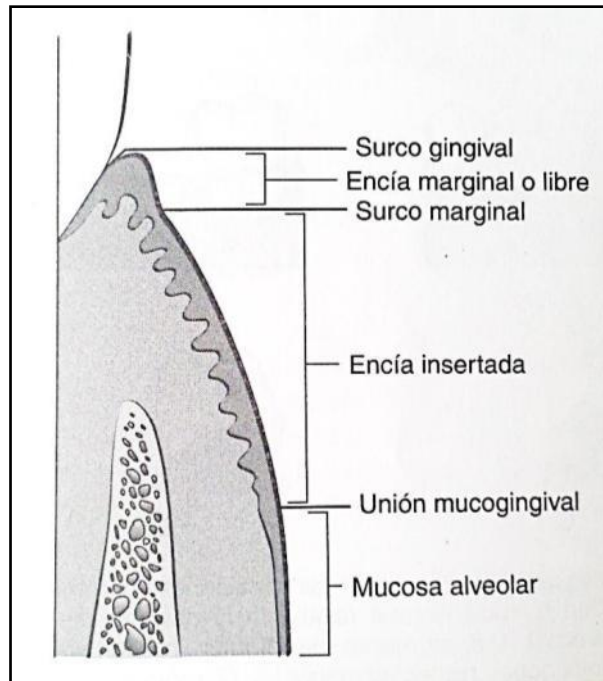


Figura 2. Esquema de los puntos anatómicos de referencia de la encía. Fuente *Periodontología Clínica, Carranza, 2004.*

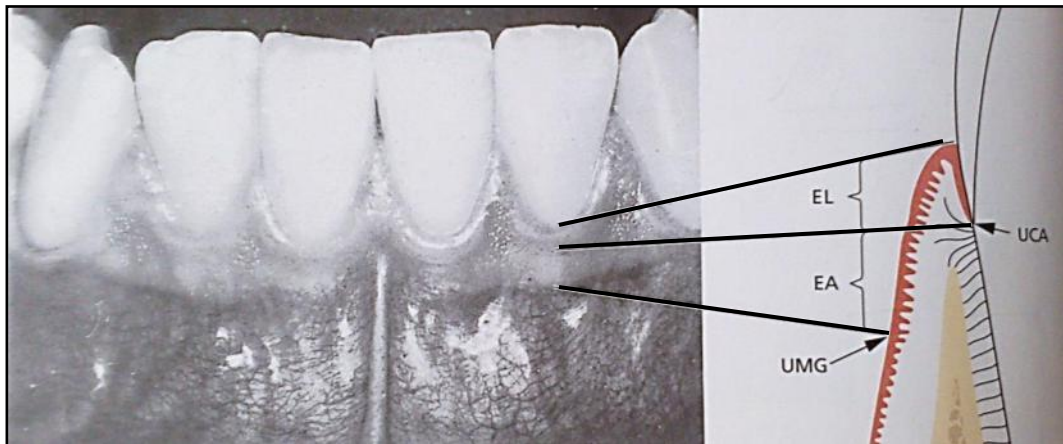


Figura 3. Se pueden distinguir dos partes de la encía: a) Encía libre (EL) b) Encía adherida (EA). Se distingue además la Unión cementoadamantina (UCA) y la Unión Mucogingival (UMG) Fuente: *Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009.*

Encía marginal es también conocida como no insertada o libre y corresponde al margen terminal o borde de la encía que rodea los dientes a modo de collar. En casi el 50% de los casos, una depresión lineal superficial, el *surco gingival libre*, la separa de la encía insertada. Por lo general con casi 1 mm de ancho, la encía marginal forma la pared de tejido blando del surco gingival. Puede separarse de la superficie dental mediante una sonda periodontal. (Periodontología Clínica, Carranza, 2004).

Es de color rosado coralino, con superficie opaca y consistencia firme. Comprende el tejido gingival en las caras vestibular y lingual/palatina de los dientes y la encía interdental o papilas interdentes. En las caras vestibular y lingual de los dientes, la encía libre se extiende desde el borde gingival en sentido apical, hasta la línea de encía libre, ubicada a un nivel que corresponde a la unión cementoadamantina. El margen gingival libre es a menudo redondeado, de modo que se forma una pequeña invaginación o surco entre el diente y encía, *surco gingival* (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009).

Surco gingival es el surco poco profundo o espacio circundante del diente que forman la superficie dental, por un lado, y el revestimiento epitelial del margen libre de la encía, por otro. Tiene forma de “V”, tiene además una profundidad, en estado de salud, de aproximadamente 1,8 mm, con variaciones de 0 a 6 mm y otros investigadores registran 1,5 a 0,69mm. En el ser humano la profundidad de sondaje de un surco gingival clínicamente normal es de 2 a 3 mm. Este surco presenta un líquido que se filtra hacia él desde el tejido conectivo gingival a través del delgado epitelio del surco. Se estima que el líquido gingival elimina material del surco, contiene proteínas plasmáticas que podrían mejorar la adhesión del epitelio con el diente, posee propiedades antimicrobianas y ejerce actividad inmunitaria para proteger a la encía (Periodontología Clínica, Carranza, 2004).

Encía insertada o adherida es la que se continúa con la encía marginal. Es firme y resiliente, se encuentra fijada con firmeza al hueso alveolar subyacente y al cemento por fibras del tejido conectivo y por esa razón es comparativamente inmóvil en relación al tejido subyacente (Periodontología Clínica, Carranza, 2004; Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009). Presenta un color rosado coralino y a veces presenta pequeñas depresiones en su superficie, las que se denominan como “*punteado*”, esto le da un aspecto de cáscara de naranja (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009). La superficie vestibular de la esta encía se extiende hasta la mucosa alveolar relativamente laxa y móvil, de la cual está separada por la *unión mucogingival*. El ancho de esta encía corresponde a la distancia entre la *unión mucogingival* y la proyección sobre la superficie externa del fondo del surco gingival o bolsa periodontal, los valores varían según la zona dental, siendo por vestibular mayor en la región de los incisivos (3.5 a 4.5 mm en maxilar y 3.3 a 3.9 en mandíbula) y menor en las zonas posteriores. El ancho mínimo

aparece en el área del primer premolar (1.9 mm en el maxilar y 1.8 en la mandíbula) (Periodontología Clínica, Carranza, 2004).

Mucosa alveolar, no corresponde propiamente tal a la encía, sin embargo es la continuación de la encía insertada o adherida. Esta mucosa es de color más oscura y de localización más apical con respecto a la unión mucogingival, está vinculada laxamente al hueso subyacente. Por consiguiente, a diferencia de la encía adherida, esta es móvil en relación con el tejido subyacente (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009).

Encía interdental es la que ocupa el nicho gingival, que es el espacio interproximal por debajo del área de contacto. Esta encía puede ser piramidal o tener forma de “col”. En el primer caso, la punta de la papila se halla inmediatamente por debajo del punto de contacto. La segunda presenta una depresión en forma de valle que conecta una papila vestibular y otra lingual y se adapta a la morfología del punto de contacto interproximal. La forma de la encía en un espacio interdental determinado depende del punto de contacto entre los dos dientes contiguos y de la presencia o ausencia de cierto grado de recesión. Las superficies vestibular y lingual convergen hacia el área de contacto interproximal, y las mesiales y distales son algo cóncavas. Los márgenes laterales y el extremo de las papilar interdentales están formados por una continuación de la encía marginal de los dientes adyacentes. La porción intermedia se compone de la encía insertada (Periodontología Clínica, Carranza, 2004).

Cap. 1.2 Características histológicas del tejido gingival sano

La encía está compuesta por un revestimiento epitelial de tipo masticatorio y un tejido conectivo subyacente llamado *lámina propia* o *corion*. Estos tejidos tienen características propias según la región a considerar (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009).

a) La encía marginal o libre: El epitelio de la encía libre o vertiente bucal está conectado al tejido conectivo por una interfase sumamente ondulada, debido a las *proyecciones papilares* que envía el tejido conectivo (papilas conectivas) al epitelio y la presencia de *crestas epiteliales* interpapilares. Estas crestas se llaman “*red de clavijas o red de crestas*”; su presencia es un rasgo histológico típico del epitelio bucal. Por el contrario, la interfase epitelio – corion es recta a nivel del epitelio del surco y del epitelio de unión que forman, en conjunto, el epitelio de la unión dentogingival.

El epitelio puede ser paraqueratinizado o queratinizado, por ende se pueden observar distintos estratos celulares:

1. Estrato basal o germinativo: formado por una capa única de queratinocitos, los cuales son de forma cúbica alta o cilíndrica. El núcleo es redondo u oval y el citoplasma intensamente basófilo. Estos sintetizan concretamente colágeno tipo IV y VII, laminina, **perlecán o perlecano**, y citocinas y son responsables de la formación de la lámina basal que forma parte de la membrana basal. En este estrato se observan figuras mitóticas y comienza el proceso de renovación epitelial, a partir de las células troncales o células madres. Encontramos también melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans.
2. Estrato espinoso: formado por varias hileras de queratinocitos. Las células que lo constituyen son poligonales y de núcleo redondo. Encontramos también células de Langerhans y Merkel.
3. Estrato granuloso: está formado por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas con un núcleo pequeño de cromatina densa, su citoplasma se encuentra lleno de gránulos de queratohialina, los cuales, en el proceso de queratinización, formarán la sustancia interfibrilar que une los haces de tonofilamentos.
4. Estrato córneo: está constituido por células planas, sin núcleo evidente y con citoplasmas fuertemente acidófilos, llamadas corneocitos.

Podemos encontrar además el **corion**, que corresponde a un tejido conectivo semidenso. Inmerso en este tejido encontramos fibroblastos en un porcentaje del 65% y son los encargados de sintetizar los diferentes tipos de fibras que componen este tejido. Se ha descrito una heterogeneidad entre los fibroblastos ubicados debajo del epitelio de la encía y unión dentogingival con los del ligamento periodontal, teniendo diferente origen y fenotipo. Los primeros se originan a partir del mesénquima perifolicular derivado del mesodermo y no tienen receptores EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y los segundos se originan a partir del saco dentario derivado de ectomesénquima procedente de la cresta neural y si tienen receptores EGF. Los fibroblastos gingivales son además heterogéneos en respuesta a diferentes estímulos, como por ejemplo los fibroblastos aislados de encía libre elaboran gran cantidad de glucosaminoglicanos y colágeno en respuesta a algunos fármacos en relación a los de la encía adherida (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009). Estas células en general sintetizan además compuestos de la matriz extracelular, participando en la remodelación y degradación de la misma mediante la síntesis de colagenasa, contribuyen en la respuesta inflamatoria e inmunitaria sintetizando interleucinas 1, 6 y 8 y participan en la regulación paracrina de la actividad funcional de los queratinocitos sintetizando

prostaglandinas. Además de los fibroblastos en el tejido conectivo encontramos células cebadas, macrófagos, entre otros.

En la Figura 4 podemos observar un corte histológico de encía donde se puede apreciar las crestas epiteliales, el corion laxo y las capas celulares.

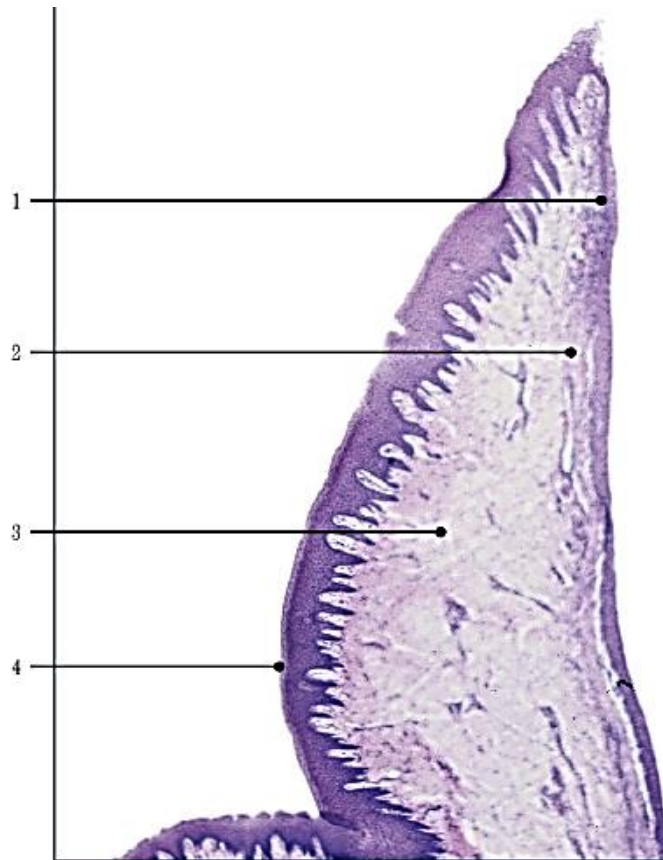


Figura 4. Encía marginal o libre. A menor aumento se distinguen las diferencias en el epitelio y el corion de las vertientes dental y libre. Número 1 corresponde Epitelio del surco, número 2 corion laxo apapilar, número 3 corion semidenso y número 4 vertiente libre de la encía marginal. HE, x40. Fuente *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*, Gómez de Ferraris, 2009.

b) Encía adherida

- Epitelio estratificado plano con diferentes grados de queratinización del estrato córneo. Presenta menor cantidad de glucógeno que el epitelio no queratinizado, se observan mayor cantidad de células de Langerhans y melanocitos.
- Corion es de tipo denso y sumamente fibroso. Se caracteriza por poseer abundantes papilas delomorfadas que levantan al epitelio que lo reviste. Además presenta un grupo de fibras colágenas que entremezclan con las provenientes del periostio y ligamento periodontal, encontrando así 4 grupos de haces

fibrosos: grupo gingivo-dental (fibras colágenas de la encía al cemento dental), grupo gingivo-alveolar (de la encía a la cresta alveolar), grupo circular (fibras que forman una banda o anillo alrededor del diente y se cruzan con las gingivo-alveolar) y el grupo periostio-dental (desde el periostio de la vertiente externa de la cresta alveolar al cemento dental). Existe un grupo presente en la encía interdental llamado grupo transeptal o dentodental que corresponden a fibras colágenas que van desde el cemento cervical del diente, atraviesan dicho tejido conectivo y se insertan en el cemento cervical del diente adyacente por encima de la cresta alveolar.

Cap. 1.2.1 Unión dentogingival

Corresponde a una región del periodonto de protección y su función es unir la encía al diente. Está formada por el epitelio del surco, epitelio de unión y el corion bajo ambos.

- Epitelio del surco es plano estratificado no queratinizado, no posee el estrato granuloso. Las células que lo componen se encuentran más cercanas que en el epitelio de unión, dejando menos espacio intercelular. La actividad mitótica es más rápida en este epitelio junto con el de unión, en relación al resto del epitelio bucal, en el primer caso se demora 7 días aproximados en la regeneración en relación a los 12 a 13 días en el segundo caso. Este epitelio actúa como una membrana semipermeable, por la que pasan los productos tóxicos de las bacterias al tejido conectivo laxo, mientras que desde éste se filtran al surco, el fluido gingival.
- Epitelio de unión tiene como principal función brindar una protección biológica, ya que es una banda de epitelio fija alrededor del cuello de la corona clínica, conecta la encía a la superficie del esmalte y sella, de esta manera el periodonto de inserción, protegiéndolo. Está formado por un epitelio plano no queratinizado, que por el lado interno se le une al diente mediante una lámina basal interna y por el otro lado externo se conecta al tejido conectivo por la otra lámina, llamada lámina basal externa. Su espesor es de 15 a 30 células en la parte más ancha que corresponde a la base del surco y de una o dos células en la unión cementoadamantina. Presenta en su composición queratinocitos, granulocitos, linfocitos y monocitos.
- Corion es laxo con escasos fibroblastos y tejido colágeno. Existe un infiltrado inflamatorio de varios tipos celulares (neutrófilos, linfocitos y monocitos-macrófagos), este es considerado fisiológico debido a la constante invasión microbiana (Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental, Gómez de Ferraris, 2009).

Cap. 1.3 Fibroblasto: Generalidades

El tejido conectivo es un orden constitutivo supracelular formado por un conjunto de poblaciones celulares aisladas o muy juntas inmersas en una matriz extracelular, compuesta de sustancia fundamental amorfa y material fibrilar diverso. Se origina a partir del mesénquima embrionario y está destinado al sostén mecánico del organismo, unión intertisular, intercambio metabólico y energético y de defensa y reparación orgánica (Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental, 3° Edición, Gómez de Ferraris, 2009).

La sustancia fundamental es un material amorfo e hidratado compuesto de glucosaminoglicanos, polímeros largos no ramificados de disacáridos repetidos, proteoglicanos, centros proteicos a los cuales se enlazan de manera covalente varios glucosaminoglicanos y glicoproteínas de adherencia, moléculas grandes que se encargan de asegurar los diversos componentes de la matriz extracelular entre sí y a integrinas y distroglicanos de la membrana celular. El material fibrilar está compuesto por fibras colágenas y fibras elásticas. El componente celular se agrupa en dos categorías: células fijas y móviles o transitorias. Las células fijas, son poblaciones estables dentro del tejido conectivo y de vida prolongada, entre ellas se incluyen: células adiposas, pericitos, células cebadas, macrófagos y fibroblastos (Texto Atlas de Histología, 2° Edición, Gartner & Hiatt, 2002).

Se denomina fibroblasto a la célula de la estirpe más activa (Figura 5) y fibrocito a la célula en reposo, más madura. Estas células sintetizan la matriz extracelular, controlando su cantidad y composición. Poseen un núcleo ovoideo con uno o más nucléolos, un citoplasma extenso y basófilo, donde se observa un retículo endoplasmático rugoso bien desarrollado y un aparato de Golgi desde el cuál migra una gran cantidad de vesículas de secreción, organelos que se relacionan con la síntesis de moléculas precursoras del colágeno, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas de la matriz extracelular. Su forma varía dependiendo de la arquitectura de la matriz, a menudo se encuentran en una posición paralela a las fibras colágenas siendo células fusiformes con prolongaciones largas, delgadas y en su mayor parte ramificadas. El citoesqueleto se encuentra muy diferenciado. La actina y la actinina alfa están concentradas en la periferia celular donde también se detecta miosina, la cual se encuentra en la totalidad del citoplasma. Estos elementos estructurales permiten que el fibroblasto se mueva con una velocidad de 1 $\mu\text{m}/\text{min}$, a través de uniones débiles entre proteínas de membrana y componentes de matriz como fibronectina. Las funciones generales, así como la forma de estas células, dependen de las tareas específicas que deben cumplir según el órgano al cual pertenecen (Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental, 3° Edición, Gómez de Ferraris, 2009; Histología, 2° Edición, Ulrich Welsch, 2010).

Respecto a su proceso de envejecimiento, los fibroblastos poseen la capacidad de replicarse mediante divisiones mitóticas, con un tiempo lento de ciclo celular promedio de 20 hrs (Introducción a la Biología Celular, 2ª edición, Alberts B., 2006). En cultivos de fibroblastos de tejido embrionario, éstos pueden experimentar aproximadamente unas 50 divisiones antes de que adquieran una condición de senescencia y mueran. Sin embargo, este número se reduce a 20 cuando los fibroblastos provienen de tejido adulto (Pitaru et al., 1994).

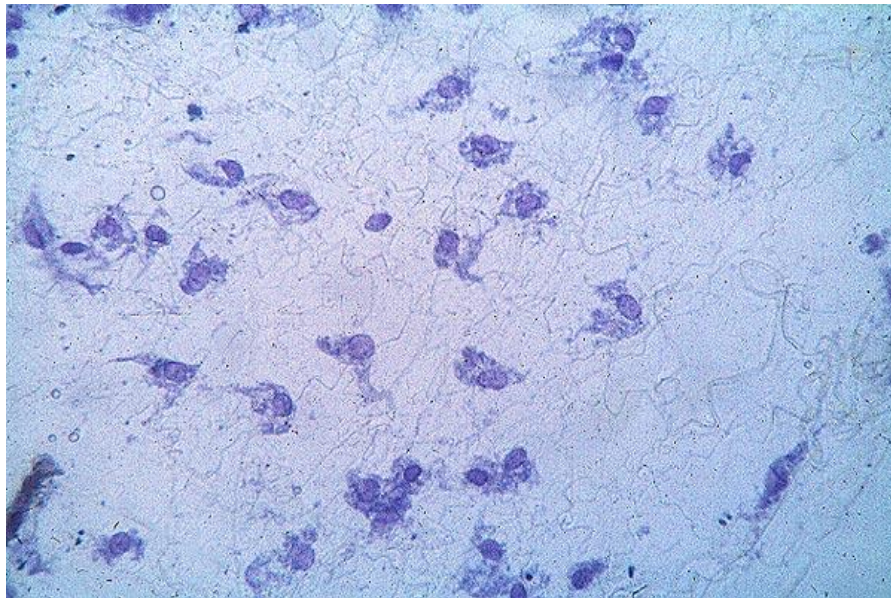


Figura 5. Fibroblastos en estado de alta actividad. (Fuente: *Histología UC. Tejido Conectivo: Fibroblastos y Fibrocitos. Escuela de Medicina Universidad Católica de Chile:*

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/histologiaweb/paginas/co21817.html>

La membrana plasmática del fibroblasto (Figura 6) contiene receptores, principalmente integrinas, que median las interacciones entre la célula y los componentes de su ambiente. Los receptores de superficie no solo interactúan con su medio externo, sino que además su extremo interno está conectado con varias proteínas citoplasmáticas. Los receptores con este tipo de unión doble son muy adecuados para transmitir mensajes entre las células y su ambiente. (Biología Celular y Molecular, 5º Edición, Karp, 2009)

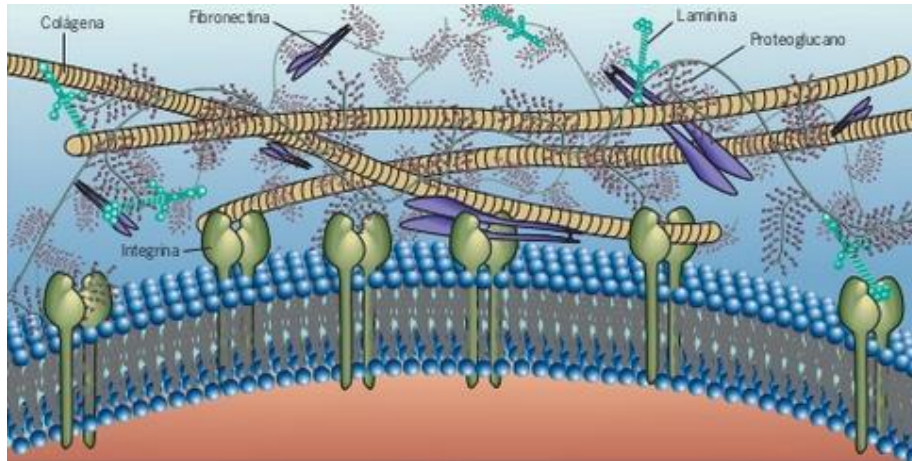


Figura 6. Organización macromolecular de la matriz extracelular: Las proteínas fibronectina, colágeno, y laminina contienen sitios de unión para unas y otras, además de sitios de unión para receptores (integrinas) que se localizan en la superficie de células como el fibroblasto, estos receptores se unen también a componentes intracelulares (Biología Celular y Molecular, Karp, 2009).

Diagramas esquemáticos de la interrelación de los mediadores químicos locales y circulantes y la activación del fibroblasto, Figuras 7, 8 y 9. Fuente: Inflamación, daño y reparación en enfermedades reumáticas, Marinovic, 2008:

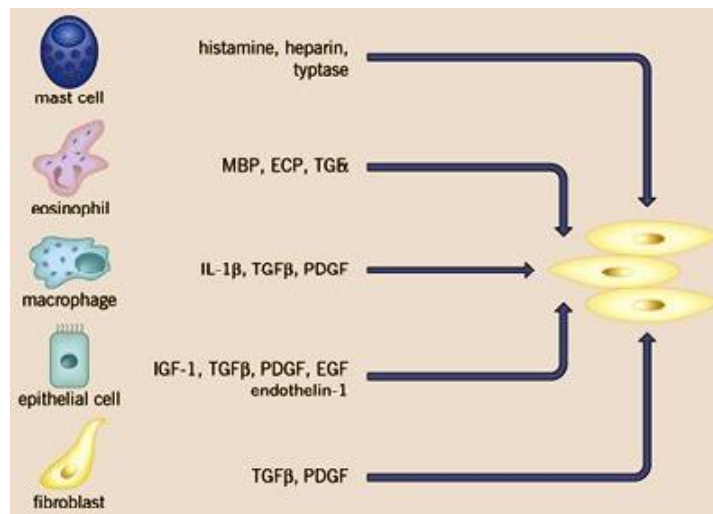


Figura 7. Células Proinflamatorias que promueven la activación y proliferación fibroblástica.

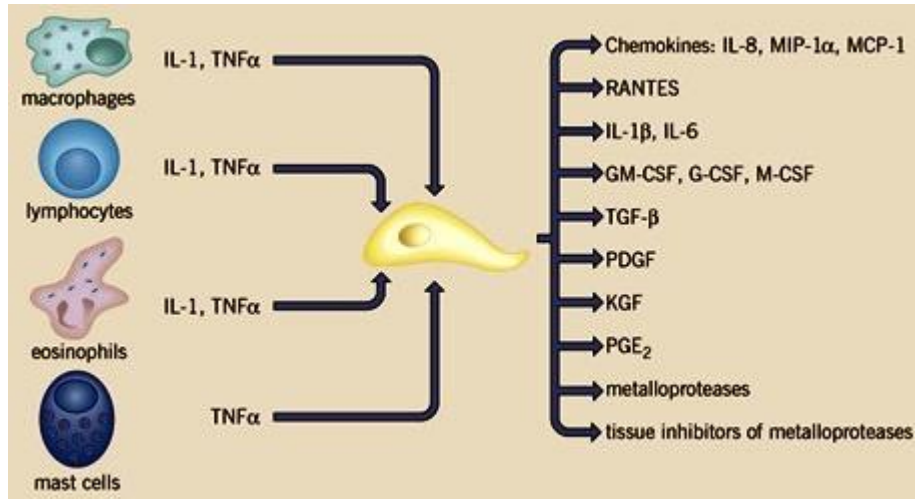


Figura 8. Productos inflamatorios de los fibroblastos activados.

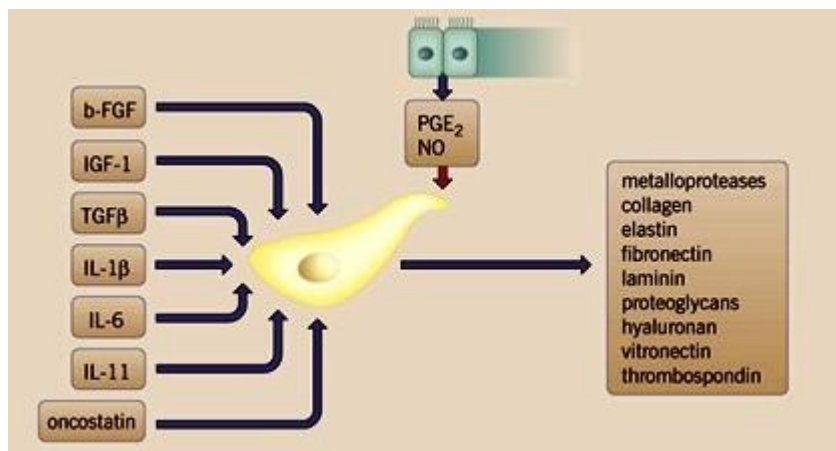


Figura 9. Componentes de la matriz extracelular producidos por los fibroblastos activados.

Cap. 1.4 Renovación del epitelio

El epitelio bucal experimenta una continua renovación. Su espesor se mantiene gracias al equilibrio entre la formación de células nuevas en las capas basal y espinosa y la exfoliación de las células viejas en la superficie. La actividad mitótica tiene una periodicidad de 24 horas; los índices más altos y bajos ocurren por la mañana y por la noche, respectivamente (Stern, 1967).

El índice mitótico es más alto en las zonas no queratinizadas y aumenta en la gingivitis, sin diferencias considerables por género. Las opiniones difieren respecto

de si el índice mitótico aumenta (Löe & Karring, 1969; Meyer et al., 1956) o disminuye (Barakat et al., 1969) con la edad.

En animales de experimentación, el índice mitótico varía en diferentes regiones del epitelio bucal, en orden descendente: mucosa bucal, paladar duro, epitelio del surco, epitelio de unión, superficie externa de la encía marginal y encía insertada (Anderson & Stern, 1966; Hansen, 1966; Löe & Karring, 1969; Trott & Gorenstein, 1963). Se informa que los periodos de recambio para distintas zonas del epitelio bucal de animales de experimentación son los siguientes: paladar, lengua y carrillo, cinco a seis días, encía, diez a doce días, con igual o mayor tiempo requerido con el paso de la edad, y epitelio de unión, uno a seis días (Beagrie & Skougaard, 1962).

CAPITULO II: HIPERPLASIA GINGIVAL

El término hiperplasia se refiere al aumento de tamaño de los tejidos en un órgano, producido por el aumento del número de sus componentes celulares (Caviglia et al., 2011). La hiperplasia gingival es una condición patológica benigna en la que aumenta de volumen el tejido gingival de forma lenta y gradual (Figura 10). Se clasifica como idiopática, inflamatoria, hereditaria y asociada a drogas, según su etiología (Guiducci et al., 2009).



Figura 10. Hiperplasia gingival. Se observa aumento de volumen en la encía con zonas eritematosas y gran cantidad de detritus (Fuente: The American Academy of Oral Medicine AAOM, disponible en

http://www.aaom.com/index.php?option=com_content&view=article&id=132:gingival-enlargement&catid=22:patient-condition-information&Itemid=120)

El aumento del tamaño de la encía es una característica frecuente de la enfermedad gingival. La terminología actual aceptada para esta lesión es agrandamiento gingival, siendo estrictamente descriptivo y evita connotaciones patológicas equívocas que se utilizaron en el pasado, como gingivitis hipertrófica o hiperplasia gingival. Las múltiples clases de agrandamiento gingival se clasifican según los factores causales y los cambios patológicos (Periodontología Clínica, Carranza, 2004):

- I. Agrandamiento gingival inflamatorio
 - a. Crónico
 - b. Agudo
- II. Agrandamiento gingival por fármacos
- III. Agrandamientos relacionados con enfermedades sistémicas
 - a. Agrandamiento condicionado
 - Embarazo
 - Pubertad
 - Deficiencia de vitamina C
 - Gingivitis plasmocitaria
 - Agrandamiento condicionado específico (granuloma piógeno)
 - b. Enfermedades sistémicas que son causa de agrandamiento
 - Leucemia
 - Enfermedades granulomatosas (granulomatosis de Wegener, sarcoidosis y otras)
- IV. Agrandamiento neoplásico (tumores gingivales)
 - a. Tumores benignos
 - b. Tumores malignos
- V. Agrandamiento falso

Se reconoce también que la hiperplasia gingival puede ser también de origen genético y estas lesiones se conocen como Fibromatosis gingival hereditaria. Es un trastorno poco común caracterizado por agrandamiento gingival difuso y que algunas veces recubre parcial o totalmente la superficie dentaria. Las lesiones se desarrollan independientemente de la eliminación de placa (Periodontología Clínica e Implantología Oral, Lindhe, 2009).

Estas patologías con gran frecuencia causan problemas psicológicos, masticatorios y estéticos (Vahabi et al., 2013).

Cap. 2.1 Hiperplasia inducida por fármacos

Es un efecto no deseado de ciertos fármacos de uso sistémico de tratamiento no dental. Se han reportado tres principales grupos de medicamentos como los

bloqueadores de los canales de calcio, inmunosupresores y anticonvulsivos (Sanjeev & Sucheta, 2013)

Las características clínicas comunes de las hiperplasias gingivales inducidas por fármacos incluyen variaciones entre pacientes en el patrón de agrandamiento, predisposición genética, tendencia a presentarse con mayor frecuencia en el sector anterior (Hassell & Hefti, 1991; Seymour et al., 1996), una mayor prevalencia en pacientes jóvenes (Esterberg & White, 1945; Rateitschak-Pluss et al., 1983; Hefti et al., 1994) y aparición dentro de los tres meses que siguen al comienzo del uso de la medicación (Hassell, 1981; Hassell & Hefti, 1991; Seymour & Jacobs, 1992). Usualmente primero aparecen en las papilas (Hassell & Hefti, 1991), aunque pueden presentarse en un periodonto con pérdida de hueso o sin ella, no se asocian con pérdida de inserción o mortalidad dentaria (Hassell & Hefti, 1991; Seymour et al., 1996).

Los principales cambios histopatológicos en la hiperplasia gingival corresponden a cambios fibróticos predominantes en el tejido conectivo, especialmente el colagenoso con un aumento de fibroblastos y acumulación de matriz extracelular y varios niveles de inflamación (más pronunciado en HG inducidas por ciclosporina), aumento de grosor del epitelio, con proliferación y elongación de las crestas. (Dongari – Bagtzoglou, 2004).

La droga que induce a lesiones con características más fibróticas corresponde a la fenitoína, siendo la ciclosporina la cual realiza lesiones menos fibróticas y las lesiones intermedias son provocadas por el nifedipino, todas estas producen hiperplasia gingival (Subrami et al., 2013).

Cap.2.2 Comparación histológica de tejidos gingivales (sano, inflamatorio e hiperplásico inducido por fármacos)

A continuación se exponen cortes histológicos de tejido gingival, los cuales presentan diferencias tanto a nivel del tejido epitelial como conectivo (Figuras 11 y 12).

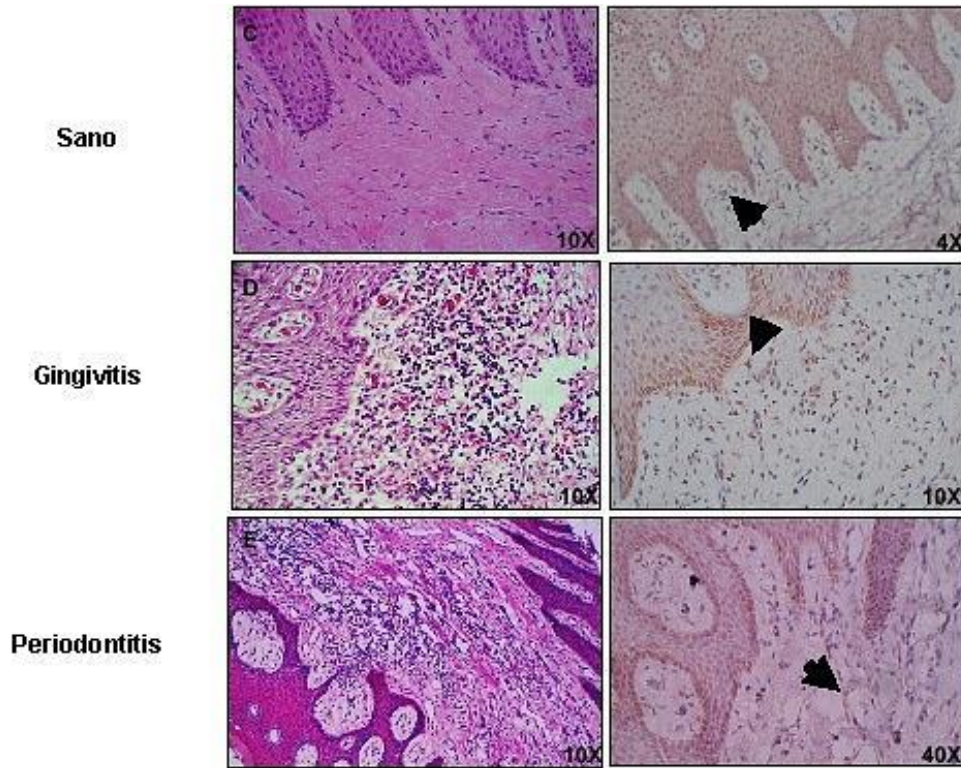


Figura 11. *Inmunohistoquímica de biopsias gingivales de pacientes con diferentes grados de enfermedad periodontal (Arce et al., 2007)*

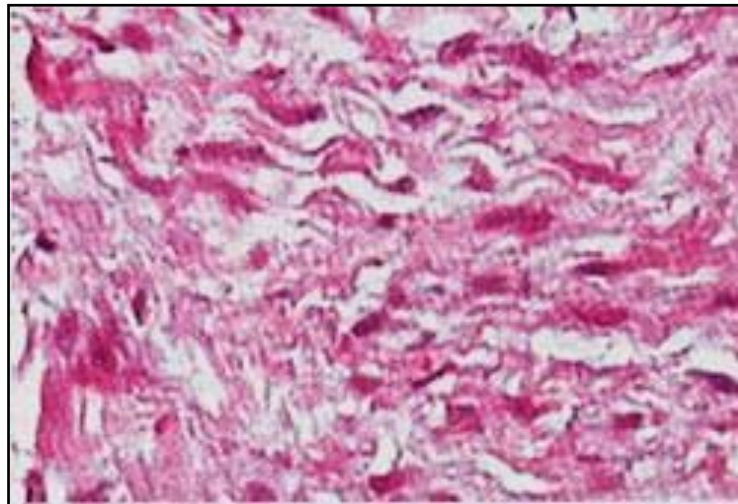


Figura 12. *Cortes del tejido conectivo gingival de paciente bajo terapia con fenitoína.*

Fuente: Influencia del tratamiento con Fenitoína sódica en el tejido gingival de pacientes epilépticos. Galarza et al., 2001. Rev. Per. Neurol.

CAPITULO III: FÁRMACOS INDUCTORES DE HIPERPLASIA GINGIVAL

El agrandamiento gingival inducido por fármacos ha sido descrito en asociación con varios tipos de drogas, principalmente con el anticonvulsivo Fenitoína, el inmunosupresor Ciclosporina y el bloqueador de canales de calcio Nifedipino (Oral and Maxillofacial Pathology, 3° Edición, Neville, 2009).

A pesar de que estos fármacos presentan distintos mecanismos de acción, las características clínicas e histológicas del agrandamiento gingival que inducen son similares (Kanno et al., 2008).

Se ha considerado que el agrandamiento gingival como efecto secundario a fármacos, se produce gracias a un programa persistente de reparación de tejido conectivo. Durante esta reparación, los fibroblastos activados sintetizan y remodelan una nueva matriz extracelular, gracias a la acción de mediadores químicos locales y circulantes, citoquinas o proteínas fibrogénicas y proteasas derivadas del mastocito. (Subramani et al., 2013). Al análisis tisular se observa la presencia de un incremento en la cantidad del estroma del tejido conectivo junto con una elevada presencia de fibras colágenas. (Correa et al., 2011). Este agrandamiento gingival estaría condicionado por la dosis del fármaco, tiempo de aplicación, identidad del fármaco, higiene oral y susceptibilidad individual (Subramani et al., 2013; Nakib & Ashrafi, 2011).

La prevalencia de la hiperplasia gingival es difícil de determinar exactamente para cada categoría de fármacos, debido a que los estudios disponibles han utilizado parámetros distintos. Considerando esta dificultad, se ha reportado que en pacientes que consumen Fenitoína, la prevalencia de hiperplasia gingival es en promedio del 50%, en el caso de los consumidores de bloqueadores de los canales de calcio, la prevalencia promedio es de 42%, y en pacientes que reciben terapia inmunosupresora la prevalencia es de 25-50% en adultos (Nakib y Ashrafi, 2011).

Cap. 3.1 Fármacos bloqueadores de los canales de calcio

Los canales de calcio voltaje dependientes constituyen la principal vía de entrada para el calcio en células excitables, tales como, las células musculares, neuronas y células de glándulas neuroendocrinas. El flujo selectivo de iones calcio a través del poro del canal, desencadena una gran variedad de procesos intracelulares, constituyendo de esta manera un enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas dentro de la célula, cumpliendo un importante papel en distintos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Izaguirre & Zavaleta, 1998).

Los medicamentos a los cuales se refiere este estudio, constituyen una clase importante de fármacos cardiovasculares que actúan por inhibición de los canales de calcio dependientes del voltaje de tipo L del músculo liso y el corazón. Hay tres subclases farmacológicas de bloqueantes de los canales de calcio, distintas en su estructura química: Fenilalquilaminas, Benzotiazepinas, y las Dihidropiridinas, subclase a la cual pertenece el Nifedipino (Farmacología en Odontología, 1° Edición, Tripathi, 2008).

El mecanismo de acción de estos fármacos es a través del bloqueo de la entrada de calcio a la célula, enlazándose con la subunidad α_1 de los canales lentos o L de la célula muscular lisa, especialmente de arterias y cardiomiocitos. La reducción de calcio intracelular impide que se forme el complejo Ca^{2+} - Calmodulina, no se activa la miosina y no interactúa con la actina; por tanto, no ocurre la contracción muscular y disminuye la resistencia periférica y la presión arterial. En el músculo cardíaco la falta intracelular de calcio, impide la formación del complejo Ca^{2+} -troponina, y permite la acción inhibitoria de ésta sobre el acoplamiento actina-miosina y la contracción muscular. En síntesis, el resultado corresponde a dilatación predominantemente arterial y cronotropismo e inotropismo negativos en el corazón, lo que los hace adecuados para el tratamiento de la hipertensión arterial, arritmias cardíacas, insuficiencia cardíaca, y la insuficiencia coronaria (Farmacología Médica, 1° Edición, Nicandro Mendoza, 2008).

Cap. 3.1.1 Nifedipino

El Nifedipino, ha sido utilizado extensamente para el tratamiento de la Hipertensión arterial y algunas formas de la angina de pecho. Como efectos adversos puede causar rubefacción, palpitaciones, cefalea y edema maleolar (Farmacología en Odontología, 1° Edición, Tripathi, 2008). Se ha descrito también, el agrandamiento gingival como efecto secundario periodontal más común a esta medicación (Fernandes et al., 2010).

Es una dihidropiridina de acción rápida con duración de breve. La vasodilatación arterial periférica producida por estos fármacos aumenta por vía refleja el tono simpático cardíaco, lo que aumenta la frecuencia y contractibilidad cardíacas y la velocidad de conducción aurículo ventricular. Ello explica por qué, a diferencia de las otras dos subclases, las dihidropiridinas no exhiben propiedades antiarrítmicas, es decir, tienen un efecto ionotrópico positivo como respuesta refleja. Respuesta que disminuye con el Nifedipino de liberación prolongada. No reducen la velocidad de recuperación del canal ni dependen de la frecuencia de estimulación, es decir no

ejercen acción cronotrópica negativa, a diferencia de los demás bloqueadores de los canales de Calcio (Farmacología Médica, 1° Edición, Nicandro Mendoza, 2008).

Las dihidropiridinas producen una rápida y potente reducción de la presión arterial, que activa por vía refleja los barorreceptores, aumentando el tono B1-adrenérgico cardíaco y la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El resultado es un aumento de la frecuencia, contractilidad, y el volumen minuto cardíacos, así como de los niveles plasmáticos de noradrenalina, renina y angiotensina II. Ello indica que las acciones reflejas predominan y enmascaran los efectos cardiodepresores directos de las dihidropiridinas (Guía de Hipertensión Arterial, 2° Edición, Hergueta et al., 2002).

Relación con Hiperplasia Gingival:

Existe evidencia que involucra fuertemente la Angiotensina II (Ang II) en el desarrollo de la hiperplasia gingival inducida por fármacos. La Ang II generada por los fibroblastos gingivales en respuesta al Nifedipino puede contribuir al agrandamiento de la encía, ya que ésta regula positivamente la expresión del Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-b1), a través del receptor de Angiotensina tipo 1 en fibroblastos gingivales, aumentando su proliferación. Estudios recientes indican que la Ang II y TGF-b1 no actúan de forma independiente el uno del otro, sino que actúan como parte de una red de señalización integrado que promueve la remodelación cardíaca y posiblemente fibrosis. Las vías de Ang II y TGF-b1 tienden a cooperar para impulsar respuestas fibrogénicas in vivo (Campbell & Katwa, 1997; Subramani et al., 2012).

El Nifedipino y la Fenitoína, aumentan también la producción de los Glicosaminoglicanos Heparán sulfato (HsgG) y Factor de Crecimiento básico de Fibroblasto (bFGF), elementos que contribuyen al agrandamiento gingival (Saito et al., 1999). También estimulan la formación de Endotelina-1 que tiene efectos mitogénicos, a partir de su acción sobre receptores ETA, de TGF-B y quimasa, esta última corresponde a una enzima derivada de mastocito que aumenta con la Ang II (Subramani et al., 2013).

Sin embargo, la patogénesis de la Hiperplasia gingival inducida por Nifedipino aún no está clara, y se ha descrito que en la respuesta gingival intervienen otros factores tales como: dosis del fármaco, tiempo de administración, medicación concomitante, pobre higiene oral, presencia de biofilm dental, susceptibilidad individual y factores genéticos, además de la interacción de la droga y metabolitos con los fibroblastos gingivales (Ellis et al., 1999; Eslami et al., 2004). El bloqueo del flujo de iones Calcio puede alterar el metabolismo del colágeno, alterando su síntesis y degradación por

parte de los fibroblastos, teniendo como consecuencia un crecimiento anormal de la encía (Lederman et al., 1984; Subramani et al., 2013).

El agrandamiento gingival inducido por Nifedipino (Figura 13) se caracteriza por el incremento de los fibroblastos gingivales y aumento de la matriz extracelular del tejido conectivo, presentando diversos grados de infiltrado inflamatorio crónico (Ellis et al., 1999).

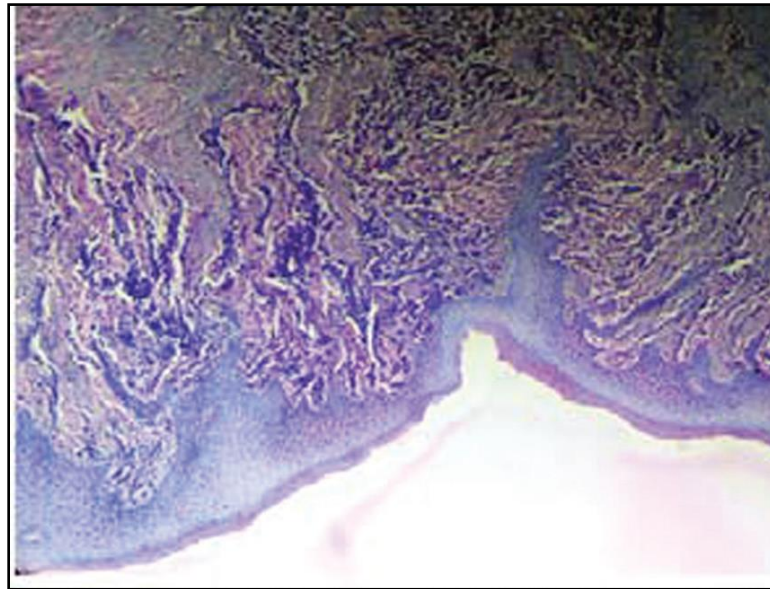


Figura 13. Histopatología (10x) que muestra el epitelio hiperplásico, con fibras colágenas densas y células inflamatorias (inflamación crónica) en el tejido conectivo (Sunil et al., 2010).

El estudio de Fernandes y colaboradores del 2010, utilizó un modelo de rata para evaluar la relación existente entre Nifedipino y destrucción periodontal. Las conclusiones de este estudio fueron que el Nifedipino por sí solo no causa agrandamiento gingival, debiendo necesariamente estar presente la acumulación de placa. Sin embargo, en este mismo estudio se citan diversos autores, que han comprobado que el Nifedipino induce a la hiperplasia gingival en ausencia de factores que favorezcan el deterioro de la salud periodontal, entre los autores se citan los estudios de Morizaki et al., 1993; Ozaki et al., 1998; Kataoka et al., 2001; Shimizu et al., 2002 y Spolidorio et al., 2004. Por otra parte, se concluye que el efecto de hiperplasia del Nifedipino es dependiente del tiempo de aplicación y este efecto es inversamente proporcional a la edad, es decir, mientras más joven el sujeto, más severa va a ser la hiperplasia gingival, esto atribuible al componente hormonal del individuo. Se determinó que la reacción adversa no es dosis

dependiente, ya que utilizando una dosis de 50 mg/kg/día (basándose en los estudios de Goncalves et al., y Spolidorio et al.) se obtuvo como resultado que a una dosis más baja, el efecto en el tejido gingival del Nifedipino era mínimo y una dosis mayor no aportaba ningún tipo de información, esto se contradice con estudios realizados por Fu et al., 1998 y Chiu et al., 2001 quienes observaron la variación de la severidad de la hiperplasia según las dosis del fármaco, y con el estudio de Ellis et al., 1993 y Sunil et al., 2013, donde se observó en el fluido crevicular un aumento de la concentración de Nifedipino de 15-316 veces en comparación con el plasma y a mayor concentración en el fluido crevicular gingival, mayor severidad del cuadro.

Cap. 3.2 Fármacos Antiepilépticos

Las Epilepsias constituyen un grupo de trastornos del SNC, que se caracterizan por la producción de disritmia cerebral paroxística, que se manifiesta como episodios breves (crisis) de pérdida o alteración de la conciencia, con o sin convulsiones, fenómenos sensoriales o psiquiátricos (Farmacología en Odontología, 1° Edición, Tripathi, 2008).

Las crisis epilépticas son debido a esta alteración funcional cerebral autolimitada, producto de una actividad anómala y excesiva de neuronas corticales, que producen descargas eléctricas sincrónicas. Las etiologías son diversas, pero comparten mecanismos de excitabilidad y falta de inhibición neuronal. Para desencadenar una crisis se requieren “células marcapasos”, éstas se diferencian de las demás neuronas por su potencial de membrana en reposo inestable, es decir, que después del potencial de acción persiste una corriente despolarizante. Las intervenciones terapéuticas apuntan a estabilizar el potencial de las neuronas y así reducen su excitabilidad (Farmacología: Texto y Atlas, 6° Edición, Lüllmann et al., 2010).

Según el mecanismo de acción tenemos principalmente (Farmacología Básica y Clínica, 18° Edición, Velásquez et al., 2008):

1. Fármacos que actúan sobre los canales de sodio que estabilizan la membrana neuronal, evitan la potenciación posttetánica, limitan el desarrollo de la actividad epiléptica máxima y reducen la progresión de la crisis. En este grupo se clasifica la Fenitoína, otros representantes son: Carbamacepina, felbamato, entre otros.
2. Fármacos que actúan sobre el sistema GABA (principal neurotransmisor inhibitorio) aumentando su concentración o potenciando su acción, en diferentes niveles:
 - Directamente sobre el receptor GABA: El cual tiene múltiples sitios de unión para benzodiazepinas y barbitúricos.

- Inhibiendo la recaptación del GABA.
 - Inhibiendo la GABA-transaminasa.
 - Actuando sobre la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) que transforma el glutamato en GABA.
3. Fármacos que actúan sobre el sistema glutamatérgico, uniéndose a los diferentes receptores del sistema que resulta en su inhibición (AMPA, NMDA, glicina, kainato).
 4. Fármacos que actúan sobre los canales T de Calcio.
 5. Fármacos con acción débil en los canales de potasio.

Cap. 3.2.1 Fenitoína

Es una hidantoína de farmacocinética no lineal, interacciones frecuentes y efectos secundarios a largo plazo, que van desde molestias gastrointestinales, hasta polineuropatías, osteoporosis, alteraciones de conciencia e hiperplasia gingival. Bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje, que gobiernan el período refractario de la neurona, evitando la activación repetitiva de la membrana. Su capacidad para inhibir selectivamente la descarga de alta frecuencia le confiere eficacia como tratamiento en neuralgia del trigémino así como arritmias cardíacas. Por otra parte, estimula la actividad del ATP en la bomba Na⁺/K⁺, disminuye la conductancia del calcio y aumenta la acción del GABA (Tripathi, 2008; Velásquez, 2008). El nivel sérico terapéutico es de 10-12 ug/ml y la ingesta de 20 mg/Kg puede causar toxicidad (Juan Carlos Ríos Phd, Guía de intoxicaciones, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile).

Relación con Hiperplasia Gingival:

La metabolización de la Fenitoína se realiza a través del sistema de citocromo p450 (CIPs) de los microsomas hepáticos, lo que sugiere, que el fármaco original se metaboliza a un metabolito reactivo, éste puede reaccionar con constituyentes celulares y causar lesiones tisulares, lo que deriva en una respuesta inflamatoria proliferativa. Existen dos posibles explicaciones al respecto: La unión de estos metabolitos reactivos a proteínas provocan la desnaturalización de las mismas, esto puede provocar una injuria celular directa, provocando la muerte celular desencadenando una respuesta inflamatoria, o bien, esta respuesta inflamatoria puede derivar de una respuesta inmune citotóxica a las proteínas desnaturalizadas (Zhou et al., 1996).

Zhou et al., en 1996 encontraron altas concentraciones de varios CIPs en la mucosa oral que activan el metabolismo oxidativo de la Fenitoína, estas concentraciones eran

50 veces mayores a las encontradas en los microsomas hepáticos. Concluye que la hiperplasia gingival puede producirse gracias a la metabolización del fármaco a nivel de tejido gingival (apoyado por la presencia de CIPs), proceso favorecido por las características de la mucosa oral, que a pesar de tener origen ectodérmico no es lo suficientemente cornificada para constituir una barrera eficiente a los agentes tóxicos ingeridos.

La concentración sérica de los CIPs, tal como el CYP2C₉ podría ser utilizado como un factor predictivo del desarrollo y severidad de hiperplasia gingival (Soga et al., 2004)

El principal metabolito reactivo derivado de la metabolización de la Fenitoína es el 4-HPPH ((4-hidroxifenil) 5-fenil-hidantoína). La hiperplasia gingival se ha relacionado directamente a su concentración sérica (Kamali et al., 1999).

Por otra parte, otros mecanismos por los cuales la Fenitoína podría inducir la hiperplasia gingival, según los estudios de Vahabi et al., 2013 y Subramani et al., del mismo año, son:

- Aumenta los niveles de TGF- β 1: Disminuye la actividad proteolítica del fibroblasto, promoviendo la síntesis de matriz extracelular y la formación de colágeno tipo I,III,VI y X, suprime la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) e inhibe su acción, induce potencialmente el Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) y la Endotelina-1.
- CTGF/CCN2: En la hiperplasia inducida por Fenitoína se han observado altos niveles de este factor, que contribuye a la regulación de genes de la matriz extracelular, estimulando la producción y mantención de la fibrosis. Por lo que la hiperplasia manifiesta características fibróticas más que inflamatorias.
- Angiotensina II (Ang II) y Endotelina-1 (ET-1): La inducción es mediada por el Ang II receptor-1 y ETA en los fibroblastos gingivales, teniendo efecto proliferativos. La ET-1 potencia la respuesta fibrogénica al TGF- β .
- Quimasas derivadas del mastocito: Aumentan en la transformación de Ang I en Ang II, aumentada por Fenitoína, a su vez, estimulan la liberación de gránulos intracelulares con TGF- β , y estimula la formación de ET-1, que tiene efectos mitogénicos en el fibroblasto.

- Aumenta la expresión del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF-AB/BB), el cual aumenta la proliferación del fibroblasto y la producción de matriz.
- Altera la acción de enzimas fibroblásticas tales como Lisil oxidasa promoviendo la acumulación de colágeno.
- Incrementa el FGF (factor de crecimiento de fibroblasto) cambiando el metabolismo del receptor, alterando la reparación y degradación del tejido conectivo.

La Hiperplasia gingival inducida por Fenitoína se caracteriza histológicamente por un epitelio escamoso estratificado, acantosis y prolongaciones epiteliales. En el tejido conectivo se observan fibras colágenas densas y numerosas, además de fibroblastos (Figura 14a). En algunos casos pueden observarse células inflamatorias lo que se relaciona clínicamente a la presencia de placa bacteriana (Figura 14b) (Galarza et al., 2001).

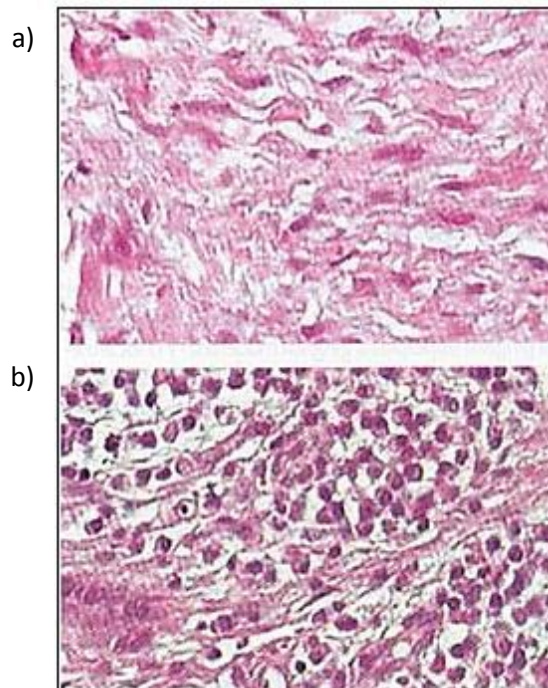


Figura 14. a) Hematoxilina-eosina 40x: abundantes fibroblastos y fibras colágenas. b) Hematoxilina-eosina 40x: Infiltrado inflamatorio crónico (Fuente: *Influencia del tratamiento con Fenitoína sódica en el tejido gingival de pacientes epilépticos. Galarza et al. Rev. Per. Neurol, 2001.*)

La hiperplasia gingival se ve intensificada gracias a una higiene oral deficiente, sin embargo, el control de este factor, si bien disminuye el problema, no evita su aparición (Cornacchio et al., 2011).

Cap. 3.3 FÁRMACOS Inmunosupresores

Son agentes que inhiben la respuesta inmunológica celular, humoral o ambas, y su principal indicación es el trasplante de órganos y las enfermedades autoinmunitarias. Entre ellos están:

- Inhibidores específicos de las células T: También llamados inhibidores de la calcineurina. En este grupo se clasifica a la Ciclosporina y Tacrolimus.
- Fármacos citotóxicos: También llamados antimetabolitos y antiproliferantes. Actúan sobre los linfocitos T. Ejemplos: Azatioprina, Ciclofosfamida.
- Glucocorticoides: Inhibición de monocitos, macrófagos, basófilos, linfocitos y células endoteliales. Producen la disminución de todos los factores que median la reacción inflamatoria.
- Anticuerpos

Cap. 3.3.1 Ciclosporina

Este fármaco se aprobó el 12 de mayo del año 2000 por la FDA, es un polipéptido cíclico de once aminoácidos, que fue presentado en 1977 como un inmunosupresor altamente selectivo, éste se obtiene a partir de la especie de hongo *Beauveria nivea*. El mecanismo de acción de la Ciclosporina, es suprimir selectivamente la inmunidad mediada por células. Preferencialmente, inhibe el disparo de la transducción de señal por antígeno en linfocitos T, reduce la expresión de interleucinas como IL-2 y la expresión de proteínas antiapoptóticas.

Se une en el citosol de las células diana con el receptor citoplasmático ciclofilina formando un complejo. Este complejo Ciclosporina/Ciclofilina se une a la enzima calcineurina (interacción física), inhibiendo la desfosforilación estimulada por Calcio, del componente NFAT (factor nuclear de células T activadas). Según lo expuesto en el estudio de Quesada y Redondo, en el 2003, la desfosforilación del NFAT produce su traslocación al núcleo, el aumento de afinidad con el ADN y la inducción de la actividad trascricional de IL-2 y otras linfocinas. Por lo tanto, prevenir la

desfosforilación del NFAT provoca una falla en la respuesta de los linfocitos T a la estimulación antigénica. La Ciclosporina también incrementa la expresión del Factor Transformante (TGF- β) potente inhibidor de la proliferación de linfocitos T estimulados por IL-2 y de la generación de células T citotóxicas.

A pesar de la acción inmunosupresora, la Ciclosporina deja en el receptor suficiente actividad inmunológica como para combatir infecciones bacterianas. No tiene efecto tóxico sobre la médula ósea o en el sistema reticuloendotelial, y la inmunidad humoral permanece indemne. Sin embargo es nefrotóxica y altera la función hepática. Otros efectos adversos son el aumento sostenido de la presión arterial, infecciones oportunistas, hiperpotasemia, hirsutismo, precipitación a diabetes, temblor y convulsiones (Farmacología en Odontología, 1º Edición, Tripathi, 2008; Farmacología Médica, 1º Edición, Nicandro Mendoza, 2008).

Relación con Hiperplasia Gingival:

Como se expone en los estudios de Subramani et al., Salman et al., Vahabi et al., todos publicados en el año 2013, en la patogénesis de la hiperplasia gingival inducida por Ciclosporina se aceptan como mecanismos: La heterogenicidad funcional del fibroblasto, la promoción de la síntesis de matriz extracelular, principalmente la síntesis de colágeno o desequilibrio en la homeostasis del tejido conectivo, estos fenómenos son desencadenados gracias a los siguientes efectos de la Ciclosporina:

- Aumenta los niveles de TGF- β .
- Aumenta los niveles de FGF.
- Suprime la expresión de metaloproteinasas de matriz y catepsina (Proteína con actividad fibrinolítica).
- Aumenta la expresión de IGFBP5: Proteína de unión que modula la expresión del receptor IGFR1, favoreciendo el incremento de IGF-1 (Factor de crecimiento dependiente de insulina), el cual, disminuye la acción de la colagenasa, reduce la apoptosis del fibroblasto y aumenta la síntesis de colágeno.
- Aumenta los niveles de PDFG.
- CTGF/CCN2: Los niveles de este factor de crecimiento en comparación con los otros fármacos descritos, presentes en la hiperplasia gingival inducida por Ciclosporina, son bajos, lo que determina las características inflamatoria por sobre las fibróticas en esta reacción adversa.

- Aumenta los niveles de IL-6 e IL-8: La IL-6 participa en la renovación del tejido gingival y estimula la producción del inhibidor de metaloproteinasas de matriz. La IL-8 tiene efecto quimiotácticos sobre células inflamatorias, por lo tanto se concluye que existe un reclutamiento de células mononucleares en el tejido gingival, durante la medicación con Ciclosporina.

La aparición de hiperplasia gingival es independiente de la presencia de inflamación gingival, pero esta inflamación inducida principalmente por biofilm bacteriano, puede incrementar la acción de la Ciclosporina en el fibroblasto magnificando la respuesta y produciendo la hiperplasia. La acción de la Ciclosporina sumada a la presencia de LPS (liposácarido bacteriano) promueven la proliferación del fibroblasto y la acumulación de matriz (Guo et al., 2008). Además de la condición periodontal, el tratamiento con Ciclosporina generalmente va acompañado de agentes como la azatioprina y bloqueadores de los canales de calcio, lo que aumentaría las posibilidades de desarrollar la hiperplasia y aumentaría la severidad (Cota et al., 2010).

El efecto anti-apoptótico de la Ciclosporina y que podría también producir hiperplasia, ha sido poco estudiado, sin embargo, se cree que es tiempo-dependiente (el efecto disminuye cuando avanza el tratamiento), y uno de los mecanismos estudiados ha sido el bloqueo de las células Natural Killer que cumplen un importante rol en la apoptosis (Alaaddinoglu, 2005).

Las características histopatológicas de la Hiperplasia Gingival inducida por Ciclosporina (Figura 15) consisten en una excesiva proliferación fibroepitelial, asociada a un elongamiento de las crestas epiteliales que penetran en el tejido conectivo con presencia de distintos grados de infiltración inflamatoria de carácter crónico (Seymour et al., 1996).

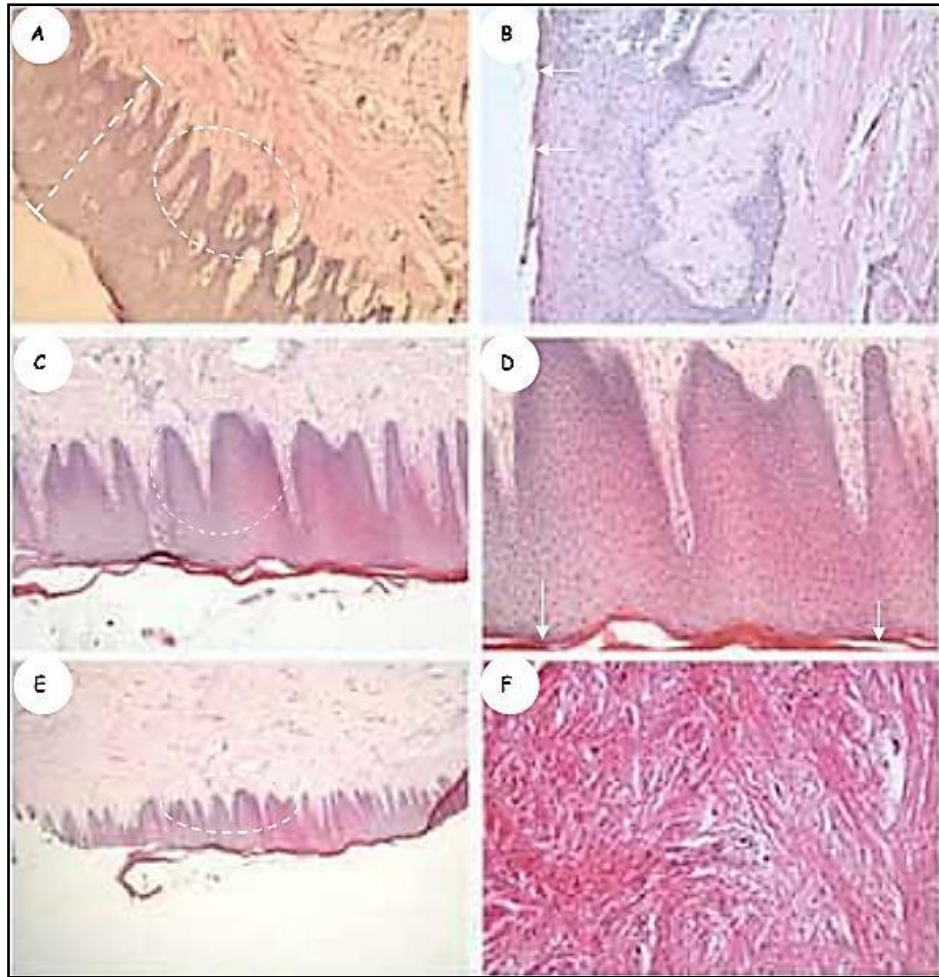


Figura 15. Imágenes de microscopía óptica de encía de paciente sometido a terapia con Ciclosporina A: Aspecto general de la histología de la encía. X100. B: Se destaca que el epitelio estratificado muestra unas crestas epiteliales alargadas que se interdigitan con las papilas conectivas de la lámina propia y que son un signo de agrandamiento gingival. X200. C: Epitelio acantótico con la capa córnea queratinizada, unas crestas epiteliales muy profundas y un conectivo con fibras conectivas. X100. D: Detalle de la imagen anterior a mayor número de aumentos. X200. E: Imagen general de sección en la que se observan las invaginaciones de la capa basal del epitelio en contacto con el conectivo subyacente. X40. F: Se aprecia el elevado componente fibroso de la lámina propia, muy característico del AG y que probablemente son haces de fibras de colágeno. X200. Todos los aumentos de las secciones son originales (Fuente: Tesis Doctoral, Albert Ramírez, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, 2007).

CAPITULO IV: TECNICAS DE ESTUDIO

Cap. 4.1 Cámara de Bioseguridad (CBS)

Están diseñadas para proteger al trabajador, la atmósfera del laboratorio y los materiales de trabajo de la exposición a las salpicaduras y los aerosoles infecciosos que pueden generarse al manipular material que contiene agentes infecciosos, como cultivos primarios, soluciones madre y muestras de diagnóstico (Figura 16). Los aerosoles se producen en cualquier actividad que transmita energía a un material líquido o semilíquido, por ejemplo, al agitarlo, verterlo a otro recipiente, removerlo o verterlo sobre una superficie o sobre otro líquido. Las actividades como la siembra de placas de agar, la inoculación de frascos de cultivo celular con pipeta, el uso de pipetas múltiples para dispensar suspensiones líquidas de agentes infecciosos en placas de microcultivo, la homogeneización y la agitación vertical de material infeccioso, y la centrifugación de líquidos infecciosos o el trabajo con animales pueden generar aerosoles infecciosos. Las partículas de aerosol de menos de 5mm de diámetro y las pequeñas gotículas de 5 a 100mm de diámetro no son visibles a simple vista. El trabajador no suele darse cuenta de que se están produciendo esas partículas, que pueden ser inhaladas o provocar la contaminación cruzada de los materiales que se encuentran sobre las superficies de trabajo. Las CBS, cuando se utilizan debidamente, han demostrado ser sumamente eficaces para reducir las infecciones adquiridas en el laboratorio y la contaminación cruzada de cultivos por exposición a aerosoles, además protegen la atmósfera del laboratorio (OMS, 2005).

Las CBS cumplen tal función mediante flujos direccionados de aire filtrado a través de unidades HEPA. Dentro del área de trabajo el aire es estéril y circula de arriba hacia abajo. Por lo tanto, hay que resaltar que las CBS son equipos que ofrecen tanto protección al trabajador y su entorno, como protección al material biológico-infeccioso que se manipula en su interior, mediante flujos de aire direccionados y filtrados con alta eficiencia (Sevilla, 2009).



Figura 16. Imagen de Cabina de Bioseguridad Clase II tipo B2. La misma utilizada para esta investigación
(Fuente: http://www.kossodo.com/detalle.php?id_producto=87)

Cap. 4.2 Medio de Cultivo: DMEM+F12+ Glutamax

Es un medio basal ampliamente utilizado para apoyar el crecimiento de muchas células de mamífero diferentes. Las células cultivadas con éxito en DMEM/F-12 incluyen MDCK, células gliales, fibroblastos, células endoteliales humanas, y fibroblastos de rata. DMEM/F-12 es una mezcla 1:1 de DMEM y nutriente Ham F-12. Esta formulación de DMEM combina altas concentraciones de glucosa, aminoácidos y vitaminas con una amplia variedad de componentes F-12. DMEM/F-12 con suplemento GlutaMAX™ minimiza la acumulación de amoníaco tóxico y mejora la viabilidad celular y el crecimiento en un formato fácil de usar. DMEM/F-12 no contiene proteínas, lípidos, o factores de crecimiento. Por lo tanto, DMEM/F-12 puede requerir la administración de suplementos, comúnmente 10% de suero fetal bovino (FBS). DMEM/F-12 utiliza un sistema de tampón de bicarbonato de sodio y por lo tanto requiere un ambiente de CO₂ 5-10% para mantener el pH fisiológico (Lifetechnologies, 28 julio 2014, <http://www.lifetechnologies.com/cl/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-Culture/classical-media/d-mem-f12.html>).

Cap. 4.3 Buffer Fosfato Salino (PBS):

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. Esta solución es empleada comúnmente para lavar

células a través de centrifugación (Protocolos y Métodos. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina UASLP. 22 mayo 2008).

Cap. 4.4 Incubador CO2 Thermo Scientific Forma Series 310:

Incubadora de CO2 de 184L de capacidad es una cámara de acero pulido diseñada con esquinas cóncavas para facilitar la limpieza. Posee tecnología de calor directo probada, que se beneficia de la combinación de elementos de calefacción de alto rendimiento y aislamiento avanzado que rodea la cámara. Las muestras se benefician de una excelente uniformidad de la temperatura. Posee un Sistema de flujo de aire a través de filtro HEPA que maneja constantemente la calidad del aire dentro de la cámara para proteger cultivos contra contaminación en el aire, cumpliendo la norma de calidad del aire Clase 100 (ISO Clase 5) que se logra en cinco minutos después de cada apertura de la puerta (Thermo Scientific CO2 Incubators, pág15).

Cap. 4.5 Tripsina

Se obtiene a partir de páncreas porcino o bovino; su función básica es la digestión de las proteínas de adherencia. Es ampliamente usada ya que permite dispersar una gran variedad de células. Se utiliza sola, combinada con otras enzimas o con agentes quelantes de calcio para potenciar su actividad. La enzima puede neutralizarse por competición con las proteínas del suero bovino fetal (Editorial Biogénesis, 28 de julio de 2014, <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>).

Cap. 4.6 Técnica de exclusión celular mediante Azul de Tripán y Cámara de Neubauer

El azul tripán (azul diamina, azul niágara, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Este colorante es uno de varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul tripán no es necesario para realizar conteos simples de células pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras (Protocolos y Métodos. Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina UASLP. 22 mayo 2008. http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf).

Cámara Neubauer (hematocitómetro): Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado, subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. (Figura 17)

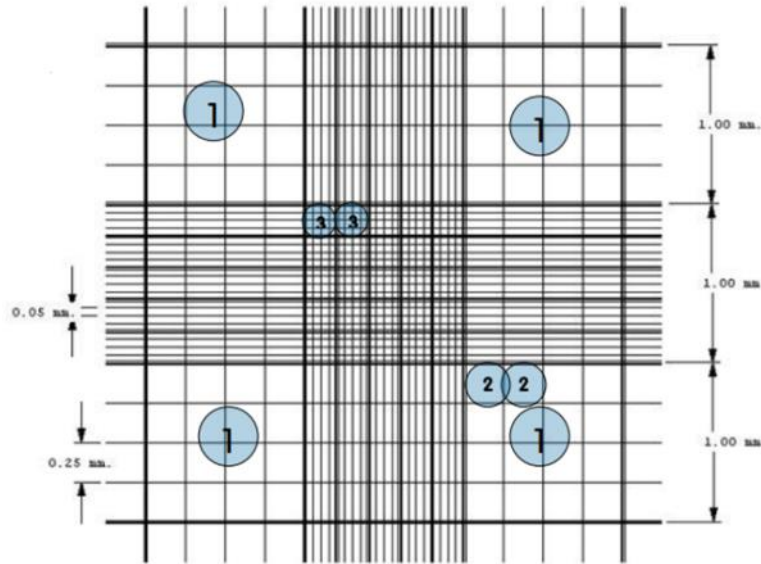


Figura 17. Porción central de la Cámara de Neubauer dividida en 9 cuadrados. Sectores con n° 1 corresponden a los cuatro cuadrados donde se realizará el conteo celular. Cada uno de ellos está dividido en 16 partes (n°2). Sectores con n°3 corresponden a lugares excluidos.

El cubreobjetos es un cuadrado de cristal de aproximadamente 22 mm x 22 mm. Debe colocarse sobre la cámara de recuento de forma que cubra la parte central de la cámara, delimitando un espacio entre la cámara y el cubreobjetos de 0,1 mm.

El rango de concentraciones que permite contar el hematocitómetro está entre 250.000 células y 2,5 millones de células por ml. La cantidad óptima de células es de un millón por ml (10^6 /ml) (Technical Note- Neubauer Chamber Cell Counting, Oscar Bastidas).

4.7 Método fluorométrico de Resazurina

Este método fue introducido como un indicador de viabilidad celular no tóxica que puede ser utilizado para monitorear la proliferación celular y citotoxicidad. El método es descrito como un indicador de óxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como

de bacterias (Rasmussen, 1999; Benavides et al., 2004). El ensayo de reducción con resazurina hace relativamente poco tiempo ha sido utilizada en la valoración de la proliferación celular y citotoxicidad en diferentes tipos de células como fibroblastos, linfocitos humanos y de ratones, cultivos primarios de células neuronales y líneas tumorales (O'Brien et al., 2000).

La resazurina es poco tóxica para las células ya que el producto de oxidación llamado resorufina, se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce muerte, como sí ocurre en otras técnicas. Además, este método lo describen como sensible y altamente reproducible (Escobar et al., 2009).

La resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resorufina (rojo altamente fluorescente) por oxido-reductasas que se encuentran principalmente en las mitocondrias de las células vivas. Así, la medida de fluorescencia obtenida de la resazurina es un indicador de función mitocondrial (Zhang et al., 2004).

4.8 Appliskan®, Thermo Scientific

Lector de microplacas multi-modal basado en filtros para investigación con aplicaciones fotométricas, luminométricas y fluorométricas, tales como: Citotoxicidad, actividad proteica, proteínas y ácidos nucleicos y ensayos de inmunología y multiplexación. Estos instrumentos pueden trabajar con placas de 6 a 384 pocillos y cuentan con un agitador interno, una incubadora, y hasta dos dispensadores. Los tipos de medición que se pueden realizar incluyen la intensidad de fluorescencia, fluorescencia emitida en el tiempo, polarización de fluorescencia, absorbancia, y la luminiscencia.

El rendimiento excepcional en cualquier aplicación, está basado en sistemas de detección separados para diferentes tecnologías de medición. El modo de alta sensibilidad para luminometría utiliza un tubo fotomultiplicador especializado para asegurar una excelente sensibilidad. La fuente de luz de xenón constante y eficiente cubriendo longitudes de onda por sobre los 820 nm, proporciona una alta sensibilidad y amplio rango dinámico lineal en todas las aplicaciones fluorométricas, incluso con fluorocromos sensibles al rojo y exigentes aplicaciones TR-FRET. El sistema óptico diseñado especialmente para la fotometría cubre longitudes de onda desde los 200 a los 1000 nm, lo que permite una excelente linealidad, exactitud y repetibilidad, en cualquier aplicación fotométrica.

Los instrumentos se controlan mediante avanzados SkanIt® Software que proporciona el diseño de fácil análisis, manejo de datos flexible y conveniente

formato de informe, incluso con aplicaciones exigentes (Instrumentos de detección, pág. 9, www.thermo.com).

CAPITULO V: DEFINICION DE LAS VARIABLES

Este capítulo tiene como finalidad dejar en claro aquellas variables que serán estudiadas y evaluadas en esta investigación, de manera de facilitar la comprensión de Materiales y Métodos, como Resultados y Conclusiones de este estudio.

5.1 Microdosis farmacológica

Los estudios de microdosis son una herramienta poderosa para la comprensión de la farmacocinética de los fármacos candidatos para ser usados en los seres humanos, y para la toma de decisiones racionales en la selección de compuestos en relación a la absorción adecuada, disposición, metabolismo, y propiedades de eliminación (ADME) antes de iniciar los ensayos clínicos laborioso y que requieren mucho tiempo (Maeda & Sugiyama, 2011).

De acuerdo con los protocolos para estudios de microdosis, una **microdosis** se define como 1/100avo de la dosis farmacológica y debe ser no más de 100µg (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003; Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, 2008; US Department of Health and Human Services, Food, Drug Administration, 2006).

5.2 Concentración de DMSO: El dimetilsulfóxido (DMSO, CH₃SOCH₃) se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para fabricación de papel, y es líquido a temperatura y presión ambientes. Descubierta por Saytzeff en 1866, se usó como solvente orgánico a partir de la década de 1940, y como criopreservante a partir de 1961 (Dujovny et al., 1983).

Es aprótico (disolventes polares que no tiene enlaces O-H o N-H) en razón de la separación de cargas entre el oxígeno y el azufre, y, por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos. Puede formar complejos en sistemas biológicos con cationes metálicos, biomoléculas (hormonas, enzimas, eicosanoides) y drogas, al asociarse con pares de electrones no compartidos en aminas, alcoholes, ésteres y ácidos (Kharasch et al., 1983).

DMSO es utilizado en las reacciones químicas en cadena de la polimerasa (PCR), entre otras, y como un agente vitrificante crioprotector para la preservación de

células, tejidos y órganos. Además se utiliza en los medios de congelación celular para proteger las células de lesiones mecánicas inducidas por los cristales de hielo. Es de uso frecuente en combinaciones con suero bovino fetal (Sigma Aldrich, 28 de julio 2014, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d2650?lang=es®ion=CL>).

5.3 Proliferación celular

Esta implica la división mitótica de una célula, luego de la duplicación de su material genético, para dar origen a dos células que, normalmente, son idénticas a la progenitora. El aumento en el número de células de un determinado tejido es inherente a la proliferación (Canepa, 2007).

Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica. El genoma codifica un conjunto complejo de proteínas que regulan la división celular y por tanto la proliferación de las células. Asimismo cada tipo celular presenta una serie de receptores de factores de crecimiento característicos que también regulan la proliferación celular al controlar la respuesta a tales factores. El proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característico. Este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder a cada tipo de estímulo. (Portal Medicina molecular de FIBAO, 2008. www.medmol.es/glosario/104)

HIPOTESIS

“La aplicación de tres microdosis diferentes de los fármacos Ciclosporina, Fenitoína y Nifedipino sobre cultivos de fibroblastos gingivales humanos a los 4, 8 y 12 días, producen un aumento significativo en la proliferación celular, proporcional al tiempo y a la dosis, en comparación con los grupos control de fibroblastos gingivales en medio de cultivo”.

OBJETIVOS

Objetivo General: Identificar la microdosis farmacológica de cada medicamento inductor de hiperplasia gingival, con mayor efecto proliferativo sobre fibroblastos gingivales humanos in vitro posterior a la aplicación del fármaco al 4^{to}, 8^{vo} y 12^{vo} día de experimentación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Calcular el porcentaje de proliferación de cada microdosis farmacológica en el día 4, 8 y 12 de medición, para la obtención del porcentaje de proliferación promedio.
- Evaluar comportamiento de la variación de los porcentajes de proliferación a través del tiempo, según las microdosis farmacológicas aplicadas.
- Comprobar si existe una proporcionalidad directa entre microdosis farmacológica y porcentaje de proliferación.
- Valorar los posibles efectos del solvente DMSO según la experiencia del estudio.

MATERIALES Y METODOS:

Diseño de investigación:

Es un estudio experimental que corresponde a un Ensayo Pre- Clínico Controlado.

Según la HRCS, la clasificación de este estudio corresponde a 5.1: *Descubrimiento y desarrollo de intervenciones terapéuticas y pruebas en sistemas de modelos y configuraciones preclínicas*. Esto se justifica porque se evaluarán los efectos de medicamentos sobre cultivo de fibroblastos gingivales, y la respuesta de dichas células ante la exposición a estas drogas. Además como se especifica en la introducción, la finalidad de este estudio pre-clínico, es que con los resultados obtenidos, se evalúe en futuras investigaciones, las aplicaciones terapéuticas de estos fármacos en la resolución de secuelas de enfermedad periodontal u otras necesidades rehabilitadoras en odontología.

Marco espacio – temporal:

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las dependencias del Laboratorio de Química Fisiológica e Inmunología perteneciente al Departamento de Química, en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Bajo la supervisión de un experimentado equipo de trabajo dirigido por la Profesora Caroline Weinstein Oppenheimer químico-farmacéutico y PhD en microbiología e inmunología en East Carolina University. Dentro de las áreas de especialización de la Profesora Weinstein se incluyen los cultivos celulares y la ingeniería de tejidos.

La metodología de trabajo comprende dos etapas: Capacitación y Ejecución. La etapa de capacitación se realizó durante el mes de Diciembre 2013 y Enero-Febrero 2014, período en el cuál los operadores aprendieron sobre el funcionamiento de los equipos, el manejo correcto del instrumental de laboratorio, protocolos de seguridad y utilización de materiales e insumos. Durante esta etapa se realizó una prueba piloto a modo de entrenamiento, descrita a continuación (todos los procedimientos aquí mencionados están especificados más adelante en “Desarrollo del Experimento”):

Prueba Piloto: En primera instancia se realizó la obtención de cultivos de fibroblastos gingivales humanos, a partir de fibroblastos gingivales criopreservados pertenecientes a la reserva celular del laboratorio. Posteriormente a los procesos de descongelación y centrifugación, se depositaron las células en un frasco de cultivo T-75 Falcon y se colocaron en el incubador durante 48 hrs. Una vez cumplido el plazo se comprobó la adherencia celular a la superficie de cultivo, observando al microscopio óptico. Cuando el frasco T-75 estuvo confluyente se realizó la

tripsinización, proceso que permite el desprendimiento celular y su retiro del frasco de cultivo. Luego, las células fueron centrifugadas y contabilizadas (mediante la técnica de exclusión por azul de tripán) utilizando una cámara de Neubauer. Luego de cada tripsinización, se sembraron 2 placas por lo que se realizaron 3 conteos en la cámara de Neubauer, con la participación de ambos operadores. Para reforzar el conteo celular el Profesor Mauricio Reyna permitió contabilizar al microscopio óptico fibroblastos utilizados en otras investigaciones. Es importante destacar que en esta experiencia se observó la confluencia de los fibroblastos en el frasco T-75 Falcon entre el 3° y 4° día de cultivo.

A través de ejercicios de química básica se calcularon las diluciones del fármaco Nifedipino, obteniendo de esta forma las microdosis farmacológicas requeridas. Se realizó la siembra de las placas con 5000 células por pocillo y la aplicación del fármaco. Posteriormente y cumplidos los intervalos de tiempo establecidos para el estudio, se aplicó rezasurina y se midió la proliferación.

Esta es una etapa de aprendizaje y familiarización de los operadores con el equipo de trabajo y el entorno. Así como también una instancia para desarrollar las destrezas necesarias en la manipulación del instrumental y equipos.

Etapa de Ejecución: Se realizó entre el mes de Mayo y Julio 2014. En este período se obtuvo la muestra de encía marginal, se realizaron los cultivos de fibroblastos gingivales, la obtención de las microdosis farmacológicas, el experimento propiamente tal, para finalizar con el análisis de datos, discusión de resultados y conclusiones.

Sujetos:

Criterios de inclusión:

- Muestra de tejido gingival obtenida durante el año 2013-2014
- Fibroblastos obtenidos a partir de tejido gingival de paciente adulto sano

Variables:

VARIABLES	Según relación entre variables	Naturaleza	
Fármacos (Ciclosporina, Fenitoína y Nifedipino)	Independiente	Cualitativa	Primaria
Microdosis farmacológica	Independiente	Cuantitativa	Primaria
DMSO	Independiente	Cuantitativa	Secundaria
Tiempo	Independiente	Cuantitativa	Primaria
Proliferación celular	Dependiente	Cuantitativa	Primaria

Tabla 1. Clasificación de las variables en estudio.

Definiciones operacionales:

Variable Independiente:

- Naturaleza del fármaco: definido ampliamente en marco teórico.
- Microdosis Farmacológica: Se utiliza como referencia la dosis más recurrente en la literatura (a continuación destacada), y se considera una cuarta parte y el doble de dicha dosis, como el mínimo y el máximo de dosificación considerada en este estudio. Esto determinado según el interés de los investigadores. Por lo tanto las microdosis a utilizar corresponden a:

Ciclosporina: 125 ng /ml – **500 ng/ml** – 1 ug/ml

Fenitoína: 5 ug/ml – **20 ug/ml** – 40 ug/ml

Nifedipino: 3.3 ug/ml - **13 ug/ml** - 26 ug/ml

- DMSO: Corresponde a la dilución de 0,1 ml de DMSO en concentración 1 Molar, en la misma proporción en la que se realizó la disolución de los fármacos. La dilución obtenida se corresponde respectivamente con la microdosis farmacológica requerida.
- Tiempo: Los intervalos de tiempo definidos para realizar las mediciones son 4, 8 y 12 días. La razón de los tiempos de medición se basa en que, según la literatura, en un período de 4 días se comienza a observar confluencia celular en los cultivos de fibroblastos, tiempo en el cual se realiza la medición y se vuelve a aplicar el fármaco. Al cabo de 12 días cada fibroblasto completará aproximadamente 14 ciclos celulares, manteniéndose funcional, considerando que al completar 20 ciclos celulares el fibroblasto muere.

Variable Dependiente:

- Proliferación celular: Se determina a través de la lectura por fluorometría de la formación de resorufina, elemento altamente fluorescente, que es producto de la reducción de resazurina por óxido-reductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células vivas. La medida de fluorescencia es un indicador de proliferación y funcionalidad celular. La medición se realiza a través del lector de placas Appliskan.

Muestra

Los cultivos celulares son realizados con diferentes replicaciones para permitir la conversión de experimentos heterogéneos, cuando se realiza un solo cultivo, en experimentos homogéneos o uniformes. Cuando las replicaciones experimentales sean virtualmente idénticas, se llevarán a cabo todos los procedimientos pertinentes a la investigación

El tipo de Muestreo es no probabilístico y se relaciona con el tipo de agrupación decisional según el criterio específico del equipo investigador. En este caso, según las dimensiones del pocillo y la confluencia celular observada en la prueba piloto, se determina que cada pocillo debe contener 1000 células.

Desarrollo del Experimento:

1. Obtención y cultivo de fibroblastos humanos

Las muestras de tejido gingival fueron obtenidas, una vez firmado el consentimiento informado por parte del paciente, durante un procedimiento quirúrgico, correspondiente a la exodoncia de un tercer molar, con caries y afectación pulpar sin posibilidades de tratamiento debido a limitaciones económicas. Este procedimiento fue realizado en Clínica Integral de sexto año, desarrollada en la Clínica B de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Inmediatamente finalizada la extracción, el diente se depositó en medio de cultivo DMEM F12 Glutamax (Figura 18)



Figura 18. Diente 1.8, a través del procedimiento quirúrgico de su extracción se obtuvieron las muestras gingivales utilizadas en este estudio

Se obtuvieron dos muestras gingivales a partir de encía marginal adherida al diente extraído, con dimensiones de muestra con un mínimo de 0,5x0,5 mm. Cada biopsia

se lavó en una placa Petri estéril con 5 ml de solución Buffer Fosfato Salino 0.1 M pH 7,4 (PBS) (GIBCO), que contiene una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100 U/ml/100 ug/ml, Invitrogen) y anfotericina B 250 ug/ml (Fungizona, Invitrogen).

Para la obtención de fibroblastos, la muestra se incubó en Tripsina 0.5% - EDTA 5,3 mM (GIBCO), por 30 minutos a 37°C en incubador Thermo Forma. Luego la muestra fue centrifugada y el pellet obtenido se lavó con PBS para remoción enzimática. Los fibroblastos humanos obtenidos luego de la digestión enzimática, fueron suspendidos en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO)+F12+ GlutaMAX™ suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Invitrogen), y 10 ul/ml de solución antibiótica penicilina y estreptomicina en proporción: 0.1 U/ml:0.1 mg/ml (Gibco R, Grand Island NY,EEUU;2011) en frascos de cultivo T -75 (Falcon), que fueron ubicados en incubadora Thermo Forma, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

2. Microdosis farmacológica y DMSO

La obtención de las microdosis farmacológicas se realizó mediante el pesaje en balanza analítica de 0,01 g de fármaco de alta pureza (>95%), cantidad que posteriormente fue disuelta en 1 ml de solvente DMSO, obteniendo de esta manera una concentración de 10 mg/ml. De esta solución se toman 0,1 ml y se adicionan 9,9 ml de medio de cultivo, para obtener una solución stock en una concentración de 100 ug/ml de fármaco. A partir de esta solución se realizarán las diluciones necesarias para alcanzar las microdosis farmacológicas de estudio.

Debido a que la presente investigación desea estudiar los efectos del fármaco, se realizaron diluciones equivalentes de solvente DMSO con fines comparativos, ya que se desconoce la influencia que el solvente puede tener en la capacidad proliferativa de los fármacos en cuestión. Por lo tanto, se toman 0,1 ml de DMSO 1 Molar y se disuelve en 9,9 ml de medio de cultivo constituyendo una solución stock a partir de la cual se realizarán las diluciones proporcionales a cada microdosis farmacológica.

3. Conteo celular

Para llevar a cabo esta etapa se requiere efectuar una técnica de tripsinización, la cual se realiza mediante la eliminación del medio de cultivo y enjuague con 4 ml de PBS, para posteriormente aplicar 3 ml de tripsina 1% al frasco T-75 (Falcon), y ubicar en el incubador Thermo Forma durante 4 minutos. Luego, se comprueba la pérdida de adhesión celular a la superficie de cultivo y entre las células, a través del microscopio óptico. Se retira el contenido y se deposita en un frasco de 15 ml. Se agregan 3 ml de medio de cultivo al frasco T-75 (Falcon) para arrastrar la fracción de células tripsinizadas que puedan permanecer e inhibir la acción de la tripsina en el frasco de cultivo. Se retiran los 3 ml de medio de cultivo y se depositan en el frasco

de 15 ml que contiene las células tripsinizadas. El frasco de 15 ml se lleva a la centrífuga con las siguientes condiciones: 1500 rpm, 5 minutos, 4°C. Posteriormente, se elimina el medio de cultivo del frasco de 15 ml y el pellet obtenido después de la centrifugación se re-suspende en 1 ml de medio de cultivo.

Para realizar el conteo celular después de cada tripsinización se utiliza la técnica de exclusión celular mediante azul de tripán, esta técnica se basa en que el azul de tripán puede penetrar sólo la membrana de las células que han perdido su integridad y por lo tanto están muertas. Distinguiéndose al microscopio óptico las células muertas de las vivas. Para realizar el recuento celular se utiliza una cámara de Neubauer tiñendo las células con azul tripán 0,4% (p/v) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU). Para ello las células re-suspendidas en 1 ml de medio de cultivo se diluyen 1:1 con azul tripán y se cuentan al microscopio óptico (x10) en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

Para realizar los experimentos de este estudio, se considera que cada pocillo sembrado debe contener una cantidad de 1000 células. Para realizar este cálculo se aplica la siguiente fórmula:

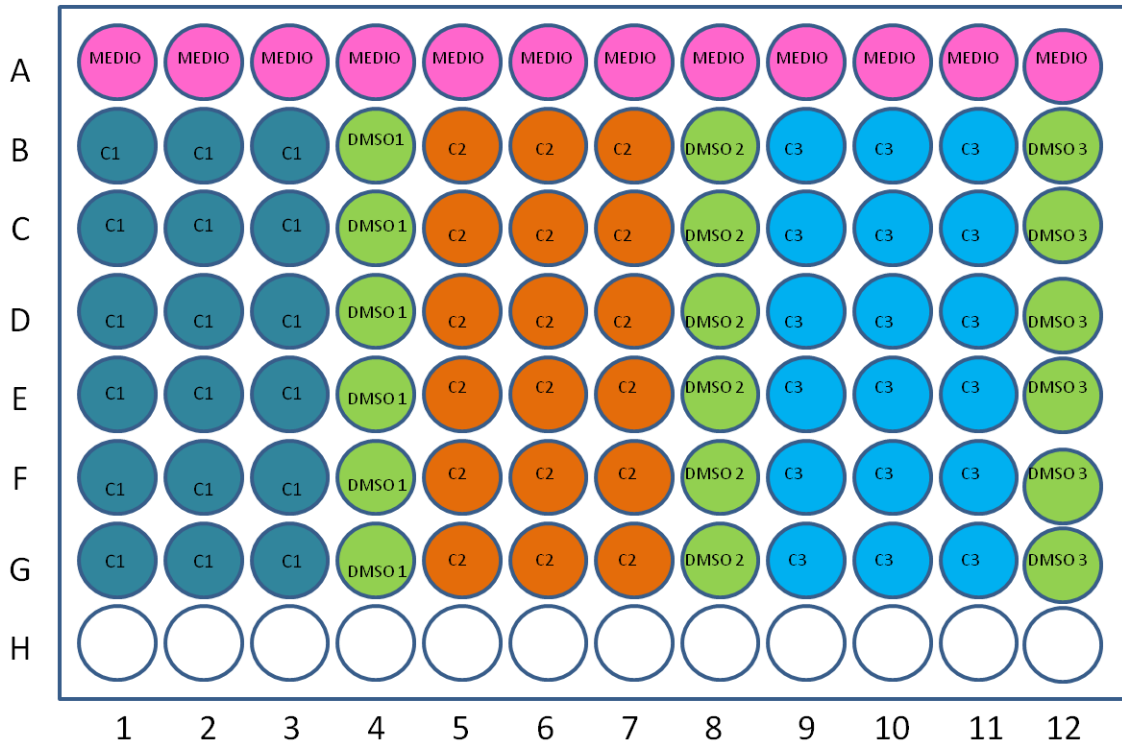
$$\text{N}^\circ \text{ de células/ ml} = \frac{n1+n2+n3+n4}{4} \times 10000 \times 2 \times 1 \text{ ml}$$

$n1+n2+n3+n4$ = Promedio de células cuantificadas en la cámara 4 de Neubauer 10000= cm^3 2= Factor de disolución 1 ml = volumen de resuspensión
--

4. Montaje de Placa NUNC de 96 pocillos

Una vez determinada la cantidad de células necesarias para el experimento y obtenida la disolución de medio de cultivo que contenga dicha cantidad, serán sembrados 84 pocillos con 100 uL de esta disolución y al cabo de 24 hrs serán aplicados: 100 uL de medio de cultivo para control en 12 pocillos (fila A), 100 uL de dilución del solvente correspondiente a DMSO en 18 pocillos, y 100 uL de la disolución correspondiente a la microdosis medicamentosa específica en 18 pocillos. (Figura 19).

Al día 4 y 8 se repite el procedimiento, esta vez omitiendo el paso de sembrado, retirando los 200 ul contenidos en cada pocillo, aplicando 100 ul de medio a todos los pocillos sobre las células adheridas y adicionando 100 ul de medio de cultivo, solvente DMSO, o microdosis farmacológica según corresponda.



Columnas 1 a 3: Concentración 1 de fármaco.
 Columna 4: Concentración 1 de DMSO, control.
 Columnas 5 a 7: Concentración 2 de fármaco.
 Columna 8: Concentración 2 de DMSO, control.
 Columnas 9 a 11: Concentración 3 de fármaco.
 Columna 12: Concentración 3 de DMSO, control.

Filas B y C: Medición a los 4 días
 Filas D y E: Medición a los 8 días.
 Filas F y G: Medición a los 12 días.
 Casillas A1, A2, A3 y A4: Medio de cultivo control a los 4 días.
 Casillas A5, A6, A7 y A8: Medio de cultivo control a los 8 días.
 Casillas A9, A10, A11 y A12: Medio de cultivo control a los 12 días.

Figura 19. Esquema representativo de la distribución de microdosis en placas NUNC 96 pocillos. Siendo la Concentración 1 la microdosis más baja y la concentración 3 la microdosis más alta, correspondiente a cada fármaco.

5. Proliferación Celular

Una vez finalizado cada período de tiempo establecido, se retiran los 200 uL contenidos en cada pocillo definido para la medición y se aplican 200 uL de resazurina (Azul no fluorescente), colocando en el incubador Thermo Forma durante 4 horas a 37°C. Luego, se realiza la lectura fluorométrica de resorufina (rojo altamente fluorescente) empleando un filtro de excitación de longitud de onda de 530nm y un filtro de emisión de 590 nm en un lector de placas Appliskan Thermo Corporation. Los resultados se obtienen en **unidades relativas de fluorescencia (RFU)** que representan la actividad metabólica de las células.

Consideraciones bioéticas

Se realiza un consentimiento informado (Anexo 1). En este documento se informa al paciente sobre el objetivo del estudio y se solicita la autorización para utilizar las muestras de encía en este trabajo de investigación, así como también, para estudios posteriores donde estas muestras puedan ser requeridas.

Métodos estadísticos

Las pruebas de hipótesis utilizadas son las siguientes:

T student

La prueba t-student se utiliza para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal. Además proporciona resultados aproximados para los contrastes de medias en muestras suficientemente grandes cuando estas poblaciones no se distribuyen normalmente. En este estudio se aplica un supuesto de normalidad que corresponde al test Kolmogorov - Smirnov, para de esta forma descartar el uso de una prueba no paramétrica. El estadístico t se calcula de la siguiente manera (Igualdad de Varianza):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Prueba ANOVA

Prueba estadística utilizada para comparar 3 o más grupos de variables, comprobando si existen diferencias significativas entre los grupos mediante el análisis de la varianza.

El estadístico de la tabla ANOVA es el siguiente:

$$F = \frac{\frac{SCF}{t-1}}{\frac{SCE}{N-t}}$$

RESULTADOS

Los experimentos se realizaron en dos placas NUNC de 96 pocillos para cada fármaco, obteniendo de esta manera, la siguiente cantidad de datos:

- Controles de medio de cultivo (DMEM): 8 valores RFU por día de medición
- Dimetilsulfóxido (DMSO): 4 valores RFU por día de medición
- Microdosis farmacológica: 12 valores RFU por día de medición

Se utilizaron la mitad de los datos obtenidos, seleccionando aquellos que mostraran menor variabilidad entre sí. Para analizar la información, y como una forma de visualizar los efectos tanto del DMSO como del fármaco puro, se calculó el porcentaje de proliferación de la microdosis farmacológica y los controles de DMSO en relación a los controles de DMEM. (Tabla II – Tabla VII)

Las siguientes tablas expresan el porcentaje de proliferación inducido por microdosis farmacológica y DMSO, calculado en base al promedio RFU de los controles DMEM a los 4, 8 y 12 días.

CICLOSPORINA

	RFU									
Día 4	1	2	3	4	5	6	Promedio RFU	Desv.Estándar	% Proliferación	%Desv.Estándar
CsA 125 ng/ml	3079580	2978970	3012270	3340530	3387370	3242640	3173560	173826,1867	131,8956076	7,224350738
CsA 500 ng/ml	2460840	2712660	3130700	3095650	2713160	2871640	2830775	255507,3639	117,649198	10,61908362
CsA 1 ug/ml	1443650	1137540	1216440	1257930	1256350	1150680	1243765	110461,0937	51,69183518	4,590848473
Control DMEM	2789610	2442700	2012820	2379330			2406115	318227	100	13,2257602
Día 8										
CsA 125 ng/ml	4768417,5	4546029	4741238	4576120	4775735	4783856	4698565,917	107879,6826	98,05709775	2,251403677
CsA 500 ng/ml	4681078	4437925	4611414,5	4487712,5	4504799,5	4625218,5	4558024,667	94560,30612	95,12406087	1,973433883
CsA 1 ug/ml	4705320	4711883	4796919	4806320,5	4705109,5	4732709,5	4743043,583	46575,45996	98,98532797	0,972010292
Control DMEM	4795929,5	4778905,5	4807015,5	4784802,5			4791663,25	12432,78656	100	0,259467035
Día 12										
CsA 125 ng/ml	4946240,5	4939612	4938190,5	4922211,5	4953107	4993311	4948778,75	24125,74089	99,88928224	0,486969223
CsA 500 ng/ml	9336671	9289928	9615393	9816306	9691655	8415974	9360987,833	505978,132	188,9481028	10,21298284
CsA 1 ug/ml	4948992	4953816	4958938	4958507	4958311,5	4970178	4958123,75	7044,08468	100,0779076	0,142182263
Control DMEM	4956493,5	4951226,5	4957870,5	4951465,5			4954264	3417,383063	100	0,068978623

Tabla II. Ciclosporina / DMEM. Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada microdosis aplicada según día de medición.

	RFU								
Día 4	1	2	3	4	Promedio RFU	Desv.Estándar	% Proliferación	%Desv.Estándar	
DMSO 125 ng/ml	2243320	2304700	1927170	2179670	2274010	43402,21423	94,50961405	1,803829585	
DMSO 500 ng/ml	1134080	923120	187480	2202520	1028600	149171,2466	42,7494114	6,199672358	
DMSO 1 ug/ml	941808	953233	1867670	2228000	947520,5	8078,694975	39,37968468	0,33575681	
Control DMEM	2789610	2442700	2012820	2379330	2406115	318227	100	13,2257602	
	1826990	3222300	3072650	1973560					
Día 8									
DMSO 125 ng/ml	4447048	4514394	4365689	4503156,5	4508775,25	7946,112454	94,09624623	0,16583203	
DMSO 500 ng/ml	3688730	4244908,5	4148583,8	4390433,5	4196746,15	68111,84857	87,58432993	1,421465679	
DMSO 1 ug/ml	4086575,5	4458248,5	4241274	4180557,5	4210915,75	42933,04888	87,88004353	0,895994702	
Control DMEM	4819457,5	4778905,5	4807015,5	4784802,5	4791663,25	12432,78656	100	0,259467035	
	4795929,5	4672734	4744092,5	4767589,5					
Día 12									
DMSO 125 ng/ml	4972468	4915459	4878653,5	4933462,5	4924460,75	12730,39694	99,39843234	0,256958388	
DMSO 500 ng/ml	4886360	4892291,5	4859073,5	4887419	4886889,5	748,8260813	98,64007045	0,01511478	
DMSO 1 ug/ml	4853194	4834133	4858812,5	4877192	4856003,25	3972,87945	98,01664284	0,080191113	
Control DMEM	4968912,5	4951226,5	4888155,5	4951465,5	4954264	3417,383063	100	0,068978623	
	4956493,5	4957870,5	4966602	4946607,5					

Tabla III. DMSO / DMEM (Los valores en color rojo no han sido considerados). Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada concentración de DMSO equivalente a cada microdosis aplicada según día de medición.

FENITOINA

	RFU									
Día 4	1	2	3	4	5	6	Promedio RFU	Desv.Estándar	% Proliferación	%Desv.Estándar
Fenitoína 5 ug/ml	2658770	2907430	2575600	3222330	3474070	2802890	2940181,667	345449,9749	147,3426302	17,31168808
Fenitoína 20 ug/ml	1848870	1576420	1631400	2103870	2001310	1709250	1811853,333	210265,3085	90,79821112	10,53711883
Fenitoína 40 ug/ml	836830	756317	803112	1041360	962839	951122	891930	109705,6397	44,69768438	5,497727467
Control DMEM	1883800	2022680	1864600	2210810			1995472,5	159905,0192	100	8,013391273
Día 8										
Fenitoína 5 ug/ml	4795012,5	4898170	4788808,5	4890116,5	4869732	4906822,5	4858110,333	52765,88025	102,4512634	1,112764166
Fenitoína 20 ug/ml	4851505	4869931,5	4827040,5	4842167	4853662	4902143,5	4857741,583	25925,99625	102,4434869	0,546745728
Fenitoína 40 ug/ml	4589920,5	4621082,5	4745102,5	4693194	4703287	4813991,5	4694429,667	81541,05718	98,99944983	1,71959543
Control DMEM	4723684,5	4765164	4755788	4722861,5			4741874,5	21820,14789	100	0,460158696
Día 12										
Fenitoína 5 ug/ml	4963199	4964996	4963463	4966370	4966021	4967548,5	4965266,25	1708,499042	100,1454906	0,034459074
Fenitoína 20 ug/ml	4956450,5	4952335,5	4955982	4953992	4961138	4948633	4954755,167	4219,904533	99,93349035	0,085112135
Fenitoína 40 ug/ml	4933437,5	4947497,5	4937282	4953351	4958800,5	4960580,5	4948491,5	11218,71637	99,80715715	0,22627263
Control DMEM	4956335	4955869	4961634,5	4958372,5			4958052,75	2623,649002	100	0,052916924

Tabla IV. Fenitoína / DMEM. Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada microdosis aplicada según día de medición.

	RFU								
Día 4	1	2	3	4	Promedio RFU	Desv.Estándar	% Proliferación	%Desv.Estándar	
DMSO 5 ug/ml	23075,7	38891,3	17528,3	19006,6	18267,45	1045,315955	91,54448383	5,238438288	
DMSO 20 ug/m	29359,3	34268,4	12550,4	15312	13931,2	1952,746087	69,81404154	9,785883228	
DMSO 40 ug/m	23093,2	26076,5	10069,4	12081,6	11075,5	1422,840265	55,50314525	7,130342639	
Control DMEM	18838	20226,8	18646	14901,1	19954,725	1599,050192	100	8,013391273	
	31439,9	27554,6	28109,6	22108,1					
Día 8									
DMSO 5 ug/ml	4761100	4687195	3905198	3148533,5	4724147,5	52258,72666	99,6261605	1,102068953	
DMSO 20 ug/m	4814565	4759977	4153333,5	3652821,5	4787271	38599,54497	100,9573535	0,814014478	
DMSO 40 ug/m	4636286,5	4744752,5	3346460,8	3585920,3	4690519,5	76697,04413	98,91698947	1,61744146	
Control DMEM	4702888,5	4806160	4662937	4722861,5	4741874,5	21820,14789	100	0,460158696	
	4801296	4723684,5	4765164	4755788					
Día 12									
DMSO 5 ug/ml	4925579	4918525	4902399,5	4935128,5	4922052	4987,931234	99,27389336	0,100602625	
DMSO 20 ug/m	4967974,5	4951542	4961426	4950460,5	4951001,25	764,7359839	99,85777683	0,01542412	
DMSO 40 ug/m	4945764,5	4943095	4962769	4954714,5	4944429,75	1887,621552	99,72523487	0,038071833	
Control DMEM	4956335	4955869	4943853,5	4964430	4958052,75	2623,649002	100	0,052916924	
	4968313	4961634,5	4983505,5	4958372,5					

Tabla V. DMSO / DMEM. (Los valores en color rojo no han sido considerados). Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada concentración de DMSO equivalente a cada microdosis aplicada según día de medición.

NIFEDIPINO

	RFU									
Día 4	1	2	3	4	5	6	Promedio RFU	Desv. Estándar	% Proliferación	% Desv. Estándar
Nifedipino 3.3 ug	6016760	5411840	5633430	5578210	5341460	5326860	5551426,667	259991,3964	98,80005102	4,627128264
Nifedipino 13 ug	3828450	3090760	3207780	3427200	3366870	3083030	3334015	280118,0483	59,33625208	4,985327039
Nifedipino 26 ug	2151540	2067290	2071060	2113100	2058360	2118110	2096576,667	36679,68302	37,31326992	0,652796978
Control DMEM	5389070	5561420	5671980	5852930			5618850	194690,6063	100	3,464954686
Día 8										
Nifedipino 3.3 ug	4924343,5	4866271,5	4935661	4900632	4914176	4922797,5	4910646,917	24669,28465	100,4597842	0,50467302
Nifedipino 13 ug	4882910	4871511,5	4877272	4856628	4907187	4877546	4878842,417	16560,97938	99,80914218	0,338796994
Nifedipino 26 ug	4789327,5	4795897,5	4878431,5	4758867,5	4741840	4852520,5	4802814,083	53042,60484	98,25378907	1,085121518
Control DMEM	4912465,5	4870183	4914465,5	4855573,5			4888171,875	29820,51088	100	0,610054467
Día 12										
Nifedipino 3.3 ug	4960341,5	4959301,5	4960684,5	4964743,5	4965993	4962669	4962288,833	2652,580586	99,88282181	0,053392143
Nifedipino 13 ug	4993370,5	5003111	5006874,5	4995333	4999942	4993752,5	4998730,5	5514,220298	100,6163334	0,110992307
Nifedipino 26 ug	4973494	4968909	4978164	4978161,5	4975629	4964496,5	4973142,333	5466,038709	100,1012852	0,110022489
Control DMEM	4969783	4969660	4974204	4958794,5			4968110,375	6560,406611	100	0,132050339

Tabla VI. Nifedipino / DMEM. Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada microdosis aplicada según día de medición.

	RFU								
Día 4	1	2	3	4	Promedio RFU	Desv. Estándar	% Proliferación	% Desv. Estándar	
DMSO 3.3 ug/ml	27297,7	57033,6	62078,6	48546,5	59556,1	3567,353711	105,9933972	6,348903621	
DMSO 13 ug/ml	23934,1	23873,6	55063,4	58696,5	23903,85	42,77996026	42,54224619	0,076136505	
DMSO 26 ug/ml	17204,8	15582,2	42271	44077,4	43174,2	1277,31769	76,83814304	2,273272448	
Control DMEM	53890,7	55614,2	56719,8	58529,3	56188,5	1946,906063	100	3,464954686	
Día 8									
DMSO 3.3 ug/ml	4594264,5	4829638	4897520,5	4880665	4711951,25	166434,198	96,39495849	3,404835227	
DMSO 13 ug/ml	4648707	4796929,5	4935203,5	4837143	4817036,25	28435,23855	98,54473969	0,581715195	
DMSO 26 ug/ml	4842729,5	4791277	4953726	4847744	4845236,75	3545,786954	99,12165271	0,072538099	
Control DMEM	4912465,5	4870183	4914465,5	4855573,5	4888171,875	29820,51088	100	0,610054467	
Día 12									
DMSO 3.3 ug/ml	4993836,5	4991304	4953008	4964556,5	4958782,25	8166,022663	99,81223998	0,164368785	
DMSO 13 ug/ml	5009454,5	4980034	4953133	4958074,5	4955603,75	3494,168159	99,74826193	0,070331935	
DMSO 26 ug/ml	4992422	4986906	4963512,5	4962043,5	4962778	1038,739862	99,89266794	0,020908148	
Control DMEM	4969783	4969660	4974204	4958794,5	4968110,375	6560,406611	100	0,132050339	

Tabla VII. DMSO/ DMEM. Datos obtenidos en Unidad Relativa de Fluorescencia (RFU). En base al promedio de RFU del grupo control DMEM, se determinaron los porcentajes de proliferación y desviación estándar de cada concentración de DMSO equivalente a cada microdosis aplicada según día de medición.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

CICLOSPORINA

Día	Microdosis	% Proliferación CsA	% Proliferación DMSO
4	125 ng/ml	131,89	94,5
	500 ng/ml	117,64	42,74
	1 ug/ml	51,69	39,37
8	125 ng/ml	98,05	94,09
	500 ng/ml	95,12	87,58
	1 ug/ml	98,98	87,88
12	125 ng/ml	99,88	99,39
	500 ng/ml	188,94	98,64
	1 ug/ml	110,07	98,01
	DMEM	100	100

Tabla VIII. Proliferación inducida por Ciclosporina y DMSO: Porcentaje de proliferación inducido por cada microdosis farmacológica y sus equivalentes en DMSO en los días 4, 8 y 12.

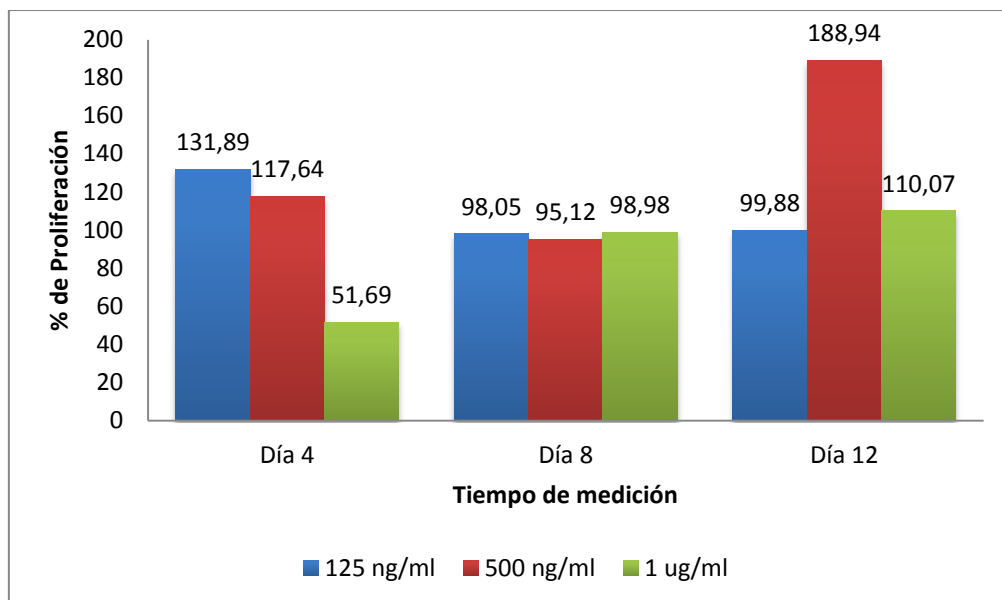


Figura 20. Porcentaje de proliferación inducido por cada dilución de microdosis farmacológica transcurrido el tiempo de medición

Resultados (Figura 20):

- Al día 4 las microdosis de 125 ng/ml y 500 ng/ml de Ciclosporina presentan un porcentaje de proliferación mayor al grupo control en aproximadamente un 32% y 18% respectivamente. La microdosis de 1 µg/ml no induce efectos proliferativos (-48% aprox.).
- Al día 8 todas las microdosis de Ciclosporina presentan porcentajes de proliferación menores al grupo control, siendo la microdosis de 1 µg/ml la que muestra un mayor porcentaje de proliferación (-1,02%), seguida por la de 125 ng/ml (-2% aprox.) y 500 ng/ml (-4,9 % aprox.)
- Al día 12 las microdosis de Ciclosporina de 500 ng/ml y 1 µg/ml presentan porcentajes de proliferación mayores al grupo control en aproximadamente un 89% y 10% respectivamente. La microdosis de 125 ng/ml no tiene efectos proliferativos (-0,12%)
- La microdosis de 1 µg/ml presenta una tendencia a aumentar el porcentaje de proliferación en el tiempo, sin embargo sólo supera al porcentaje del control en la medición del día 12.
- La microdosis de 125 ng/ml muestra un porcentaje de proliferación mayor al grupo control en el primer día de medición, con el paso del tiempo se observa un porcentaje similar pero inferior a éste.

- Los cambios proliferativos más evidentes, en cuanto a porcentaje se refiere, se producen con la microdosis de 500 ng/ml. Por otra parte, la mayor concentración correspondiente a 1 ug/ml presentó los menores porcentajes de proliferación.

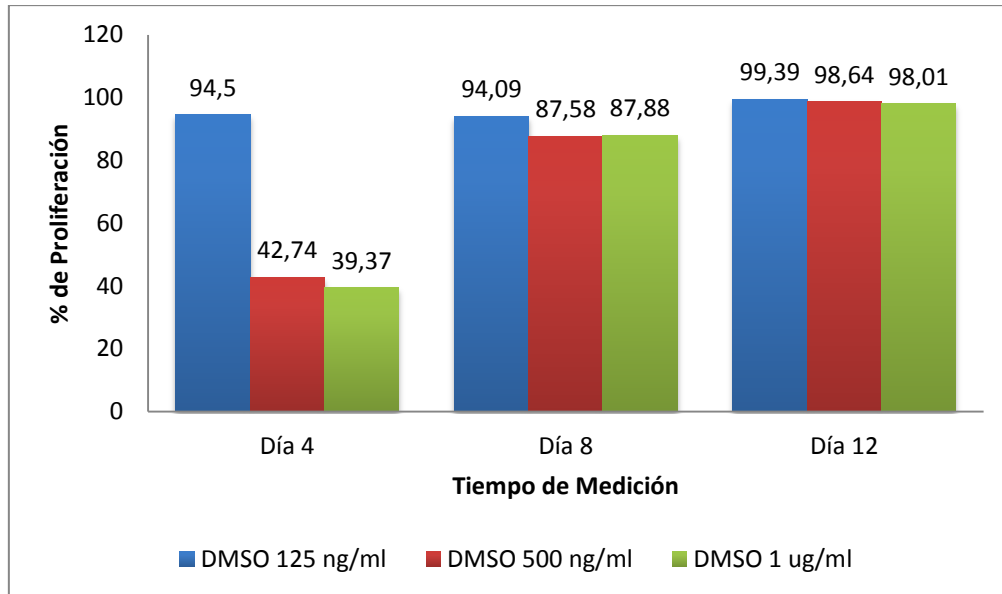


Figura 21. Porcentajes de proliferación inducidos por los controles DMSO transcurrido el tiempo de medición.

Resultados (Figura 21):

- En todos los días de medición, las distintas diluciones de DMSO presentaron porcentajes de proliferación menores al grupo control.
- Los menores porcentajes de proliferación se observan en el día 4, específicamente en las diluciones equivalentes en 500 ng/ml y 1 ug/ml.
- En los días 8 y 12, los porcentajes de proliferación son mayores al día 4 y similares a los porcentajes de proliferación del grupo control.

FÁRMACO	MICRODOSIS	% DE PROLIFERACIÓN			
		DÍA 4	DÍA 8	DÍA 12	PROMEDIO %
CsA	125 ng/ml	131,89	98,05	99,88	109,94
	500 ng/ml	117,64	95,12	188,94	133,9
	1 ug/ml	51,69	98,98	110,07	86,9

Tabla IX. Porcentaje de proliferación promedio de Microdosis de CsA.
Cálculo del promedio de los porcentajes de proliferación inducidos por cada microdosis de CsA en el día 4, 8 y 12.

Resultado (Tabla IX):

- En promedio, las microdosis de Ciclosporina de 125 ng/ml y 500 ng/ml presentan mayor porcentaje de proliferación en relación al grupo control.
- El promedio de Proliferación de la microdosis 1 ug/ml es menor en relación al grupo control.
- La microdosis de 500 ng/ml presenta en promedio un porcentaje de proliferación mayor en comparación con las otras microdosis, al cabo de las tres mediciones.

FENITOINA

Día	Microdosis	% Proliferación FEN	% Proliferación DMSO
4	5 ug/ml	147,34	91,54
	20 ug/ml	90,79	69,81
	40 ug/ml	44,69	55,5
8	5 ug/ml	102,45	99,62
	20 ug/ml	102,44	100,95
	40 ug/ml	98,99	98,91
12	5 ug/ml	100,14	99,27
	20 ug/ml	99,93	99,85
	40 ug/ml	99,8	99,72
	DMEM	100	100

Tabla X. Proliferación inducida por Fenitoína y DMSO. Porcentaje de proliferación inducido por cada microdosis farmacológica y sus respectivos controles DMSO en los días 4, 8 y 12.

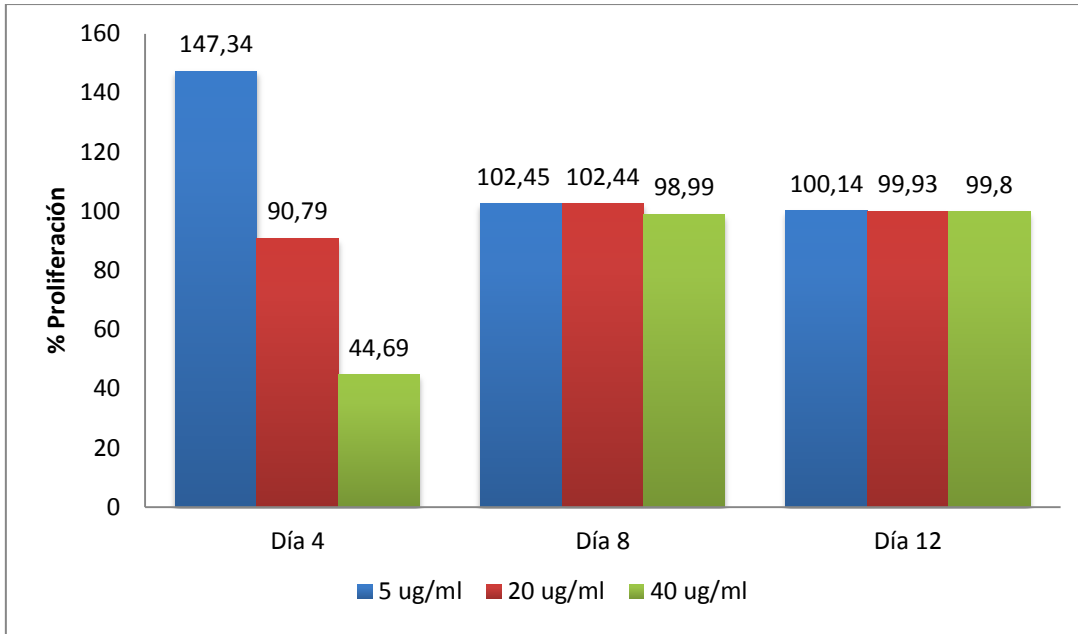


Figura 22. Porcentaje de proliferación inducido por cada dilución de microdosis farmacológica transcurrido el tiempo de medición.

Resultados (Figura 22):

- Al día 4 la microdosis de Fenitoína de 5 ug/ml presenta un porcentaje de proliferación mayor al grupo control en un 47%. Por el contrario, las microdosis de 20 ug/ml y 40 ug/ml no tienen efectos proliferativos (-9,2% y -55,3% respectivamente).
- Al día 8 la microdosis de 5 ug/ml y 20 ug/ml de Fenitoína presentaron un porcentaje de proliferación mayor al grupo control en aproximadamente un 2%. La microdosis de 40 ug/ml no presentó efectos proliferativos (-1%)
- Al día 12 La microdosis de 5 ug/ml de Fenitoína presentó un porcentaje mayor al grupo control en un 0,14%. Las microdosis de 20 ug/ml y 40 ug/ml no tuvieron efectos proliferativos, siendo la microdosis más alta la que presentó menor porcentaje de proliferación (-0,2%).
- La microdosis de 5 ug/ml presenta en las tres mediciones porcentajes de proliferación mayor al grupo control, sin embargo se observa que el efecto proliferativo tiende a disminuir con el paso del tiempo.
- La microdosis de 40 ug/ml presenta en las tres mediciones, porcentajes menores a los del grupo control, con tendencia a aumentar con el tiempo.

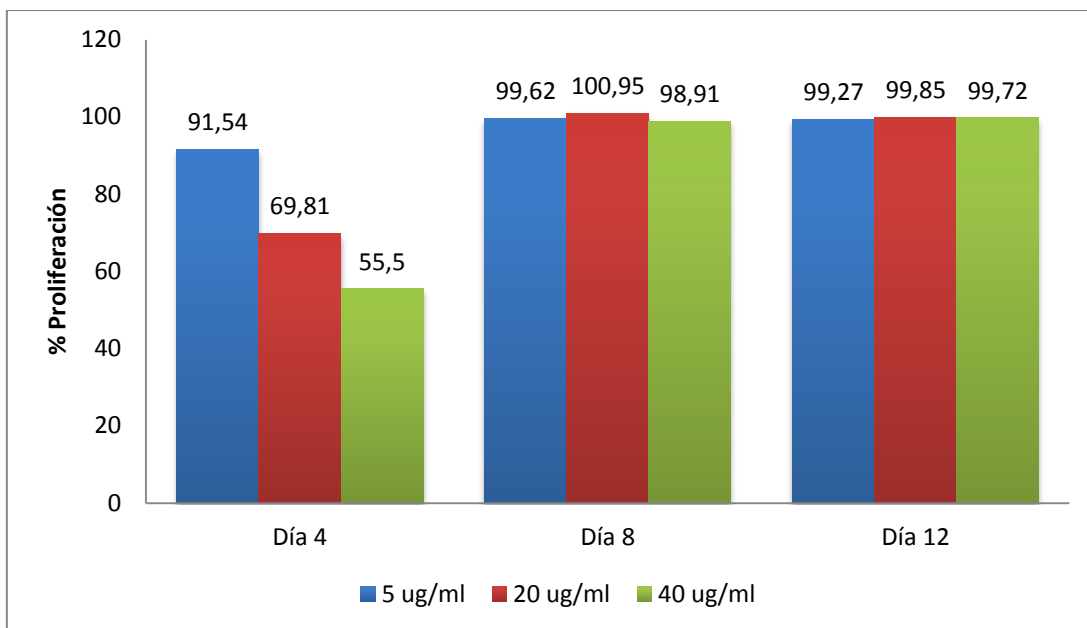


Figura 23. Porcentajes de proliferación inducidos por los controles DMSO transcurrido el tiempo de medición.

Resultados (Figura 23):

- A excepción de la dilución de DMSO equivalente a 20 ug/ml en el día 8, todos los porcentajes de proliferación expresados por DMSO son menores a los porcentajes del grupo control.
- En el día 4 se observan las variaciones más evidentes entre concentraciones de DMSO y en relación al grupo de control.
- En el día 8 y 12 se presentan porcentajes similares al grupo control.

		% DE PROLIFERACIÓN			
FÁRMACO	MICRODOSIS	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 12	PROMEDIO %
FENITOINA	5 ug/ml	147,34	102,45	100,14	116,64
	20 ug/ml	90,79	102,44	99,93	97,72
	40 ug/ml	44,69	98,99	99,8	81,16

Tabla XI. Porcentaje de proliferación promedio de Microdosis de Fenitoína. Cálculo del promedio de los porcentajes de proliferación inducidos por cada microdosis de Fenitoína en el día 4, 8 y 12.

Resultados (Tabla XI):

- En promedio, las microdosis de 20 ug/ml y 40 ug/ml presentan un porcentaje de proliferación menor al del grupo control.
- La microdosis de 5 ug/ml presenta un promedio de proliferación mayor al del grupo control al cabo de los tres días de medición.
- Se observa comparando las tres microdosis farmacológicas, que la microdosis de 40 ug/ml es la que presenta menor proliferación promedio y la mayor proliferación es presentada por la microdosis de 5 ug /ml.

NIFEDIPINO

Día	Microdosis	% Proliferación NIF	% Proliferación DMSO
4	3.3 ug/ml	98,8	105,99
	13 ug/ml	59,33	42,54
	26 ug/ml	37,31	76,83
8	3.3 ug/ml	100,45	96,39
	13 ug/ml	99,8	98,54
	26 ug/ml	98,25	99,12
12	3.3 ug/ml	99,88	99,81
	13 ug/ml	100,61	99,74
	26 ug/ml	100,1	99,89
	DMEM	100	100

Tabla XII. Proliferación inducida por Nifedipino y DMSO. Porcentaje de proliferación inducido por cada microdosis farmacológica y sus respectivos controles DMSO en los días 4, 8 y 12.

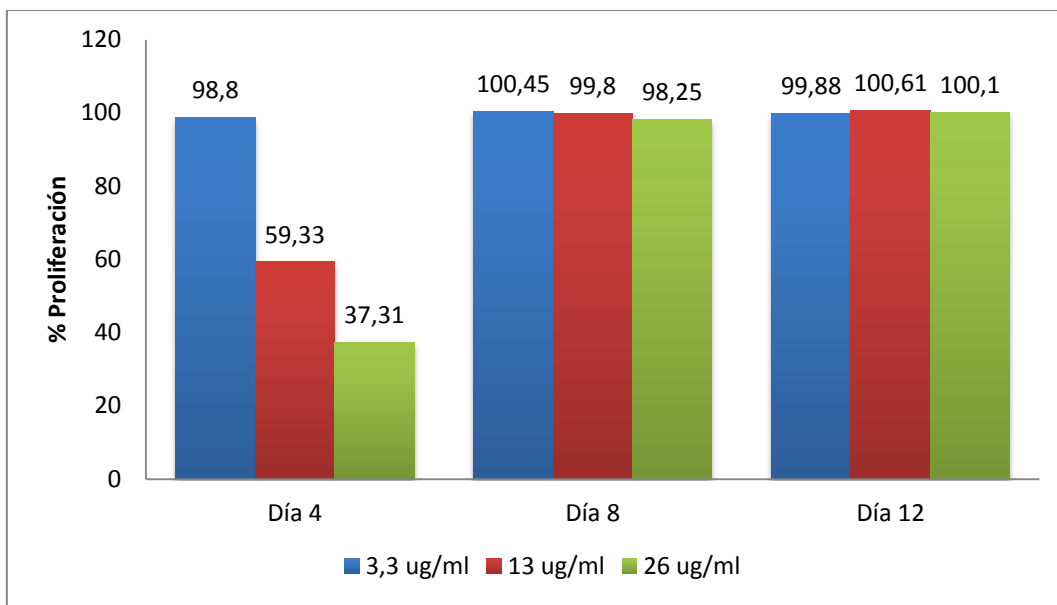


Figura 24. Porcentaje de proliferación inducido por cada dilución de microdosis farmacológica transcurrido el tiempo de medición.

Resultados (Figura 24):

- En el día 4 cada microdosis de Nifedipino presenta un porcentaje de proliferación menor al grupo control (3.3 ug/ml: - 1,2%, 13 ug/ml: - 40,7%, 26 ug/ml: - 62,7%).
- Al día 8 la microdosis de Nifedipino de 3.3 ug/ml presentó un porcentaje de proliferación mayor al grupo control, aunque muy similar a éste (+ 0,45%). Las microdosis de 13 ug/ml y 26 ug/ml no mostraron efectos proliferativos, sin embargo, los valores son cercanos al grupo control (- 0,2% y - 1,8% respectivamente).
- En el día 12 las microdosis de Nifedipino de 13 y 26 ug/ml presentaron porcentajes de proliferación mayor al grupo control en un 0,61% y 0,1% respectivamente. La microdosis de 3.3 ug/ml presentó un porcentaje de proliferación menor al grupo control e igual al porcentaje inducido por los 125 ng/ml de la Ciclosporina (-0,12%).
- Se observa que los porcentajes de proliferación de las microdosis 13 ug/ml y 26 ug/ml tienden a aumentar con el tiempo. La microdosis de 3.3 ug/ml presenta los porcentajes de proliferación más estables a través de los días de medición, siendo éstos similares a los porcentajes de proliferación del grupo control.

- La mayor diferencia de los porcentajes de proliferación entre microdosis se observa en el día 4.
- El mayor porcentaje de proliferación respecto del grupo control es expresado por la microdosis de 13 ug /ml en el día 12 y corresponde a un 0,61%.

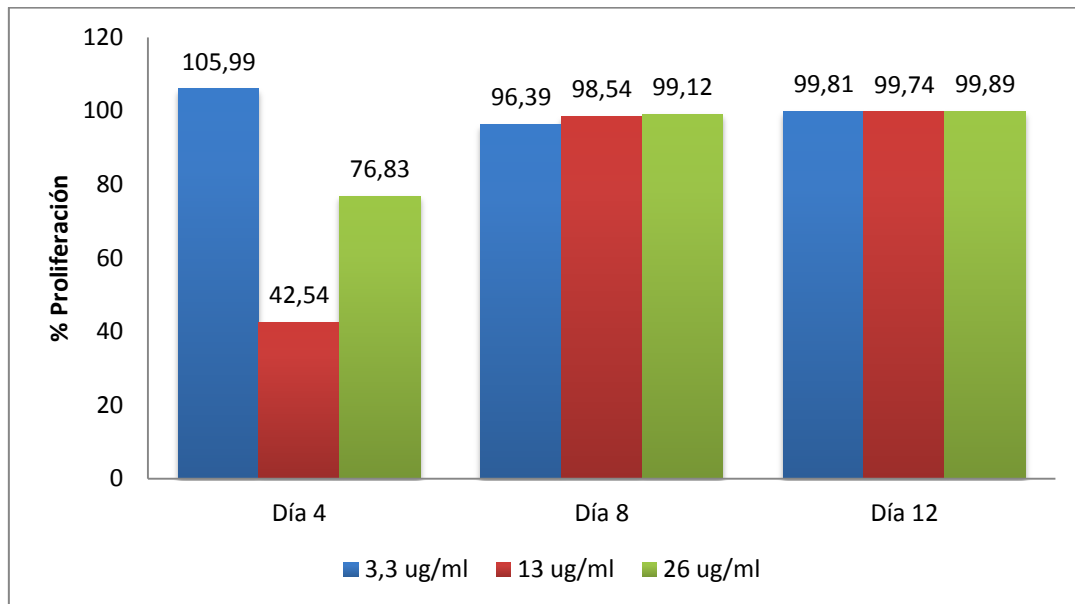


Figura 25. Porcentajes de proliferación inducidos por los controles DMSO transcurrido el tiempo de medición.

Resultados (Figura 25):

- Los porcentajes de proliferación son menores a los del grupo control en cada día de medición, excepto el porcentaje de la dilución de DMSO equivalente a 3.3 ug/ml en el día 4.
- La mayor diferencia de los porcentajes de proliferación entre concentraciones de DMSO se observa en el día 4.
- En el día 8 y 12, los porcentajes de proliferación tienden a ser similares al grupo control. Siendo la diferencia mayor de un 3.6% respecto al DMEM (correspondiente a las microdosis 3.3 ug/ml en el día 8).

		% DE PROLIFERACIÓN			
FÁRMACO	MICRODOSIS	DÍA 4	DÍA 8	DÍA 12	PROMEDIO %
NIFEDIPINO	3.3 ug/ml	98,8	100,45	99,88	99,71
	13 ug/ml	59,33	99,8	100,61	86,58
	26 ug/ml	37,31	98,25	100,1	78,5

Tabla XIII. Porcentaje de proliferación promedio de Microdosis de Nifedipino. *Calculo del promedio de los porcentajes de proliferación inducidos por cada microdosis de Nifedipino en el día 4, 8 y 12.*

Resultados (Tabla XIII):

- Las tres microdosis farmacológicas de Nifedipino estudiadas presentan en promedio, un porcentaje de proliferación menor al del grupo control al cabo de las tres mediciones.
- Comparando las tres microdosis farmacológicas se observa que la microdosis de 3,3 ug/ml presenta el porcentaje de proliferación promedio mayor, y que la microdosis de 26 ug/ml presenta en promedio el menor porcentaje de proliferación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las siguientes tablas se muestran las medidas descriptivas (RFU) con sus valores promedio y desviación estándar, correspondientes a cada microdosis farmacológica y día de medición.

Podemos observar en algunos casos que los valores son muy similares, por lo que con las pruebas de normalidad y significancia debemos determinar si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Con este objetivo se aplicarán:

- Test de ANOVA
- T-Student.

CICLOSPORINA

Microdosis	Día	Ciclosporina			
		Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
125 ng/ml	Día 4	3173560	173826,2	2978970	3387370
	Día 8	4698566	107879,7	4546029	4783856
	Día 12	4948779	24125,74	4922212	4993311
500 ng/ml	Día 4	2830775	255507,4	2460840	3130700
	Día 8	4558025	94560,31	4437925	4681078
	Día 12	9360988	505978,1	8415974	9816306
1 ug/ml	Día 4	1243765	110461,1	1137540	1443650
	Día 8	4743044	46575,46	4705110	4806321
	Día 12	4958124	7044,085	4948992	4970178

Tabla XIV. Análisis de las medidas RFU de Ciclosporina: Valor correspondiente a cada microdosis de Ciclosporina, expresada en los intervalos de tiempo de 4, 8 y 12 días, analizado según promedio y desviación estándar.

Realizando el análisis descriptivo se puede evidenciar una diferencia entre el día 4 con el 8 y 12, siendo los valores más bajos en el primero. Lo anterior se comprueba mediante las siguientes pruebas de significancia ANOVA y T – Student.

Al realizar las comparaciones entre días para cada microdosis por separado, el valor p es aproximadamente 0 siendo las diferencias estadísticamente significativas según Test ANOVA:

Dosis (día 4 vs día 8 vs día 12)	Valor P
125 ng/ml	≈0,000
500 ng/ml	≈0,000
1 ug/ml	≈0,000

Tabla XV. Aplicación del test ANOVA: Para comparar variación de cada microdosis en las tres mediciones de tiempo.

La tabla anterior corrobora que los valores de RFU obtenidos según microdosis son estadísticamente diferentes en relación a los días de medición.

Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos días se aplica la prueba T – Student, obteniendo:

Dosis	Contraste	Valor P
125 ng/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
500 ng/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
1 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000

Tabla XVI. Aplicación test T- Student: Para comparar cada microdosis y la variación de RFU entre los intervalos de tiempo.

La tabla anterior corrobora que los valores de RFU obtenidos según microdosis al comparar dos días son diferentes estadísticamente.

Ahora en el caso de querer comparar por microdosis (125 ng/ml = 500 ng/ml = 1 ug/ml) tendríamos lo siguiente aplicando Test ANOVA como prueba de hipótesis:

Día(125 ng/ml = 500 ng/ml = 1 ug/ml)	Valor P
4	≈0,000
8	≈0,006
12	≈0,000

Tabla XVII. Aplicación del test ANOVA: Para evaluar cambios significativos de la RFU en el tiempo, luego de la aplicación del fármaco en sus respectivas microdosis.

Esta prueba nos entrega la información adecuada para poder decir que los grupos son distintos entre sí.

FENITOÍNA

Dosis	Día	Fenitoína			
		Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
5 ug/ml	Día 4	2940182	345450	2575600	3474070
	Día 8	4858110	52765.88	4788809	4906823
	Día 12	4965266	1708,499	4963199	4967549
20 ug/ml	Día 4	1811853	210265,3	1576420	2103870
	Día 8	4857742	25926	4827041	4902144
	Día 12	4954755	4219,905	4948633	4961138
40 ug/ml	Día 4	891930	109705,6	756317	1.041.360
	Día 8	4694430	81541,06	4589921	4813992
	Día 12	4948492	11218,72	4933438	4960581

Tabla XVIII. Análisis de las medidas RFU de Fenitoína: Valor correspondiente a cada microdosis de Fenitoína, expresada en los intervalos de tiempo de 4, 8 y 12 días, analizado según promedio y desviación estándar.

Al realizar las comparaciones entre los días para cada microdosis por separado tenemos lo siguiente aplicando el Test ANOVA:

Dosis (día 4 vs día 8 vs día 12)	Valor P
5 ug/ml	≈0,000
20 ug/ml	≈0,000
40 ug/ml	≈0,000

Tabla XIX. Aplicación del test ANOVA: Para comparar variación de cada microdosis en las tres mediciones de tiempo.

La aplicación del test comprueba que las variaciones entre las RFU correspondientes a cada microdosis, son estadísticamente diferentes según día de medición.

Para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos días se aplica la prueba T – Student, obteniendo:

Dosis	Contraste	Valor P
5 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
20 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
40 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000

Tabla XX. Aplicación test T- Student: Para comparar cada microdosis y la variación de RFU existente entre los intervalos de tiempo.

Se comprueba que las variaciones de RFU para cada microdosis en el intervalo de dos días son estadísticamente significativas.

Al comparar las microdosis (5 ug/ml = 20 ug/ml = 40ug/ml) según día de medición, obtenemos lo siguiente aplicando la prueba de hipótesis Test ANOVA:

Día(5 ug/ml =20 ug/ml = 40ug/ml)	Valor P
4	≈0,000
8	≈0,000
12	≈0,003

Tabla XXI. Aplicación del test ANOVA: Para evaluar cambios significativos de la RFU en el tiempo, luego de la aplicación del fármaco en sus respectivas dosis.

Esta prueba nos entrega la información adecuada para poder decir que los grupos son totalmente distintos.

NIFEDIPINO

Dosis	Día	Nifedipino			
		Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
3,3 ug/ml	Día 4	5551427	259991,4	5326860	6016760
	Día 8	4910647	24669,28	4866272	4935661
	Día 12	4962288,83	2652,58	4959301	4965993
13 ug/ml	Día 4	3334015	280118	308303	382845
	Día 8	4878842,417	16560,97938	4856628	4907187
	Día 12	4998731	5514,22	4993371	5006875
26 ug/ml	Día 4	2096577	36679,68	205.836	215.154
	Día 8	4802814	53042,6	4741840	4878432
	Día 12	4973142	5466,039	4964497	4978164

Tabla XXII. Análisis de las medidas RFU de Nifedipino: Valor correspondiente a cada microdosis de Nifedipino, expresada en los intervalos de tiempo de 4, 8 y 12 días, analizado según promedio y desviación estándar.

Se realiza la comparación de cada microdosis farmacológica entre los días de medición. Para este análisis se aplica test ANOVA y se obtiene lo siguiente:

Dosis (día 4 vs día 8 vs día 12)	Valor P
3.3 ug/ml	≈0,000
13 ug/ml	≈0,000
26 ug/ml	≈0,000

Tabla XXIII. Aplicación del test ANOVA: Para comparar variación de cada microdosis en las tres mediciones de tiempo.

El resultado del test comprueba que las variaciones de RFU por día de medición según cada microdosis farmacológica son estadísticamente distintas.

Aplicación de la prueba T-Student para observar diferencias entre dos días:

Dosis	Contraste	Valor P
3,3 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
13 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000
26 ug/ml	Día 04 = Día 08	≈0,000
	Día 04 = Día 12	≈0,000
	Día 08 = Día 12	≈0,000

Tabla XXIV. Aplicación test T- Student: Para comparar cada microdosis y la variación de RFU existente entre los intervalos de tiempo.

Se comprueba que las variaciones de RFU para cada microdosis en el intervalo de dos días son estadísticamente significativas.

Al comparar las microdosis (3,3 ug/ml = 13 ug/ml = 23 ug/ml) según día de medición, aplicando la prueba de hipótesis Test ANOVA obtenemos lo siguiente:

Día (3,3 ug/ml = 13 ug/ml = 23 ug/ml)	Valor P
4	≈0,000
8	≈0,000
12	≈0,000

Tabla XXV. Aplicación del test ANOVA: Para comparar variación de cada microdosis en las tres mediciones de tiempo

Esta prueba nos entrega la información adecuada para poder decir que los grupos son totalmente distintos.

DISCUSIÓN

Mediante los resultados obtenidos, en relación a las microdosis de 125 ng/ml y 500 ng/ml podemos determinar que la Ciclosporina tiene un efecto proliferativo en los cultivos de fibroblastos, tal como lo planteó *Seymour et al., 1996; Guo et al., 2008; Subramani et al.; Salman et al.; Vahabi et al., todos publicados en el año 2013*, en relación a sus controles de DMEM.

Podemos observar que a mayor tiempo de exposición de los cultivos a la acción de la Ciclosporina en microdosis de 1 ug/ml, entre los días 8 y 12, se observa un incremento del efecto proliferativo lo que es contrario a lo concluido por *Alaaddinoglu, 2005*. En las microdosis de 125 ng/ml y 500 ng/ml la tendencia de variación en el tiempo no se puede determinar.

Las diferencias en los porcentajes de proliferación más evidentes corresponden a la dosis de 500 ng/ml coincidiendo con *Seymour R et al., 1996; Nishikawa et al., 1996; Vahabi et al., 2013; Ramírez 2007*, quienes no solo utilizaban esta dosis como la más recurrente en sus trabajos de investigación, sino que también afirman que al tener dosis menores o mayores a los 500 ng/ml, las diferencias en el porcentaje de proliferación no serían significativas. Esto último, no coincide con los resultados obtenidos debido a que éstos si muestran diferencias estadísticamente significativas entre microdosis aplicada y día de medición. Sin embargo, en cierta medida se cumple en el caso de la microdosis de 1 ug/ml, ya que si bien presenta una tendencia a aumentar el porcentaje de proliferación en el tiempo, sólo superó al porcentaje del grupo control en la medición del día 12 en aproximadamente un 10% contra un 89% de proliferación inducida por 500 ng/ml el mismo día de medición.

En relación a la Fenitoína podemos observar un aumento del porcentaje de poliferación respecto al grupo control, lo que coincide con lo planteado por *Vahabi et al.; Subramani et al., ambos del 2013 y Zhou et al., 1996*. Este aumento en la proliferación se relaciona principalmente a la microdosis de 5 ug/ml y presenta una tendencia de disminución con el paso del tiempo. Por otra parte, se observa que a la aplicación de microdosis de 40 ug/ml se produce un aumento progresivo de este porcentaje, siendo éste aún menor al del grupo control DMEM en cada día de medición, sin embargo se infiere que con el paso del tiempo el efecto proliferativo supere al grupo control, es decir, el efecto en este caso depende del tiempo de exposición al fármaco.

Como indicamos anteriormente la dosis más frecuentemente utilizada en la literatura corresponde a 20 ug/ml, *Correa J et al., 2011; Vahabi et al., 2013*, donde se deben esperar cambios más significativos en cuanto a la proliferación. Sin embargo los resultados de esta investigación muestran que esta microdosis no presenta los

porcentajes de proliferación más destacables, a diferencia de lo observado a una microdosis de 5 ug/ml.

La estabilidad de los porcentajes de proliferación tanto en las dosis como en los días de medición 8 y 12 de la Fenitoína, puede atribuirse a que la acción del fármaco más que estimular la proliferación celular, produce una mayor aposición de fibras colágenas y en consecuencia un aumento de matriz extracelular como lo plantea *Zhou et al., 1996; Ramírez 2007; Vahabi et al., 2013.*

Campbell y Katwa 1997; Ellis et al., 1999; Senthilkumar et al., 2012; Subramani et al., 2014, indican en sus respectivos estudios que el Nifedipino estimula la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que existe un aumento de proliferación a la aplicación de las microdosis de 13 ug/ml y 26 ug /ml en el paso del tiempo, pero el efecto proliferativo esperado se observa sólo al día 12, donde los porcentajes inducidos por el fármaco superan a los del grupo control, correspondiendo al fármaco que menos porcentaje de proliferación induce de los estudiados en este trabajo de investigación.

Según lo planteado por *Ellis et al., 1993, Eslami et al., 2004, Sunil et al., 2013* las microdosis farmacológicas de Nifedipino influyen en los resultados proliferativos de los fibroblastos gingivales. En este estudio, por el contrario, se observa que es el tiempo el que permite cambios proliferativos y no necesariamente las variaciones de concentración medicamentosa utilizada.

Fu et al., 1998; Chiu et al., 2001 indican en sus estudios que a mayor concentración de Nifedipino mayor es su efecto proliferativo, lo anterior difiere de este estudio debido a que los resultados obtenidos con cada microdosis, si bien son significativamente diferentes, son similares entre sí y en relación al grupo control, por lo que no podemos realizar este tipo de aseveración. Es importante destacar que el mayor porcentaje de proliferación promedio es expresado por la microdosis de 3,3 ug/ml, lo que destaca la diferencia con la literatura respecto al aumento directamente proporcional de la proliferación según la microdosis.

En lo que se refiere al solvente DMSO, no se encontró literatura que analice los efectos sobre cultivo de fibroblastos gingivales in vitro, ni el tipo de interacción con los fármacos en estudio, por lo tanto, se ha limitado la interpretación de los resultados a una valoración positiva o negativa sobre el porcentaje de proliferación inducido por los distintos fármacos en estudio, esto es si aumenta o disminuye la proliferación en términos generales.

El DMSO presenta un porcentaje de proliferación menor al grupo control por lo que se puede indicar que afecta negativamente la capacidad proliferativa de los fármacos. Esta influencia negativa fue levemente mayor sobre la Ciclosporina en el

día 8. En la tercera medición, los porcentajes de proliferación expresados por el DMSO fueron menores al grupo control pero muy cercanos al 100% por lo que se infiere que en el día 12 no tuvo mayor influencia sobre la acción proliferativa de los fármacos.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de proliferación promedio de cada microdosis farmacológica aplicada es: Ciclosporina: 125 ng/ml= 109,94%; 500 ng/ml= 133,9%; 1 ug/ml= 86,9% / Fenitoína: 5 ug/ml= 116,64%; 20 ug/ml= 97,72%; 40 ug/ml= 81,16% / Nifedipino: 3.3 ug/ml= 99,71%; 13 ug/ml= 86,58%; 26 ug/ml= 78,5%.
Por lo tanto, se concluye que el mayor efecto proliferativo se obtiene a la aplicación de: 500 ng/ml de Ciclosporina, 5 ug/ml de Fenitoína y 3,3 ug/ml de Nifedipino.
- Mediante los resultados obtenidos se establece que en el caso del Nifedipino el efecto proliferativo aumenta con el tiempo de exposición de las células al fármaco. Esto se cumple también para la microdosis de 40 ug/ml de Fenitoína y 1 ug/ml de Ciclosporina.
En el caso de la microdosis de 5 ug/ml de Fenitoína, el fenómeno de tiempo-dependencia se manifiesta de forma negativa es decir, el efecto de proliferación disminuye a mayor tiempo de exposición.
En los casos de la microdosis de 20 ug/ml de Fenitoína, 125 ng/ml y 500 ng/ml de Ciclosporina no se puede determinar tiempo dependencia debido a que el comportamiento de los porcentajes de proliferación no varía en una tendencia marcada, por lo tanto son necesarios más días de medición.
- Este estudio determina que el efecto proliferativo no es dosis-dependiente. Es decir, no necesariamente a una mayor dosis existe una mayor proliferación fibroblástica. En el caso de la fenitoína esta relación es inversamente proporcional.
- En general, el solvente DMSO disminuye la proliferación celular respecto a los grupos control, por lo que podría afectar negativamente la capacidad proliferativa de los fármacos en estudio.

LIMITACIONES

- Al tratarse de un estudio experimental se debió contar con dependencias apropiadas para dicho fin, las cuales no pertenecían a la Facultad de Odontología.
- Durante el transcurso de la investigación existieron situaciones que retrasaron la obtención de los resultados como la falla mecánica del lector Appliskan Thermo, retraso en la entrega de CO₂ para el Incubador lo que derivó en una baja proliferación de los cultivos y posterior eliminación de los mismos. Se produjo además contaminación de un medio de cultivo el cual afectó a todas las investigaciones que se encontraban en proceso de experimentación, de manera que luego de controlar la situación (2 semanas) se pudo retomar la investigación.
- Debido a que se desconoce de qué forma el solvente DMSO interactúa con los fármacos y modifica el potencial proliferativo de los mismos, no es posible determinar el efecto del fármaco puro.
- Es posible que se hayan producido errores (minimizados en la prueba piloto) derivados del manejo del instrumental, debido a que la formación profesional de la Carrera de Odontología de la Universidad de Valparaíso, si bien incluye actividades de laboratorio, éstas no fueron desarrolladas con los equipos, instrumental ni materiales utilizados en este estudio.

SUGERENCIAS

- Las células fueron obtenidas a partir de una misma muestra, por lo que el factor genético involucrado en la patogénesis de la hiperplasia gingival no fue considerado.
- Estudios futuros deben considerar dentro de la metodología la participación de dos operadores, ya que esto genera mayor probabilidad de errores y por lo tanto mayor variabilidad de los datos. Debido a lo anterior se sugiere también disminuir las oportunidades de intervención.
- Es necesario aumentar la cantidad de datos en relación a los controles, así como también aumentar el número de días de medición y disminuir los intervalos de tiempo entre ellos, con el objetivo de establecer de forma más clara las tendencias de proliferación celular.

- Se sugiere que los operadores de futuras investigaciones posean las destrezas instrumentales y de laboratorio necesarias para llevar a cabo el experimento.
- Para obtener resultados más exactos de los fármacos, se necesitan estudios respecto al potencial antagonico y/o citotóxico del DMSO.

RESUMEN

I. Marco Teórico

La hiperplasia gingival inducida por fármacos se relaciona principalmente con la Ciclosporina, Fenitoína y Nifedipino. Estos inducen cambios en la proliferación celular y aposición de matriz extracelular del fibroblasto. El objetivo de este estudio es determinar las microdosis farmacológicas que produzcan mayor efecto proliferativo en cultivos de fibroblastos humanos al cabo de 12 días de experimentación.

II. Materiales y Métodos

La muestra de tejido es procesada para aislar fibroblastos gingivales. Éstos son cultivados en medio de cultivo DMEM + Glutamax F12 + Penicilina/Estreptomina + SBF e incubadas 48 hrs a 37°C. Luego se siembran 84 pocillos de una placa NUNC de 96 con 1000 células para luego aplicar las disoluciones de microdosis de cada fármaco, siendo 125 ng/ml, 500 ng/ml y 1 ug/ml para la Ciclosporina; 5 ug/ml, 20 ug/ml y 40 ug/ml de Fenitoína; 3,3 ug/ml, 13 ug/ml y 26 ug/ml de Nifedipino, controles de DMSO y DMEM. Las mediciones mediante el lector de placas Appliskan al cabo de 4, 8 y 12 días.

Resultados

La Ciclosporina presenta mayores porcentajes de proliferación comparada con sus controles de DMEM, además presenta mayor efecto proliferativo al día 8 y 12. La Fenitoína y Nifedipino no presentan mayores diferencias en porcentaje en relación a sus controles entre los días 8 y 12. Las mayores diferencias fueron observadas al día 4.

Conclusiones

La dosis de 500 ng/ml de Ciclosporina, 5 ug/ml de Fenitoína y 3,3 ug/ml de Nifedipino, presentan el mayor efecto proliferativo promedio al cabo de 12 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ackermann R & Varas J (2009): Seminario de grado: "Identificación y comparación de las zonas de proliferación de células epidérmicas en piel de conejo y humano y de células foliculares de vibras de conejo, mediante el uso de marcadores de proliferación celular". Carrera de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile.
2. Alaaddinoglu E; Karabay G; Bulut S; Oduncuoglu F; Özdemir H, Bulut Ö & Colak T (2005): Apoptosis in Cyclosporine A-Induced Gingival Overgrowth: A Histological Study. *J Periodontol.* 76:166-170.
3. Alberts B; Hopkin K; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K; Walter P (2006): Introducción a la Biología Celular 2ª edición-2006, Editorial Médica Panamericana.
4. Anderson G & Stern I (1966): The proliferation and migration of the attachment epithelium on the cemental surface of the rat incisor. *Journal of Periodontics.* 4:15.
5. Arce R; Tamayo O; Cortes A (2007): Apoptosis de fibroblastos gingivales en periodontitis. *Colombia Médica.* 38: 197-209.
6. Baptista I (2002): Hereditary gingival fibromatosis: a case report. *J. Clin. Periodontol.* 29:871 - 4.
7. Barakat M; Toto P; Choukas N (1969): Aging and cell renewal of oral epithelium. *J Periodontol.* 40:599 – 602.
8. Bastidas O: Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. *Celoremic Technical Notes.*
9. Beagrie G & Skougaard M (1962): Observations on the life cycle of the gingival epithelial cells of mice as revealed by autoradiography. *Acta Odontol Scand.* 20:15 – 31.
10. Beltrán V; Silva M; Padilla M; Aillapan E; Sanhueza A; Cantín M; Fuentes R (2013): Patrones Morfológicos de Recesiones Gingivales en Población Chilena Adulta. *Int. J. Morphol.* 31: 1365 - 1370.
11. Benavides T; Martínez V; Mitjans M; Infante M; Moran C; Clapés P; Clothier R; Vinardell P (2004): Assessment of the potencial irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal test. *Toxicology* 201: 87 - 93.
12. Bharti V & Bansal C (2013): Drug- induced Gingival Overgrowth: The Nemesis of the Gingiva Unravelled. *J Indian Soc Periodontol.* 17(2): 182 - 187.
13. Bondon – Guitton E; Bagheri H; Montastruc J (2012): Drug-induced Gingival Overgrowth: a study in the French Pharmacovigilance Database. *J Clin Periodontol.* 39: 513-218.
14. Campbell S & Katwa L (1997): Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-b1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 29 (7): 1947-1958.
15. Canepa E (2007): Proliferación o quiescencia: una difícil decisión celular. *Revista Química Viva - Número 1, año 6.*

16. Carranza F; Takei H; Newman M (2009): Periodontología Clínica. Cap. 1, 2, 16, 18. 9ª Edición. Mc Graw – Hill Interamericana Editores S.A. DF-México.
17. Chiu H; Fu E; Chiang C; Liu D (2001): Does nifedipine aggravate cyclosporin-induced gingival overgrowth? An experiment in rats. *J Periodontol.* 72:532–7.
18. Clocheret K; Dekeyser C; Carels C; Willems G (2003): Idiopathic gingival hyperplasia and Orthodontic treatment: a case report. *J. Orthod.* 30:13-9.
19. Cornacchio A; Burneo J; Aragón C (2011): The Effects of Antiepileptic Drugs on Oral Health. *J Can Dent Assoc.* 71:140.
20. Correa J; Queiroz-Junior C; Costa J; Teixeira A; Silva T (2011): Phenytoin-induced overgrowth a review of the molecular, immune and inflammatory features. *ISRN Dent.* 2011: 497850.
21. Cota L; Aquino D; Franco G; Cortelli J; Cortelli S; Costa F (2010): Gingival overgrowth in subjects under immunosuppressive regimens based on cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus. *J Clin Periodontol.* 37(10):894-902.
22. Dongari – Bagtzoglou A (2004): Drug induce gingival enlargement. *J Periodontol.* 75: 1424-31.
23. Dujovny M; Rozario R; Kossovsky N; Diaz F.G; Segal R (1983): Antiplatelet effect of dimethyl sulfoxide, barbiturates, and methyl prednisolone. *Ann NY Acad Sci* 1983; 411: 234-244.
24. Castaño M & Zapata J (2000), *Cultivos Celulares, Principios de Virología*, 49 – 64. Editorial Biogénesis. Medellín, Columbia.
25. Ellis J; Monkman S; Seymour R; Idle J (1993): Determination of Nifedipine in gingival crevicular fluid: A capillary gas chromatographic method for Nifedipine in microlitre volumes of biological fluid. *J Chromatogr.* 621:95-101.
26. Ellis J; Seymour R; Steele J; Robertson P; Butler T; Thomason J (1999): Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. *J Periodontol.* 70:63–7.
27. Escobar L; Alfonso P; Aristizábal F (2009): Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11 (2): 49 – 56.
28. Eslami M; Baghaili F; Jalayer N (2004): An Investigation on gingival hyperplasia induced by nifedipine. *J Dent (Tehran).* 1:33-7.
29. Esterberg H & White P (1945): Sodium dilantin gingival hyperplasia. *Journal of the American Dental Association.* 32: 16-24.
30. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (2003): Position paper on the nonclinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. Londres.
31. Facultad de Medicina UASLP, Laboratorio de Genómica Viral y Humana (2011): Protocolos y Métodos Conteo y evaluación de la viabilidad de células mononucleares.
32. Fernandes M; Gaio E; Susin C; Rösing C; Oppermann R; Rados P (2010): Effect of nifedipine on gingival enlargement and periodontal breakdown in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 55(7):523-9.

33. Fu E; Nieh S; Hsiao C; Hsieh Y; Wikesjo U; Shen E (1998): Nifedipine-induced gingival overgrowth in rats: brief review and experimental study. *J Periodontol.* 69:765–71.
34. Galarza N; Galarza A; Castelares P (2001): Influencia del Tratamiento con Fenitoína Sódica en el Tejido Gingival de Pacientes Epilépticos. *Rev. Per. Neurol.* 7(3).
35. Gartner L; Hiatt J (2002): Tejido Conectivo .*Texto Atlas de Histología.* Págs: 107-112. 2° Edición, Editorial Mc Graw Hill. DF-México.
36. Gómez de Ferraris MA & Campos A (2009): *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental.* Cap. 1, 2, 4, 13, 14. 3° Edición. Editorial Médica Panamericana. DF-México.
37. Guiducci R; Vieira M; De Oliveira M; Chaves M; Lourenco A; Júnior E (2009): Tratamiento de la hiperplasia gingival en una escuela odontológica de Brasil. Conceptos generales, diagnóstico y tratamiento. *Int. J. Odontostomat.* 3(1):55-60.
38. Guo J; Wang W; Yao L; Yan F: Local Inflammation Exacerbates Cyclosporine A-Induced Gingival Overgrowth in Rats. *Inflammation.* 31(6):399-407
39. Hansen E (1966): Mitotic activity of the gingival epithelium in colchicized rats. *Odont T.* 74:229- 239.
40. Hassell TM (1981): Epilepsy and the Oral manifestations of Phenytoin Therapy. *Monogr Oral Sci.* 9:1-205.
41. Hefti A; Eshenaur A; Hassell T; Stone C (1994): Gingival overgrowth in cyclosporine A treated multiple sclerosis patients. *Journal of Periodontology.* 65: 744-749.
42. Hergueta G (2002): Antagonistas del Calcio. *Guía de Hipertensión Arterial.* Págs: 260-263. 2° Edición. Editorial Norma-Capitel. Madrid- España.
43. Instrumentos de detección. Disponible pagina web Thermo Scientific.
44. Izaguirre V & Zabaleta A (1998): Canales de Calcio voltaje-dependientes. *Ciencia e investigación.* 1(1). Disponible en : sisbis.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n1/calcio.html
45. Joshi S & Bansal S: “A Rare Case Report of Amlodipine-Induced Gingival Enlargement and Review of Its Pathogenesis”. Hindawi Publishing Corporation. *Case Reports in Dentistry*, Volume 2013, Article ID 138248, 3 pages.
46. Juan Carlos Ríos PhD (2013): *Guía de Intoxicaciones CITUC.* Escuela de Medicina PUC.
47. Kamali F; Ball D; McLaughlin W; Seymour R (1999): Phenytoin metabolism to 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (HPPH) in man, cat and rat in vitro and in vivo, and susceptibility to phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Periodontal Res.* 34(3):145-53.
48. Kanno C; Oliveira J; Garcia J; Castro A; Crivelini M (2008): 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.* 79: 114-122.

- 49.Karp G (2009): Interacciones entre la célula y su ambiente. *Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos*. Págs: 240-243. 5° Edición. Editorial Mc Graw Hill. DF- México.
- 50.Kaur G; Verhamme K; Dieleman J; Vanrolleghem A; Van Soest E; Stricker B; Sturkenboom M (2010): Association between calcium channel blockers and gingival hyperplasia. *J Clin Periodontol*. 37:625-630.
- 51.Kharasch N; Thyagarajan B.S (1983): Structural basis for the biological activities of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 411:391-402.
- 52.Lederman D; Lumerman H; Reuben S; Freedman P (1984): Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 57:620-2.
- 53.Lifetechnologies, 28 julio 2014. Pagina web de Lifetechnologies.
- 54.Lindhe J; Lang N; Karring T (2009): *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica II*. Capítulos 1, 3, 17, 25, 26. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
- 55.Löe H & Karring T (1969): A quantitative analysis of the epithelium – connective tissue interface in relation to assessments of the mitotic index. *J Dent Res*; 48:634 – 640.
- 56.Löe H &Karring T (1969): Mitotic activity and renewal time of the gingival epithelium of young and old rats. *J Periodont Res*. 4: 18 – 19.
- 57.Lüllmann; Mohr; Hein (2010): *Patologías del SNC*. Farmacología: Texto y Atlas. Págs: 322. 6° Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid- España.
- 58.Maeda K & Sugiyama Y (2011): Novel strategies for microdose studies using non-radiolabeled compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63:532–538.
- 59.Marini M; Greggi S; Passanezi E; Sant’ana A (2004): Gingival recession: prevalence, extension and severity in adults. *J Appl Oral Sci*. 12(3): 250-5.
- 60.Marinovic M (2008): *Inflamación, Daño y Reparación en Enfermedades Reumáticas*. Medwave. 8(6):502.
- 61.Mendoza N (2008): *Farmacología especial: Sistema Cardiovascular-Antianginosos*. Farmacología Médica. Págs: 518-519. 1° Edición. Editorial Médica Panamericana. DF- México.
- 62.Meyer J; Marwath A; Weinmann J (1956): Mitotic rate of gingival epithelium in two age groups. *J Invest Dermatol*. 27:237-247.
- 63.Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) Japan (2008): *Guidance on microdose clinical trial (Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No.0603001*.
- 64.Nakib N & Ashrafi S (2013): Drug – Induced Gingival Overgrowth. *Dis Mon*. (4):225-30.
- 65.Neville BW (2009): *Oral and Maxillofacial Pathology*.3° Edición. Editorial Saunders/Elsevier. Missouri- USA.
- 66.Nishikawa S; Nagata T; Morisaki I; Oka T; Ishida H (1996): Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *Journal of Periodontology*. 67(5):463-471.

67. O'Brien J; Wilson I; Orton T; Pognan F (2002): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267: 5421-5426.
68. Oliveira F; Diniz S; Pereira E; Costa J; Dutra A; Miranda L (2007): Demographic, Pharmacologic, and Periodontal Variables for Gingival Overgrowth in Subjects Medicated With Cyclosporine in the Absence of Calcium Channel Blockers. *J Periodontol*. 78: 254-261.
69. Pérez C (2008): Tesis de pregrado: "Cinética de crecimiento celular para fibroblastos humanos cultivados en formulaciones de fibrina aislada o incluida en una matriz porosa entrecruzada". Carrera de Química y Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Chile.
70. Pitaru S; Mc Culloch C; et al (1994): Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res*. 29: 81-94
71. Portal Medicina molecular de FIBAO, 2008, observado el 28 de julio 2014.
72. Quesada A & Redondo J (2003): La ruta de señalización CA⁺⁺/Calcineurina/NFAT en la activación endotelial y angiogénesis: Efectos de la Ciclosporina A. *Revista de Nefrología*. 23(3).
73. Ramírez A (2007): Tesis Doctoral: "Estudio celular y molecular en cultivos de fibroblastos tratados con fármacos inductores de agrandamiento gingival". Organogénesis y Anatomía Clínica Aplicada. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España.
74. Rassmussen E (1999): Use of the fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In vitro and molecular toxicology* 12:47-58
75. Rateitschak-Pluss E; Hefti A; Lortscher R; Thiel G (1983): Initial observation that cyclosporine-A induces gingival enlargement in man. *Journal of Clinical Periodontology*. 10: 237-246.
76. Reyna M (2012): Tesis de pregrado: "Expresión y secreción de factor de crecimiento transformante β_3 en células madre mesenquimáticas CD105 positivas". Carrera de Química y Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Chile.
77. Saito K; Mori S; Iwakura M; Sakamoto S (1996): Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta, b-FGF and HsgG in gingival hyperplasia induced by Nifedipine and phenytoin. *J Periodontal Res*. 31:545-55.
78. Sanjeev J. & Sucheta B. (2013): Case Report: A Rare Case Report of Amlodipine-Induced Gingival Enlargement and Review of Its Pathogenesis. Hindawi Publishing Corporation. Case Reports in Dentistry Volume 2013, Article ID 138248, 3 pages.
79. Salman B; Vahabi S; Movaghar S; Mahiour F (2013): Proliferative and Inductive Effects of Cyclosporine a on gingival fibroblast of child and adult. *Dent Res J (Isfahan)*. 10(1): 52-58.
80. Seymour R; Jacobs D (1992): Cyclosporine and the gingival tissues. *Journal of Clinical Periodontology*. 19: 1-11.

81. Seymour R; Thomason J; Ellis J (1996): The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 23: 165-175.
82. Sigma Aldrich, 28 de julio de 2014.
83. Silvera L & Barrios de Zurbarán C (2002): La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.).*16: 9-18.
84. Skougaard M, Beagrie G (1962): The renewal of gingival epithelium in marmosets (*Callithrix Jacchus*) as determined through autoradiography with thymidine – H3. *Acta Odontol Scand.* 20:467 - 484.
85. Soga Y; Nishimura F; Ohtsuka Y; Araki H; Iwamoto Y; Naruishi H, (2004): CYP2C polymorphisms, phenytoin metabolism and gingival overgrowth in epileptic subjects. *Life Sci.* 74(7):827-834.
86. Stern I (1967): Further electron microscopic observations of the epithelial attachment. *International Association for Dental Research Abstracts, 45th general meeting;* 118.
87. Subramani T; Rathnavelu V; Alitheen N (2013): The Possible Potencial Therapeutic Targets for Drug Induced Gingival Overgrowth. *Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation. Vol 2013.*
88. Subramani T; Senthilkumar K; Periasamy S; Rao S (2012): Expression of Angiotensin II and its receptors in cyclosporine-induced gingival overgrowth. *Journal of Periodontal Research.*48 (3): 386–391.
89. Sunil P; Nalluswami J; Sanghar S; Joseph I (2012): Nifedipine-induced gingival enlargement: Correlation with dose and oral hygiene. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(2):191-3.
90. Susin C; Haas A; Oppermann R; Haugejorden O; Albandar J. (2004): Gingival Recession: Epidemiology and Risk Indicators in a representative urban brazilian population. *J Periodontol.* 75: 1377-1386.
91. Swamikannu B; Kumar K; Jayesh R; Rajendran S; Muthupalani R; Ramanathan A (2013): Comprehensive Mutation Analysis of PIK3CA, p14ARF, p16INK4a and p21Waf1/Cip1 Genes is Suggestive of a Non- Neoplastic Nature of Phenytoin Induced Gingival Overgrowth. *Asian Pac J Cancer Prev.*14(5):2743-6
92. Thermo Scientific CO2 Incubators, pág. 15, 28 de Julio 2014.
93. Thomas M; Hassell T; Hefti A (1991): Drug-Induced Gingival Overgrowth: Old Problem, New Problem. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 2(1): 103—137.
94. Thomas W & Kornmann K (2003): *Fundamentals of Periodontics.* 2º Edición. Editorial Quintessence Books.
95. Tripathi (2008): *Agentes Cardiovasculares. Bloqueantes de los canales de Calcio. Farmacología en Odontología.* Págs: 180-182. 1º Edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires- Argentina.
96. Trott J, Gorenstein S (1963): Mitotic rates in the oral and gingival epithelium of the rat. *Archives of Oral Biology.* 8:425-34.
97. US Department of Health and Human Services, Food, Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research Guidance for industry, investigators, and Reviewers exploratory IND studies (2006).

98. Vahabi S; Salman B; Rezazadeh F; Namdari M (2013): Effects of cyclosporine and phenytoin on biomarker expressions in gingival fibroblasts of children and adults: an in vitro study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2:1-7.
99. Velásquez B; Lorenzo P (2008): Fármacos Anticonvulsivantes y Antiepilépticos. *Farmacología Básica y Clínica.* Págs: 243-253. 18° Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid-España.
100. Zhang H; Du H; Zhang J (2004): Assay of mitochondrial functions by resazurina in vitro. *Acta Pharmacological Sinica.* 25: 385-389.
101. Zhou L; Pihlstrom B; Hardwick J; Park S; Wrighton S; Holtzman J (1996): Metabolism of phenytoin by the gingiva of normal humans: The possible role of reactive metabolites of phenytoin in the initiation of gingival hyperplasia. *Clin Pharmacol Ther.* 60(2):191-8.

ANEXO 1

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD COMITÉ DE EVALUACIÓN ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Consentimiento Informado para Obtención de Biopsia y Uso de la misma

Este consentimiento se aplicará a pacientes mayores de edad que asistan para atención odontológica en la Clínica B de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso y que requieran, como necesidad de tratamiento, extracción dental ya sea por caries, trauma, enfermedad endodóntica y/o periodontal.

Alumnas tesistas:

- Nicol Escudero Aguilera, alumna de 6to año.
- Camila López Barría, alumna de 6to año.

Organizaciones:

- Escuela de Odontología Universidad de Valparaíso.
- Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

Proyecto de Investigación:

- *COMPARACIÓN DEL EFECTO PROLIFERATIVO DE MICRODOSIS DE FÁRMACOS INDUCTORES DE HIPERPLASIA GINGIVAL SOBRE CULTIVOS DE FIBROBLASTOS GINGIVALES: CICLOSPORINA, FENITOÍNA Y NIFEDIPINO.*

Esta investigación corresponde a un proyecto de tesis necesario para la obtención del título de Cirujano Dentista de la Universidad de Valparaíso y tiene como finalidad ver el efecto de distintos fármacos sobre cultivos de fibroblastos humanos. Para la realización de este se requiere al menos una muestra de un paciente que requiera como tratamiento la extracción de una pieza dental, ya sea por caries, trauma, enfermedad periodontal y/o enfermedad endodóntica. Por lo tanto la biopsia obtenida durante el procedimiento quirúrgico será la utilizada en la investigación y en consecuencia su obtención no significa un tratamiento adicional para el paciente.

Los riesgos posibles a los que se puede enfrentar el paciente son los asociados a la extracción dental tradicional, dentro de los cuales se encuentran dolor, inflamación y molestia en la zona de la exodoncia.

Además cabe destacar que los datos personales pesquisados en la ficha clínica odontológica no son utilizados en esta investigación, por lo que existe completa confidencialidad.

Al ser la biopsia procesada y trabajada en los Laboratorios de Inmunología de Facultad de Farmacia se debe informar que no solo se encontrará manipulada por las alumnas tesistas, sino que también por personas pertenecientes al laboratorio antes nombrado y colaboradores externos (estudiantes, tesistas y profesores de universidades asociadas).

Dicho esto:

Leí la información precedente, he tenido la oportunidad de hacer preguntas acerca de ella y todas me fueron respondidas a mi entera satisfacción. Yo _____, RUT _____, decido participar de manera voluntaria en la investigación y entiendo que este procedimiento no afecta de ninguna manera mi plan de salud. Acepto las condiciones antes nombradas y permito que las muestras obtenidas durante mi extracción dental sean utilizadas con fines investigativos, ahora y en un futuro, por las investigadoras y por aquellos que pertenezcan, trabajen y/o colaboren, de manera interna y/o externa (entendiéndose esta última como tesistas de otras Universidades) en investigaciones con la Escuela de Odontología y Facultad de Farmacia, ambas de la Universidad de Valparaíso y también podrán ser utilizadas con fines investigativos por proyectos de otras Universidades asociadas.

(Firma del Participante)

Investigadores:

Nicol Escudero A _____

Camila López B _____

Fecha: _____

(Con copia al paciente)

ANEXO 2

BASE DE DATOS

Tablas correspondientes a los datos obtenidos en las mediciones a 4, 8 y 12 días.

- **NIFEDIPINO**

NIFEDIPINO DÍA 4			
N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A01	Medio de cultivo	5074200	5561420
B01	[3,3 ug/ml]	5411840	6016760
C01	[3,3 ug/ml]	6818400	5341460
C02	[3,3 ug/ml]	7945790	6019460
B02	[3,3 ug/ml]	5633430	6091040
A02	Medio de cultivo	4213410	5852930
A03	Medio de cultivo	4561990	5671980
B03	[3,3 ug/ml]	4681240	5578210
C03	[3,3 ug/ml]	6402280	5326860
C04	DMSO [3,3 ug/ml]	5703360	4854650
B04	DMSO [3,3 ug/ml]	2729770	6207860
A04	Medio de cultivo	3426610	5389070
B05	[13 ug/ml]	3828450	7830130
C05	[13 ug/ml]	3427200	4686390
C06	[13 ug/ml]	3366870	4561450
B06	[13 ug/ml]	3090760	5182060
B07	[13 ug/ml]	3207780	5354550
C07	[13 ug/ml]	3083030	5342990
C08	DMSO [13 ug/ml]	2387360	5869650
B08	DMSO [13 ug/ml]	2393410	5506340
B09	[26 ug/ml]	2700060	2364880
C09	[26 ug/ml]	2234080	2071060
C10	[26 ug/ml]	2113100	2211280
B10	[26 ug/ml]	2067290	2151540
B11	[26 ug/ml]	2366250	2467930
C11	[26 ug/ml]	2118110	2058360
C12	DMSO [26 ug/ml]	1558220	4407740
B12	DMSO [26 ug/ml]	1720480	4227100

NIFEDIPINO DIA 8			
N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A05	Medio de cultivo	4912465,5	4628258
A06	Medio de cultivo	4870183	4624285,5
A07	Medio de cultivo	4914465,5	4606781,5
A08	Medio de cultivo	4855573,5	4636158
D01	[3,3 ug/ml]	4924343,5	4812867,5

D02	[3,3 ug/ml]	4866271,5	4758857
D03	[3,3 ug/ml]	4935661	4751743
D04	DMSO [3,3 ug/ml]	4897520,5	4594264,5
D05	[13 ug/ml]	4882910	4774966
D06	[13 ug/ml]	4871511,5	4717212,5
D07	[13 ug/ml]	4826456,5	4753492,5
D08	DMSO [13 ug/ml]	4935203,5	4648707
D09	[26 ug/ml]	3462126,3	4789327,5
D10	[26 ug/ml]	3475179,8	4795897,5
D11	[26 ug/ml]	3430128,5	4878431,5
D12	DMSO [26 ug/ml]	4953726	4842729,5
E01	[3,3 ug/ml]	4900632	4838511,5
E02	[3,3 ug/ml]	4914176	4835125,5
E03	[3,3 ug/ml]	4922797,5	4814686,5
E04	DMSO [3,3 ug/ml]	4880665	4829638
E05	[13 ug/ml]	4877272	4932853
E06	[13 ug/ml]	4856628	4877546
E07	[13 ug/ml]	4907187	4935618
E08	DMSO [13 ug/ml]	4837143	4796929,5
E09	[26 ug/ml]	2460356,3	4758867,5
E10	[26 ug/ml]	2783004,3	4741840
E11	[26 ug/ml]	2472883,3	4852520,5
E12	DMSO [26 ug/ml]	4847744	4791277

NIFEDIPINO DIA 12

N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A09	Medio de cultivo	4969783	4958794,5
A10	Medio de cultivo	4969660	4957560
A11	Medio de cultivo	4974204	4950038
A12	Medio de cultivo	4837639,5	4944400
F01	[3,3 ug/ml]	4987984,5	4960341,5
F02	[3,3 ug/ml]	5008265	4959301,5
F03	[3,3 ug/ml]	4996300,5	4960684,5
F04	DMSO [3,3 ug/ml]	4993836,5	4953008
F05	[13 ug/ml]	4993370,5	4957313,5
F06	[13 ug/ml]	5003111	4940881,5
F07	[13 ug/ml]	5006874,5	4953165
F08	DMSO [13 ug/ml]	5009454,5	4953133
F09	[26 ug/ml]	4973494	2063220
F10	[26 ug/ml]	4968909	3830880,3
F11	[26 ug/ml]	4978164	2956376,8
F12	DMSO [26 ug/ml]	4992422	4963512,5
G01	[3,3 ug/ml]	5000268,5	4964743,5

G02	[3,3 ug/ml]	5002799	4965993
G03	[3,3 ug/ml]	5005190	4962669
G04	DMSO [3,3 ug/ml]	4991304	4964556,5
G05	[13 ug/ml]	4995333	4966909,5
G06	[13 ug/ml]	4999941,5	4956597,5
G07	[13 ug/ml]	4993752,5	4949958
G08	DMSO [13 ug/ml]	4980034	4958074,5
G09	[26 ug/ml]	4978161,5	2898464,5
G10	[26 ug/ml]	4975629	3037640,8
G11	[26 ug/ml]	4964496,5	4358543
G12	DMSO [26 ug/ml]	4986906	4962043,5

- CICLOSPORINA

CICLOSPORINA DIA 4

N ° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A01	Medio de cultivo	2442700	3222300
B01	[125 ng/ml]	3079580	4949450
C01	[125 ng/ml]	3661960	5417610
C02	[125 ng/ml]	3340530	5383740
B02	[125 ng/ml]	2978970	4307110
A02	Medio de cultivo	2012820	3072650
A03	Medio de cultivo	2379330	2789610
B03	[125 ng/ml]	3012270	4010400
C03	[125 ng/ml]	3387370	3242640
C04	DMSO [125 ng/ml]	2179670	2304700
B04	DMSO [125 ng/ml]	1927170	2243320
A04	Medio de cultivo	1826990	1973560
B05	[500 ng/ml]	2460840	2249280
C05	[500 ng/ml]	3095650	2110720
C06	[500 ng/ml]	2713160	1630060
B06	[500 ng/ml]	2712660	1717360
B07	[500 ng/ml]	3130700	1574630
C07	[500 ng/ml]	2871640	1696810
C08	DMSO [500 ng/ml]	2202520	923120
B08	DMSO [500 ng/ml]	1874850	1134080
B09	[1 ug/ml]	2596440	1443650
C09	[1 ug/ml]	2903930	1257930
C10	[1 ug/ml]	2598100	1256350
B10	[1 ug/ml]	2293690	1137540
B11	[1 ug/ml]	2938320	1216440
C11	[1 ug/ml]	3433120	1150680
C12	DMSO [1 ug/ml]	2228000	953233

B12	DMSO [1 ug/ml]	1867670	941808
------------	----------------	---------	--------

CICLOSPORINA DIA 8

N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A05	Medio de cultivo	4795929,5	4819457,5
A06	Medio de cultivo	4672734	4778905,5
A07	Medio de cultivo	4744092,5	4807015,5
A08	Medio de cultivo	4767589,5	4784802,5
D01	[125 ng/ml]	4775735	4768417,5
D02	[125 ng/ml]	4124898,8	4546029
D03	[125 ng/ml]	4336138,5	4490420,5
D04	DMSO [125 ng/ml]	4447048	4365689
D05	[500 ng/ml]	4504799,5	4681078
D06	[500 ng/ml]	4625218,5	4739019
D07	[500 ng/ml]	4042391,8	4437925
D08	DMSO [500 ng/ml]	3688730	4148583,8
D09	[1 ug/ml]	1330160,6	4705320
D10	[1 ug/ml]	4599444,5	4711883
D11	[1 ug/ml]	4647080,5	4796919
D12	DMSO [1 ug/ml]	4086575,5	4241274
E01	[125 ng/ml]	4783856	4741238
E02	[125 ng/ml]	2228643,3	4576120
E03	[125 ng/ml]	4136467	4485589
E04	DMSO [125 ng/ml]	4514394	4503156,5
E05	[500 ng/ml]	1413756,4	4809530,5
E06	[500 ng/ml]	3739686	4611414,5
E07	[500 ng/ml]	2921083,8	4487712,5
E08	DMSO [500 ng/ml]	4244908,5	4390433,5
E09	[1 ug/ml]	2629562,3	4809475,5
E10	[1 ug/ml]	4732709,5	4806320,5
E11	[1 ug/ml]	2559262,3	4705109,5
E12	DMSO [1 ug/ml]	4458248,5	4180557,5

CICLOSPORINA DIA 12

N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A05	Medio de cultivo	4968912,5	4956493,5
A06	Medio de cultivo	4951226,5	4957870,5
A07	Medio de cultivo	4888155,5	4966602
A08	Medio de cultivo	4951465,5	4946607,5
D01	[125 ng/ml]	4946240,5	4939612
D02	[125 ng/ml]	811729,6	967531,4
D03	[125 ng/ml]	4819362,5	4938190,5
D04	DMSO [125 ng/ml]	4878653,5	4972468

D05	[500 ng/ml]	821581,7	1166575,9
D06	[500 ng/ml]	4923624	9336671
D07	[500 ng/ml]	816812,4	9289928
D08	DMSO [500 ng/ml]	4859073,5	4886360
D09	[1 ug/ml]	4935442	4958311,5
D10	[1 ug/ml]	4936455,5	935688,4
D11	[1 ug/ml]	4948992	4844294
D12	DMSO [1 ug/ml]	4858812,5	4853194
E01	[125 ng/ml]	860741,9	4830496
E02	[125 ng/ml]	4922211,5	982679,8
E03	[125 ng/ml]	4953107	4993311
E04	DMSO [125 ng/ml]	4933462,5	4915459
E05	[500 ng/ml]	4939856,5	9615393
E06	[500 ng/ml]	4955363	9816306
E07	[500 ng/ml]	8415974	9691655
E08	DMSO [500 ng/ml]	4887419	4892291,5
E09	[1 ug/ml]	4953816	4933634,5
E10	[1 ug/ml]	4958938	4886633,5
E11	[1 ug/ml]	4958507	4970178
E12	DMSO [1 ug/ml]	4877192	4834133

- FENITOINA

FENITOINA DIA 4			
N ° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A01	Medio de cultivo	3143990	1883800
B01	[5 ug/ml]	4267410	2658770
C01	[5 ug/ml]	6097510	3222330
C02	[5 ug/ml]	6525860	3474070
B02	[5 ug/ml]	5138130	2907430
A02	Medio de cultivo	2755460	2022680
A03	Medio de cultivo	2810960	1864600
B03	[5 ug/ml]	4561850	2575600
C03	[5 ug/ml]	5572350	2802890
C04	DMSO [5 ug/ml]	3889130	1900660
B04	DMSO [5 ug/ml]	2307570	1752830
A04	Medio de cultivo	2210810	1490110
B05	[20 ug/ml]	2990120	1848870
C05	[20 ug/ml]	2576440	2103870
C06	[20 ug/ml]	3186850	2001310
B06	[20 ug/ml]	2263560	1576420
B07	[20 ug/ml]	3431110	1631400
C07	[20 ug/ml]	2169270	1709250

C08	DMSO [20 ug/ml]	3426840	1531200
B08	DMSO [20 ug/ml]	2935930	1255040
B09	[40 ug/ml]	1857670	836830
C09	[40 ug/ml]	1731860	104136
C10	[40 ug/ml]	1641590	962839
B10	[40 ug/ml]	1783080	756317
B11	[40 ug/ml]	1189330	803112
C11	[40 ug/ml]	2134310	951122
C12	DMSO [40 ug/ml]	2607650	1208160
B12	DMSO [40 ug/ml]	2309320	1006940

FENITOINA DIA 8

N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A05	Medio de cultivo	4801296	4702888,5
A06	Medio de cultivo	4723684,5	4806160
A07	Medio de cultivo	4765164	4662937
A08	Medio de cultivo	4755788	4722861,5
D01	[5 ug/ml]	4898170	4795012,5
D02	[5 ug/ml]	4788808,5	4682075,5
D03	[5 ug/ml]	4890116,5	4653570,5
D04	DMSO [5 ug/ml]	4761100	3905198
D05	[20 ug/ml]	4851505	4569273
D06	[20 ug/ml]	4869931,5	4606192,5
D07	[20 ug/ml]	4827040,5	4386461
D08	DMSO [20 ug/ml]	4814565	4153333,5
D09	[40 ug/ml]	4589920,5	3306405,5
D10	[40 ug/ml]	4621082,5	3486148,8
D11	[40 ug/ml]	4745102,5	3111972
D12	DMSO [40 ug/ml]	4636286,5	3346460,8
E01	[5 ug/ml]	4869732	4237955,5
E02	[5 ug/ml]	4933217	4551454,5
E03	[5 ug/ml]	4906822,5	3694458
E04	DMSO [5 ug/ml]	4687195	3148533,5
E05	[20 ug/ml]	4842167	3636508
E06	[20 ug/ml]	4853662	4696868,5
E07	[20 ug/ml]	4902143,5	3353693,3
E08	DMSO [20 ug/ml]	4759977	3652821,5
E09	[40 ug/ml]	4693194	2860876,5
E10	[40 ug/ml]	4703287	2905968,8
E11	[40 ug/ml]	4813991,5	3763282
E12	DMSO [40 ug/ml]	4744752,5	3585920,3

FENITOINA DIA 12

N° PLACA	CORRESPONDENCIA	RFU	RFU
A05	Medio de cultivo	4968313	4956335
A06	Medio de cultivo	4961634,5	4955869
A07	Medio de cultivo	4983505,5	4943853,5
A08	Medio de cultivo	4958372,5	4964430
D01	[5 ug/ml]	4963199	4959668
D02	[5 ug/ml]	4979908	4951713
D03	[5 ug/ml]	4973387,5	4964996
D04	DMSO [5 ug/ml]	4925579	4902399,5
D05	[20 ug/ml]	4967497	4956450,5
D06	[20 ug/ml]	4953992	4952335,5
D07	[20 ug/ml]	4899107	4955982
D08	DMSO [20 ug/ml]	4967974,5	4961426
D09	[40 ug/ml]	4933437,5	4907973
D10	[40 ug/ml]	4947497,5	4911424,5
D11	[40 ug/ml]	4937282	4953351
D12	DMSO [40 ug/ml]	4945764,5	4962769
E01	[5 ug/ml]	4809308	4963463
E02	[5 ug/ml]	4974570	4966370
E03	[5 ug/ml]	4967548,5	4966021
E04	DMSO [5 ug/ml]	4918525	4935128,5
E05	[20 ug/ml]	4986760,5	4965262,5
E06	[20 ug/ml]	4988928,5	4961138
E07	[20 ug/ml]	4948633	4968836,5
E08	DMSO [20 ug/ml]	4951542	4950460,5
E09	[40 ug/ml]	4974138	4874502
E10	[40 ug/ml]	4958800,5	4905783
E11	[40 ug/ml]	4960580,5	4930229,5
E12	DMSO [40 ug/ml]	4943095	4954714,5

ANEXO 3
(Gráficos de resultados, según fármaco, dosis y día de medición)

CICLOSPORINA:

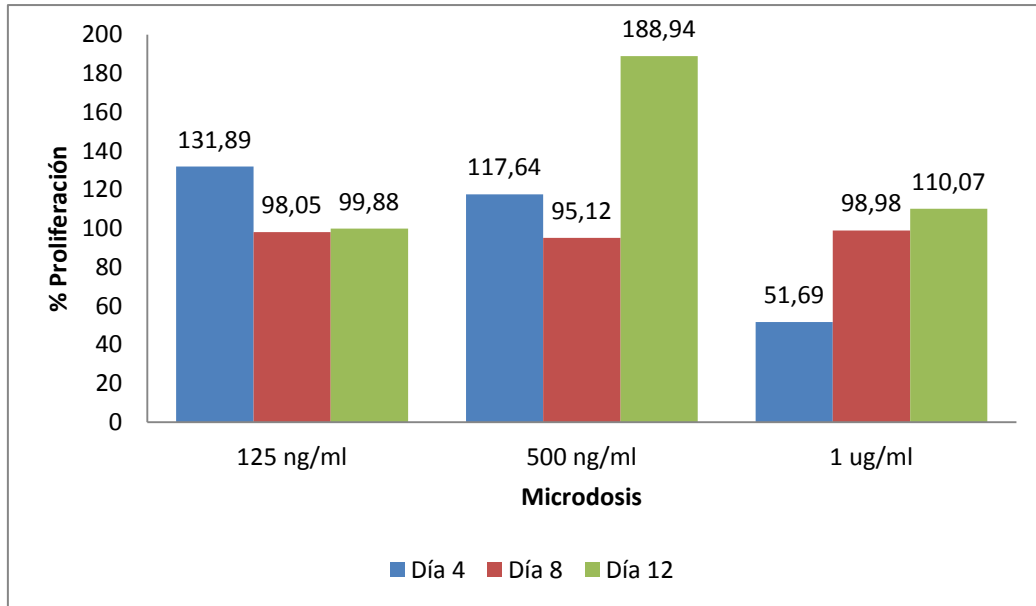


Gráfico 1. Relación entre el porcentaje de proliferación con las microdosis de Ciclosporina, según días de medición.

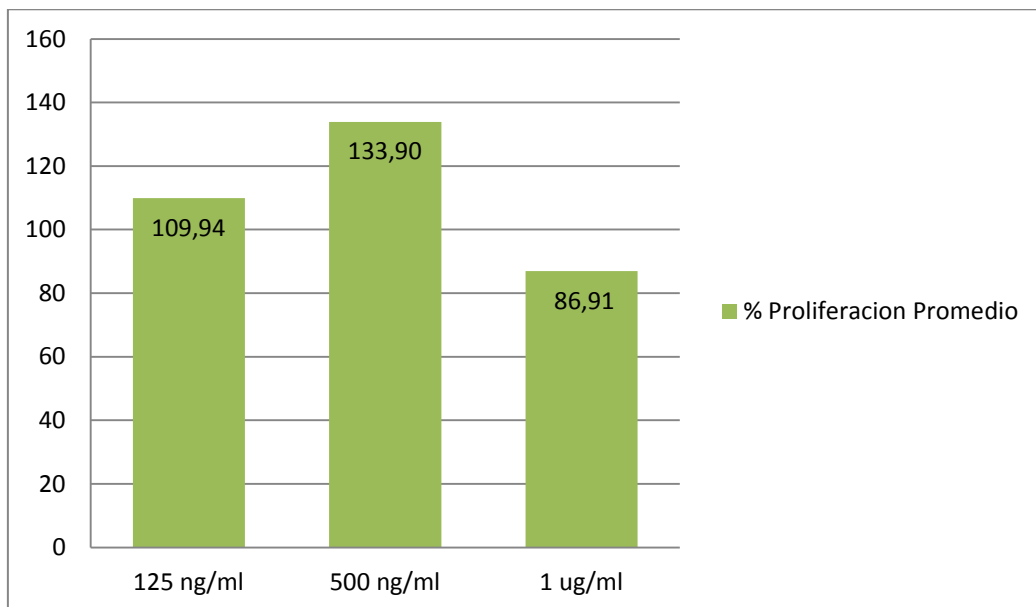


Gráfico 2. Comparación del porcentaje de proliferación promedio entre las 3 microdosis de Ciclosporina.

FENITOINA

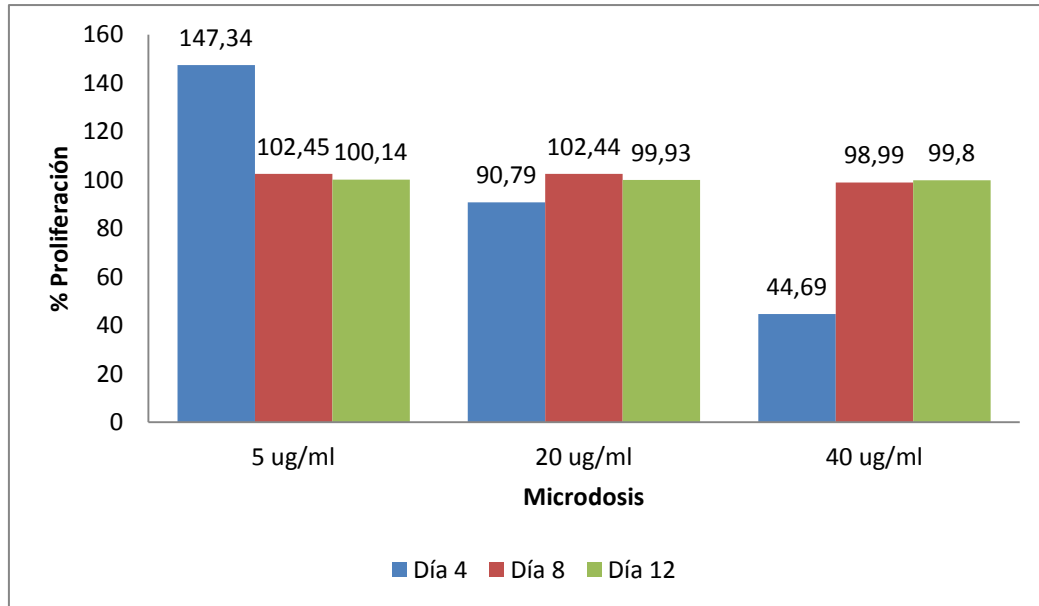


Gráfico 3. Relación del porcentaje de proliferación y microdosis de Fenitoína, según días de medición.

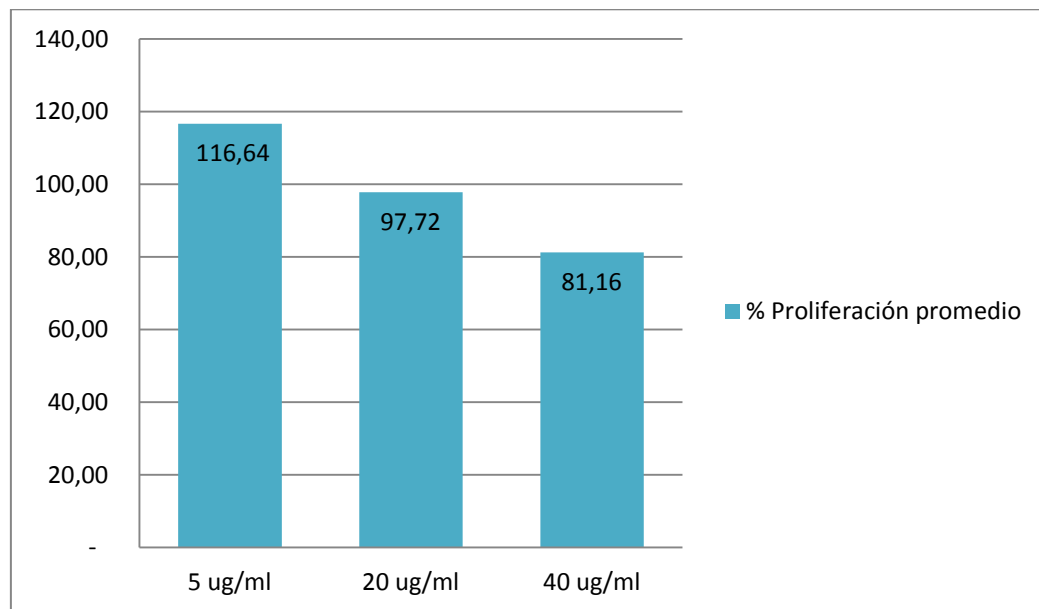


Grafico 4. Comparación del porcentaje de proliferación promedio entre las 3 microdosis de Fenitoína.

NIFEDIPINO

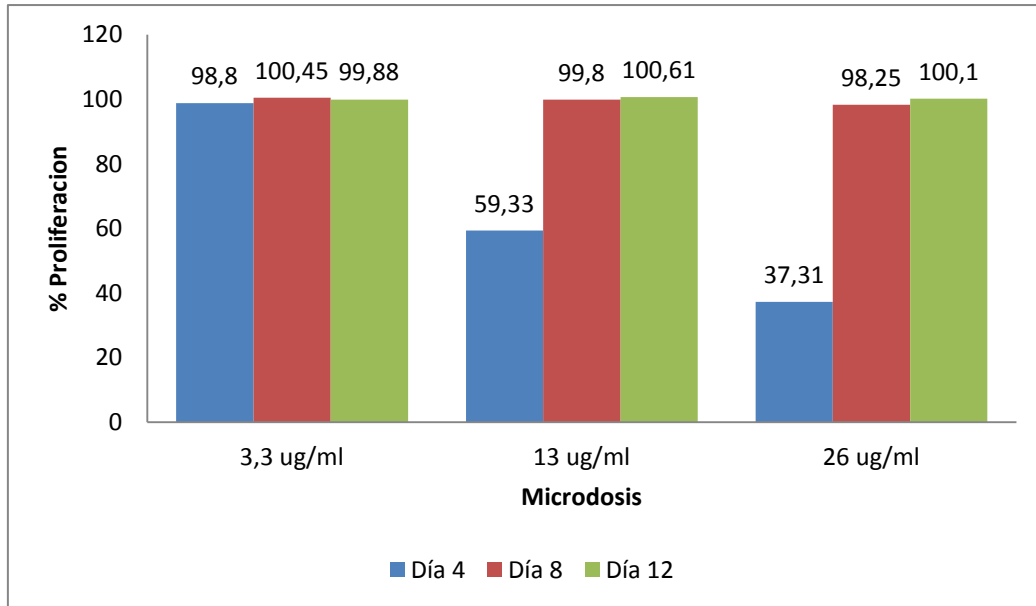


Gráfico 5. Relación del porcentaje de proliferación y microdosis de Nifedipino, según días de medición.

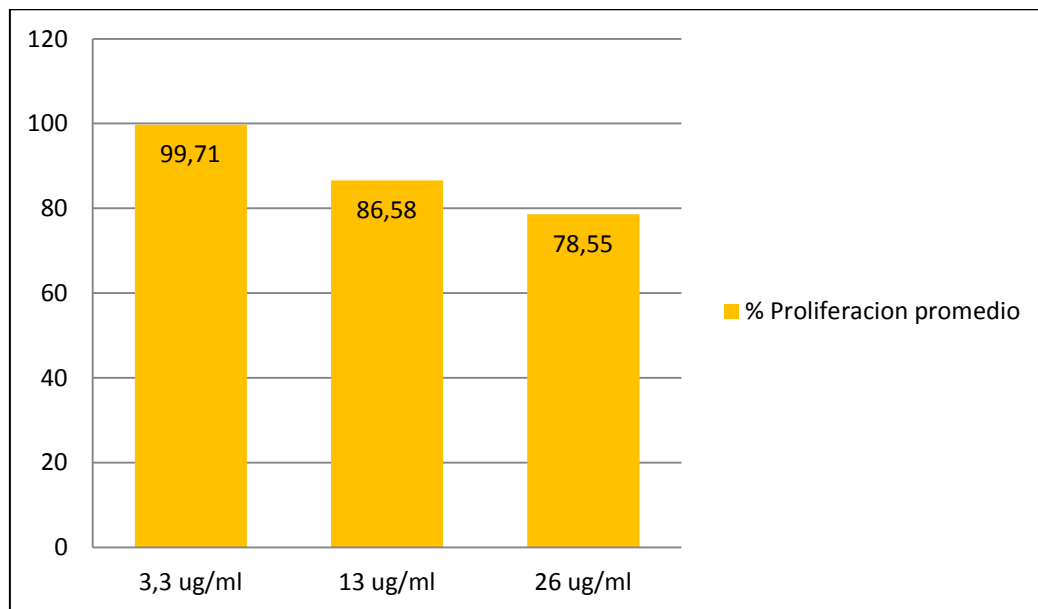


Grafico 6. Comparación del porcentaje de proliferación promedio entre las 3 microdosis de Nifedipino.