



Efecto de la ciclosporina A sobre la expresión y producción de colágeno tipo I en fibroblastos gingivales humanos[§]

Sofía Ríos Villavicencio,* Saúl Cano,** Juan Pedro Laclette,*** Patricia De la Torre,***
Anali Campos Ortega,+ Eileen Uribe-Querol,++

RESUMEN

Introducción: La ciclosporina A es un inmunosupresor utilizado para prevenir el rechazo de órganos trasplantados. Alrededor de un 30% de los pacientes tratados con este inmunosupresor desarrollan agrandamiento gingival. Sin embargo, los eventos celulares y moleculares que causan este agrandamiento son aún desconocidos. El propósito de este trabajo es el de conocer como la ciclosporina A afecta los niveles de expresión y producción de colágeno tipo I. **Material y métodos:** Fibroblastos derivados de una biopsia de un paciente tratado con ciclosporina A se utilizaron para conocer tanto la expresión, mediante RT-PCR, como la producción, mediante inmunocistoquímica, de la colágena tipo I. **Resultados:** Los fibroblastos de encía del paciente tratado con ciclosporina A tuvieron mayor cantidad de ARN mensajero de colágena tipo I que los fibroblastos de un individuo sano. Congruente con este hallazgo, se encontró una cantidad de colágena tipo I mayor en los fibroblastos del paciente que en los fibroblastos del individuo sano. **Conclusión:** La ciclosporina A induce un aumento en la expresión y producción de colágena tipo I por los fibroblastos de la encía.

Palabras clave: Agrandamiento gingival, ciclosporina A, inmunosupresores, colágeno tipo I, fibroblastos.

ABSTRACT

Introduction: Cyclosporine A is an immunosuppressor used to prevent rejection of transplanted organs. About the 30% of the patients treated with this immunosuppressor develop gingival overgrowth. However, the precise cellular events that lead to the pathology are unknown. The aim of this study is to understand how cyclosporine A could be altering the expression and production of collagen I. **Material and methods:** Fibroblast cultures derived from a biopsy of a patient treated with cyclosporine A were used to document both the expression, by RT-PCR, and the production, by immunocytochemistry, of collagen I. **Results:** The amount of messenger RNA for collagen I was higher in gingival fibroblast of the gum of a patient treated with cyclosporine A than in gingival fibroblast of the control person. In concordance with this result, the amount of collagen expressed in gingival overgrowth fibroblast increased with respect to the control fibroblast. **Conclusion:** cyclosporine A induced the overexpression and overproduction of collagen type I by gum fibroblast.

Key words: Gingival overgrowth, cyclosporine A, immunosuppressive drugs, collagen type I, fibroblasts.

INTRODUCCIÓN

La ciclosporina A es un potente inmunosupresor muy utilizado para prevenir el rechazo de órganos trasplantados.^{1,2} Sin embargo, promueve diversos efectos secundarios como disfunción renal, hipertensión, hirsutismo e hiperlipidemia.^{3,4} Además, puede causar agrandamiento gingival en aproximadamente el 30% de los pacientes tratados.^{3,5}

El agrandamiento gingival es el crecimiento exacerbado de la encía y se clasifica con base en los factores etiológicos y los cambios fisiológicos que lo provocan.^{6,7} La clasificación comprende el agrandamiento inflamatorio, el inducido por fármacos, el relacionado con enfermedades sistémicas, el neoplásico y el idiopático.⁸ Existen algunos reportes que indican que el agrandamiento gingival también puede ser heredado.⁹ El agrandamiento gingival eventualmen-

* Especialidad de Periodoncia e Implantología. Facultad de Odontología. División de Estudios de Postgrado e Investigación (DEPeI). Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

** Medicina Regenerativa y Terapia Celular. División de Investigación Biomédica. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

*** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM.

+ Licenciatura en Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, UNAM.

++ Neurobiología y Desarrollo. Facultad de Odontología. DEPeI, UNAM

§ Ganador Primer Lugar. Trabajos de Investigación. Asociación Mexicana de Periodontología, 2012.

te causa problemas de lenguaje, de masticación, de erupción dental y de estética.⁵ El primer caso clínico reportado con agrandamiento gingival inducido por fármacos (en este caso Fenitoína) fue descrito en 1983.¹⁰ El proceso de agrandamiento gingival comienza con un crecimiento indoloro en forma circular de la papila interdental, que se puede extender al margen gingival vestibular y lingual, dependiendo de su severidad.⁷ El agrandamiento gingival se presenta preferencialmente en el sector anterior de la boca y tiene una mayor prevalencia en niños.^{11,12} En el caso del agrandamiento gingival inducido por ciclosporina A, las características antes mencionadas se observan a los tres meses de iniciado el tratamiento¹³ y se ve exacerbado en presencia de placa dentobacteriana.^{3,14}

El agrandamiento gingival inducido por ciclosporina A promueve cambios en la morfofisiología de los fibroblastos gingivales. En el modelo de rata, se ha observado que los fibroblastos gingivales presentan alteraciones histopatológicas y morfológicas ante el tratamiento con ciclosporina A.^{15,16} Con base en estas observaciones, el modelo de rata se ha utilizado para conocer: si el agrandamiento gingival es más grave en la maxila que en la mandíbula, cuál es la dosis y el tiempo mínimo de tratamiento para causar el agrandamiento gingival,¹⁷ y si la edad es un factor que favorece el agrandamiento gingival.¹⁸ El modelo de rata se ha usado también, para conocer si existen cambios en la degradación de colágena¹⁹⁻²¹ o incrementos en la producción de colágena.¹⁶ En humanos, sin embargo, los acontecimientos celulares y moleculares que generan el agrandamiento gingival no se conocen con detalle y los reportes son controversiales. Los modelos de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* se generan tratando con ciclosporina A fibroblastos humanos normales. Estudios con fibroblastos humanos muestran que la proliferación de los fibroblastos aumenta como respuesta al tratamiento con ciclosporina A²² y que la degradación de matriz extracelular promovida por agrandamiento gingival se ve alterada.^{19,23,24} Para investigar el comportamiento de la expresión y producción de colágena tipo I en humanos generamos una línea celular de fibroblastos derivada de un paciente tratado con ciclosporina A.

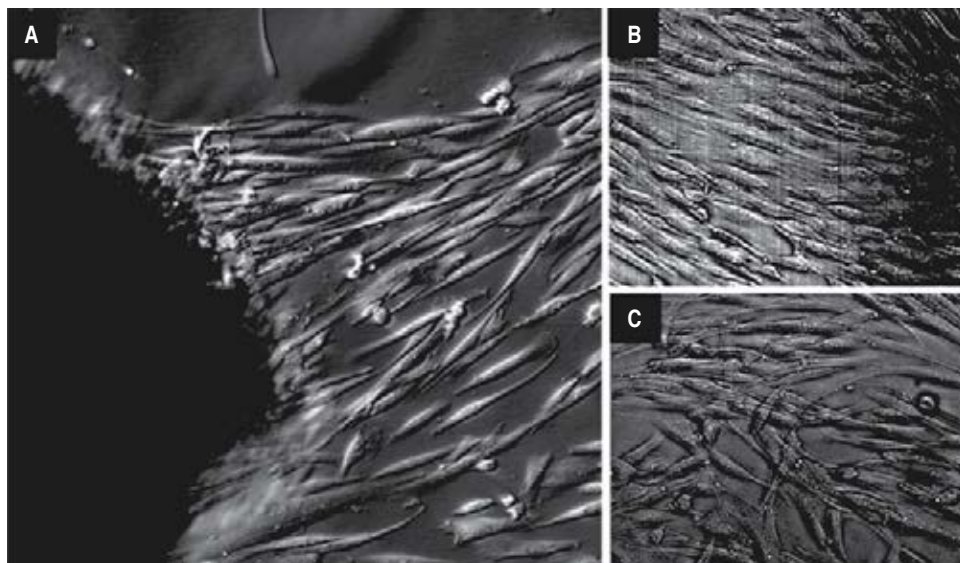
MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares. Se utilizaron dos líneas de fibroblastos gingivales para el desarrollo de este trabajo. La primera línea, GCon se generó en nuestro labora-

torio al derivar fibroblastos gingivales de una biopsia de paladar de un hombre sano de 24 años de edad (*Figura 1A y 1B*). La segunda línea GCsA también se generó en nuestro laboratorio, al derivar fibroblastos gingivales de una biopsia de agrandamiento gingival en papila interdental de un paciente varón de 14 años de edad con trasplante renal y tratado con ciclosporina A (*Figura 1C*).

Derivación de líneas celulares. Cada biopsia se mantuvo en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO; Grand Island, NY) suplementado con L-glutamina (GIBCO; Grand Island, NY), 10% de suero fetal bovino (GIBCO; Grand Island, NY) y una mezcla de antibióticos y antimicótico con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100X, GIBCO; Grand Island, NY). Las biopsias se lavaron con D-MEM y se fragmentaron con un bisturí hoja # 22 en porciones de aproximadamente 1 mm³ sobre una caja de Petri. En seguida, se tomó el contenido de la caja de Petri y se centrifugó a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) durante tres minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y se agregaron 5 mL de una disolución al 0.25% de colagenasa IV (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO) en medio de cultivo D-MEM. La biopsia se mantuvo en esta disolución por dos horas en un baño con agitación constante a una temperatura de 37 °C. Adicionalmente, la biopsia se agitó cada 15 minutos por 15 segundos en un agitador mecánico. La biopsia se centrifugó bajo las mismas condiciones, el botón celular obtenido se resuspendió en D-MEM suplementado y se sembró en un frasco de cultivo de 25 cm³ (COSTAR, Corning Inc. NY). Las líneas celulares se incubaron (Nuair; Plymouth, MN) en condiciones estándares a 37 °C y una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al llegar a confluencia, las líneas celulares se despegaron con 0.25% de tripsina (GIBCO; Grand Island, NY) y se resembraron en frascos de cultivo de 25 cm³. Todos los procedimientos de derivación de fibroblastos se realizaron en condiciones estériles.

Extracción de ARN mediante técnica de Trizol. En cajas de cultivo de seis pozos (COSTAR, Corning Inc.) se cultivaron las líneas celulares y se llevaron a confluencia para extraer el ARN. A grosso modo, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se lavó con dos mL de PBS. Se adicionó 1 mL de trizol (Life Technologies Corporation, Invitrogene, USA) que se recuperó en un tubo Eppendorf. Posteriormente, al tubo se agregaron 200 µL de cloroformo

**Figura 1.**

Morfología de las líneas celulares GCon y GCsA. **A:** Explante de biopsia de encía de paciente tratado con ciclosporina A que muestra la migración de los fibroblastos gingivales hacia el frasco de cultivo. **B:** Morfología de la línea celular GCon. **C:** Morfología de la línea celular GCsA.

y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por cinco minutos para obtener la fase acuosa y ser transferida a otro tubo Eppendorf. Al tubo se agregaron 500 µL de isopropanol, se agitaron por 10 segundos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm por cinco minutos a 4 °C y se obtuvo el botón de ácidos nucleicos. El botón se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm por cinco minutos a 4 °C. El etanol fue removido y el tubo se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el botón se disolvió en 30 µL de agua con DEPC y se incubó en un termoblock (Lab-line; multiblock) por cinco minutos a 55 °C. Las muestras se congelaron a -70 °C hasta su uso.

Cuantificación e integridad del ARN de las líneas celulares. El ARN extraído de cada una de las líneas celulares se cuantificó en un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc. USA). Dos microgramos de ARN total de cada muestra fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% de agarosa para observar su integridad (BIO-RAD; USA).

Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para comparar la expresión de colágeno I en las líneas celulares GCon y GsA se realizó una retrotranscripción y una PCR de un solo paso, utilizando el kit SuperScript One-Step RT-PCR with platinum Taq (Life Technologies Corporation, Invitrogene, USA).

Se utilizaron 25 ng/µL de ARN para cada reacción de RT-PCR. La secuencia de los *primers* se muestra en el *cuadro I*²⁵ y el programa para el PCR en el *cuadro II*. Los productos del RT-PCR se separaron en una cámara de electroforesis (Continental Lab Products; México, D.F.) en geles al 1% de agarosa con bromuro de etidio y se observaron en el fotodocumentador de rayos ultravioleta DNR MiniBispro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.; USA).

Inmunocitoquímica. Para evaluar la producción de la matriz de colágena, se cultivaron células tanto de la línea celular GCon como de la línea GCsA en cubreobjetos colocados en cajas de cultivo de seis pozos (COSTAR; Corning Incorporated, Corning, NY). Después de 48 horas de que los cultivos llegaron a confluencia y se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO), los cultivos fueron lavados con PBS e incubados con 0.25% hialuronidasa en PBS (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO) una hora a 37 °C. Los cultivos fueron lavados con PBS e incubados con disolución bloqueadora (0.5 M Tris, 1.5 M NaCl, 5% albumina, pH = 7.4) una hora a temperatura ambiente. Los cultivos fueron incubados con el anticuerpo de ratón anti-colágena tipo I (Collagen Type I [D-13] sc25974; Santa Cruz Biothecnology; Santa Cruz, CA) en dilución 1/100 por 24 horas a 4 °C en cámara húmeda. El anticuerpo primario se lavó con PBS dos veces durante cinco minutos. Los cultivos fueron incubados con disolución bloqueadora durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente lavados con PBS por cinco minutos. Los cultivos fueron

Cuadro I. Secuencia de *primers* para PCR.

Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	Producto final (pb)	Temperatura de alineación
COL-1 5'- GGC GGC CAG GGC TCC GAC - 3'	COL-1 3'-AAT TCC TGG TCT GGG GCA CC - 5'	347	61 °C
GAPDH 5'- ATT CCA TGG CAC CGT CAA GGC T - 3'	GAPDH 3'- TCA GGT CCA CTG ACA CGT T - 5'	571	62 °C

Cuadro II. Programa del termociclador para RT- PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Función
1	50 °C	30 minutos	Retrotranscripción
2	94 °C	2 minutos	Desnaturalización
3	94 °C	1 minuto	Desnaturalización
4	61 °C y 62 °C	30 segundos	Alineamiento de primers
5	72 °C	1 minuto	Elongación
6	Ir al paso	20 ciclos	Número de repeticiones del paso 3 al paso 5
7	15 °C		Mantener

incubados con anticuerpo anti-IgG de ratón Alexa 488 (Santa Cruz Biothecnology; Santa Cruz, CA) en dilución 1/1000 a 37 °C por dos horas. Los cultivos fueron lavados con PBS durante cinco minutos. Las laminillas fueron observadas en un microscopio Olympus (BX63; Olympus Latin America Inc.).

Los reactivos cuya marca no está especificada fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO).

RESULTADOS

Morfología de las líneas celulares. Las líneas celulares GCon y GCsA no mostraron diferencias morfológicas evidentes (*Figura 1*). Sin embargo, el patrón de distribución celular en el cultivo es diferente. Mientras que la línea control GCon presentó una organización en la distribución de los fibroblastos en cultivo (*Figura 1B*), la línea GCsA presentó una distribución desordenada. Los fibroblastos de la línea GCsA se organizan en círculos y no respetan los bordes de las otras células, es decir, proliferan encima de otros fibroblastos (*Figura 1C*).

Integridad del ARN de las líneas celulares.

La integridad del ARN extraído de las líneas celulares GCon y GCsA se observó mediante una electroforesis. En ambas líneas celulares se presentaron dos bandas que corresponden a los ARN ribosomales de 28S y de 18S, lo que demuestra que el ARN estaba íntegro (*Figura 2A*).

Expresión y producción de colágeno tipo I.

Para conocer el efecto de la ciclosporina A sobre la expresión de colágeno, realizamos RT-PCR con ARN extraído de las líneas celulares GCon y GCsA. Los resultados muestran mayor cantidad de colágeno tipo I en la muestra de los fibroblastos de la línea celular GCsA (*Figura 2B*). Como control de la reacción de RT-PCR se utilizó la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Los productos de PCR para GAPDH en ambas líneas celulares son idénticos (*Figura 2B*).

En el caso del efecto de la Ciclosporina A sobre la producción de colágeno secretada por los fibroblastos de las líneas celulares Gcon y GCsA, hicimos pruebas de inmunocitoquímica contra colágeno tipo I. La producción de colágeno fue mayor en la línea celular GCsA proveniente del paciente con agrandamiento

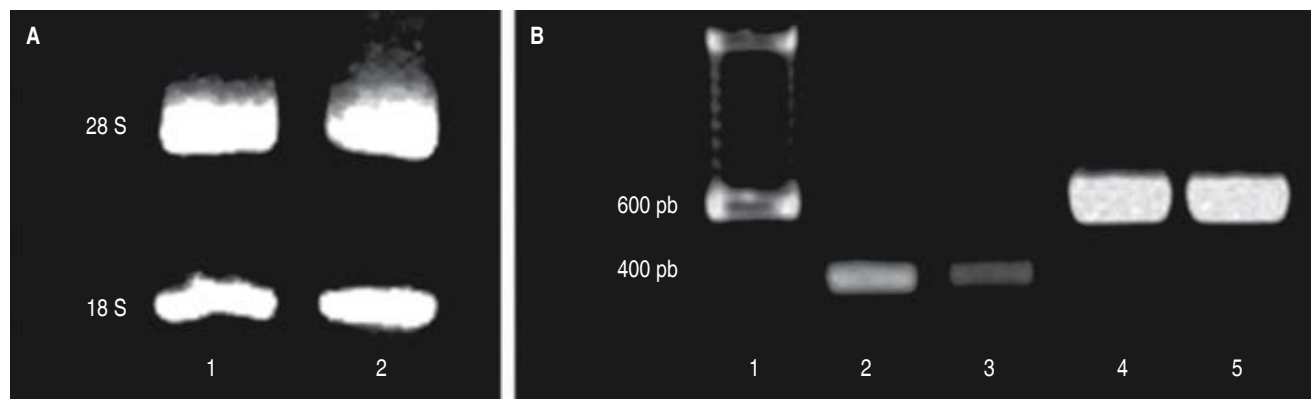


Figura 2. Integridad del ARN y RT-PCR para colágeno tipo I en las líneas celulares GCon y GCsA. **A:** Electroforesis de ARN. El carril 1 muestra la integridad del ARN de la línea celular GCon y el carril 2 el de la línea GCsA. Las bandas corresponden a los ARN ribosomales de 28 S y 18 S. **B:** Electroforesis de los productos de RT-PCR. El carril 1 corresponde a la referencia de los fragmentos de diferentes tamaños en pares de bases, los carriles 2 y 3 a la expresión de colágeno tipo I y los carriles 4 y 5 a la expresión de GAPDH de las líneas celulares GCsA y GCon, respectivamente.

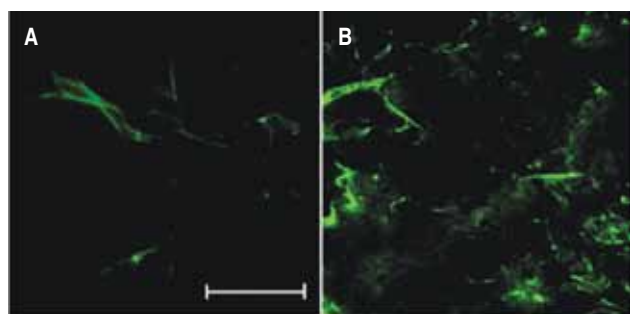


Figura 3. Producción de colágeno tipo I en las líneas celulares GCon y GCsA. Inmunocitoquímica para colágeno tipo I. Fibras de colágeno tipo I depositadas por fibroblastos de las líneas celulares GCon (**A**) y GCsA (**B**). Escala 50 μ m.

gingival causado por ciclosporina A en comparación en la línea celular GCon proveniente de un paciente sano (*Figura 3*). La disposición de las fibras de colágeno en la línea celular GCsA es diferente a la línea celular control GCon. Las fibras de colágeno se ven definidas y organizadas en el caso de la línea celular control GCon. En cambio, en la línea celular GOCycA se ven difusas y desorganizadas.

DISCUSIÓN

Existe un creciente número de pacientes con trasplante de órganos en México. Para evitar el rechazo de los trasplantes es necesario inmunosuprimir al paciente. La ciclosporina A es uno de los fármacos

más utilizados para este fin. Sin embargo, este inmunosupresor promueve agrandamiento gingival en un gran número de los pacientes tratados. Con el propósito de entender de manera individual los cambios que la ciclosporina A promueve en el periodonto de los pacientes, derivamos fibroblastos gingivales de una biopsia de un paciente adolescente con trasplante renal.

La morfología de la línea celular GCsA no es muy diferente a la de la línea celular control GCon. Sin embargo, sería necesario un análisis morfológico más detallado para conocer si realmente la morfología no se ve alterada. En cuando al patrón de distribución de las líneas celulares en el frasco de cultivo, las células de la línea GCsA tienen un patrón de crecimiento circular; y cuando el frasco empieza a llenarse, las células no respetan los bordes de las otras células formando entramados entre ellas. Esto se puede deber a alteraciones celulares que impiden el reconocimiento de otra célula. Para conocer el mecanismo preciso de este hecho empezamos a realizar estudios de adhesión y migración celular.

En cuanto a la expresión de colágeno, observamos que ésta se incrementó en la línea celular GCsA con respecto a la línea control GCon. Esto significa que los fibroblastos tienen más activo el gen de colágeno tipo I. En concordancia con este hecho, observamos por inmunocitoquímica que la expresión es traducida y, por lo tanto, tenemos una mayor producción de colágeno tipo I.

Diversas enzimas participan en la degradación de la matriz extracelular. Las metaloproteinasas de

la matriz (MMP) pertenecen a este tipo de enzimas y se clasifican en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y matrilisininas.²⁶ La colágena es degradada principalmente por colagenasas. La metaloproteínasa tipo I (MMP-1) es una colagenasa que corta la cadena original de colágena en fragmentos de $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$, estos fragmentos tienen menor resistencia que la colágena intacta, por lo cual pueden ser desnaturalizados y degradados por otras proteinasas como la MMP-2. Esta última tiene una acción de gelatinasa, es decir, que degrada colágena desnaturalizada. La colágena de la línea celular GCsA es más abundante y su patrón es desorganizado y difuso; esto podría deberse a que el sistema de degradación de la colágena no está funcionando de manera adecuada y a que las células no respetan el patrón de crecimiento normal de los fibroblastos.

Aunado a todo lo anterior, en nuestro laboratorio observamos que la línea celular GCsA posee una tasa de proliferación mayor a la línea celular control (artículo en preparación). Este resultado concuerda con experimentos en cultivos de fibroblastos gingivales humanos normales inducidos con ciclosporina A.²²

Con base en resultados anteriores, podemos concluir que el paciente con agrandamiento gingival inducido por el tratamiento de ciclosporina A se presenta por un aumento en la cantidad de fibroblastos. Estos fibroblastos poseen mayor expresión y producción de colágena y probablemente el sistema de degradación esté alterado. Esta alternativa se está trabajando actualmente en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado con el donativo IB200811 (de EUQ) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCIAS

- Braun WE. Renal transplantation: Basic concepts and evolution of therapy. *J Clin Apher* 2003; 18: 141-152.
- Gonçalves SC, Diaz-Serrano KV, de Queiroz AM, Palioto DB, Faria G. Gingival overgrowth in a renal transplant recipient using cyclosporine A. *J Dent Child (Chic)* 2008; 75: 313-317.
- Hassell TM, Hefti AF. Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 103-137.
- Greenberg KV, Armitage GC, Shiboski CH. Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new-generation immunosuppressants. *J Periodontol* 2008; 79: 453-460.
- Nakib N, Ashrafi SS. Drug-induced gingival overgrowth. *Dis Mon* 2011; 57: 225-230.
- American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. Chicago, Ill: American Academy of Periodontology; 1992.
- Newman MG, Takei HH, Carranza FNA. Carranza's clinical periodontology. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders; 2012.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
- Livada R, Shiloah J. Gummy smile: Could it be genetic? Hereditary gingival fibromatosis. *J Tenn Dent Assoc* 2012; 92: 23-6; quiz 27-28.
- Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Lörtscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 237-246.
- Sheehy EC, Roberts GJ, Beighton D, O'Brien G. Oral health in children undergoing liver transplantation. *Int J Paediatr Dent* 2000; 10: 109-119.
- Wright G, Welbury RR, Hosey MT. Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children. *Int J Paediatr Dent* 2005; 15: 403-411.
- Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Rullo R, Festa V et al. Oral manifestations of adverse drug reactions: guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22: 681-691.
- Pistorius A, Willershausen B, Callaway A. Effects of selected immunosuppressive drugs on prostaglandin release, protein synthesis and cell proliferation in human gingival fibroblasts and on the growth of plaque bacteria. *Eur J Med Res* 2003; 8: 25-32.
- Ayanoglu CM, Lesty C. Cyclosporin A-induced gingival overgrowth in the rat: A histological, ultrastructural and histomorphometric evaluation. *J Periodontol Res* 1999; 34: 7-15.
- Lages EJ, Cota LO, Lages EM, Costa JE, Costa FO. Histopathological and morphological alterations of periodontium in rats treated with tacrolimus and cyclosporine. *J Int Acad Periodontol* 2007; 9: 112-117.
- Chang HL, Fu E, Nieh S, Wang SL. Gingival overgrowth induced by different dosages of cyclosporin in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1995; 55: 290-295.
- Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol* 1996; 67: 463-471.
- Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H, Martelli Junior H, Graner E. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 2000; 35: 51-58.
- Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M et al. Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 2000; 182: 351-358.
- Chiu HC, Lu YT, Chin YT, Tu HP, Chiang CY, Gau CH et al. Cyclosporine A inhibits the expression of membrane type-I matrix metalloproteinase in gingiva. *J Periodontol Res* 2009; 44: 338-347.
- Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol* 2003; 74: 1625-1633.
- Gnoatto N, Lotufo RF, Toffoletto O, Marquezini MV. Gene expression of extracellular matrix proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2003; 74: 1747-1753.

24. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Stabellini G, Ferrario VF, Gioia M. Immunosuppression and gingival overgrowth: gene and protein expression profiles of collagen turnover in FK506-treated human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 167-173.
25. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF et al. Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: An *in vitro* study. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 231-238.
26. Bartold PM, Narayanan AS. *Biology of the periodontal connective tissues*. Chicago: Quintessence; 1998.

Correspondencia:

Eileen Uribe-Querol

Neurobiología y Desarrollo. Facultad de Odontología,
División de Estudios de Postgrado
e Investigación.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Circuito Escolar s/n

Ciudad Universitaria,

04510 México D.F.

Tel: (52)(55)56225577

E-mail: euquerol@comunidad.unam.mx