

CARACTERIZACIÓN HISTOLOGICA DEL EPITELIO GINGIVAL EN  
PACIENTES CON HIPERTROFIA GINGIVAL POR APARATOLOGIA  
ORTODONTICA FIJA.

INVESTIGADOR PRINCIPAL  
MARTHA CECILIA CARMONA LORDUY

COINVESTIGADORES  
VICTOR HUGO SIMANCAS ESCORCIA  
ANTONIO DIAZ CABALLERO  
SOFIA CAROLINA BERROCAL TORRES  
LORENA CASTRO REALES  
DEISY ELENA PINEDA BOLAÑO

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
PREGRADO ODONTOLOGIA  
CARTAGENA

2020

CARACTERIZACIÓN HISTOLOGICA DEL EPITELIO GINGIVAL EN  
PACIENTES CON HIPERTROFIA GINGIVAL POR APARATOLOGIA  
ORTODONTICA FIJA

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

DRA. MARTHA CECILIA CARMONA LORDUY

Odontóloga

Especialista en estomatología

Magister en educación

Docente Facultad de Odontología

Campus de la Salud Zaragocilla- Cartagena

**COINVESTIGADORES**

DR. VICTOR HUGO SIMANCAS ESCORCIA

Odontólogo

Especialista en Pedagogía y Docencia.

Magister en Biología Celular, Fisiología, Patología.

PhD en Fisiopatología, Université de Paris, Francia.

DR. ANTONIO DIAZ CABALLERO

Odontólogo

Periodoncista Universidad Javeriana

Docente Facultad de Odontología

Campus de la Salud Zaragocilla- Cartagena

SOFIA CAROLINA BERROCAL TORRES

LORENA ISABEL CASTRO REALES

DEISY ELENA PINEDA BOLAÑO

Estudiantes de pregrado de odontología x semestre

**ASESOR METODOLÓGICO**

DR. JOSE MARIA BUSTILLO.

Ortodoncista Universidad de Cartagena

Docente Facultad de Odontología

Campus de la Salud Zaragocilla- Cartagena

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por ser nuestra guía y acompañarnos durante todo este proceso, brindándonos paciencia y sabiduría para culminar con éxito nuestras metas propuestas.

A nuestros padres, por ser pilar fundamental, habernos apoyado incondicionalmente y habernos enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue.

A nuestros tutores, quienes con su experiencia, conocimiento y motivación nos orientaron y sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este proyecto.

A nuestros compañeros de clase, con los que compartimos grandes momentos.

A nuestros amigos, por estar siempre a nuestro lado apoyándonos.

Finalmente agradecemos a todos los docentes que con su sabiduría, dedicación y apoyo nos motivaron a desarrollarnos más como personas y profesionales.

## RESUMEN

Introducción: La Hipertrofia Gingival (HG) es una condición patológica indolora, caracterizada por el crecimiento excesivo y progresivo del tejido gingival de manera localizada o generalizada. El inicio y progresión del HG se ha relacionado con enfermedades sistémicas, factores hormonales e idiopáticos. La HG por ortodoncia se caracteriza por una sobreproducción de tejido conjuntivo fibroso, rico en fibras de colágeno y fibroblastos, delimitado por epitelio; existe presencia de infiltrado inflamatorio crónico. El aspecto del tejido varía de acuerdo con el estado de desarrollo de la lesión, de tejido de granulación inmaduro en lesiones jóvenes a tejido conjuntivo denso y fibroso en lesiones más antiguas. Este se considera una lesión reactiva ya que se presenta como respuesta a un irritante crónico local. Su etiología principal se asocia a maloclusión, al uso de aparatología protésica u ortodóntica, al tiempo de duración de la aparatología fija durante el tratamiento ortodóntico, el cual tiene un impacto negativo en la salud periodontal. La existencia de alteraciones gingivales producto del tratamiento ortodóntico, al momento de evaluarse histológicamente pueden mostrar cambios en el tejido; como es el caso de la vacuolización citoplasmática, la cual se considerada un fenómeno morfológico adaptativo y de supervivencia de las células, luego de que estas hayan estado expuestas frente a patógenos ambientales, que tienen la capacidad de producir muerte celular. Pocos estudios han evaluado los cambios en la histología del epitelio gingival como consecuencia de la hipertrofia gingival producto de aparatos ortodónticos fijos, por tal motivo en este proyecto se evaluó y caracterizó el epitelio gingival de los pacientes con Agrandamiento Gingival por ortodoncia, enfocándose en los cambios más notorios a nivel celular y compararlos con el tejido gingival de sujetos sanos. Objetivos: Describir las características histológicas del epitelio gingival de pacientes con hipertrofia gingival con aparatología ortodóntica fija. Identificar y comparar la presencia de cambios morfológicos celulares presentes en el epitelio gingival de pacientes con hipertrofia gingival por ortodoncia e individuos sanos. Materiales y métodos: se presenta un estudio descriptivo comparativo, donde se tomaron muestras de tejido gingival de pacientes

atendidos en el Centro de Referencia de HG de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena. Los tejidos se seleccionarán mediante un muestreo no probabilístico a conveniencia, divididas en un grupo casos formado por pacientes con HG que tengan aparatología ortodóntica fija y, un grupo control constituido por pacientes periodontalmente sanos, que por requerimientos protésicos o estéticos requieran cirugías de alargamiento coronal. Resultados esperados: Se obtuvo un total de 9 muestras de tejido gingival, de las cuales 6 (66,7%) pertenecían al grupo casos y 3 (33,3%) al grupo control. Al analizar las muestras de tejido epitelial gingival, se esperaba que en el grupo casos (pacientes con hipertrofia gingival asociada a ortodoncia) se presentará mayor cantidad de vacuolización en las tres capas del epitelio analizado: granulosa, espinosa y basal. Por el contrario, en las muestras del grupo control se esperaba que al arrojar los resultados se evidenciaran pocas células con procesos de vacuolización celular. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para hacer el análisis estadístico; Consecuentemente los datos fueron sometidos a la prueba t de muestras independientes con la ayuda del software SPSS v 25 y un nivel de confianza de  $p < 0,05$  y los resultados obtenidos para cada una de las capas fueron los siguientes: La capa granulosa ( $p=0,16$ ), la capa espinosa ( $p=0,003$ ) y en la basal ( $p= 0,017$ ), lo cual indica que existe diferencia estadísticamente significativa en la capas basal y espinosa, pero no en la granulosa. De igual forma al comparar el número de núcleos y determinar el área de estos últimos en las muestras de tejido, los resultados obtenidos arrojaron que efectivamente había un número disminuido de núcleos y una menor área de núcleos del grupo casos, al compararlos con los del grupo control. Para el total de núcleos ( $p=0.799$ ) y para el área de núcleos ( $p=0,016$ ), evidenciando así que hubo diferencia estadísticamente significativa en el área de los núcleos. Conclusión: De este proyecto podemos concluir que efectivamente los pacientes que presentan hipertrofia gingival asociada a tratamiento de ortodoncia fijo, presentan diferencias en la conformación celular de la encía; evidenciando un epitelio gingival con procesos de acantosis, paraqueratosis, hiperqueratosis y vacuolización celular. También algunos aspectos morfológicos como crestas epiteliales de mayor tamaño en comparación con las prolongaciones epiteliales

de los tejidos de individuos periodontalmente sanos, en los cuales no se evidencian cambios morfológicos ni de número en sus células.

## GLOSARIO

- **HIPERTROFIA GINGIVAL:** Aumento del tamaño de las encías, normalmente como consecuencia del consumo de algunos fármacos, de ciertas enfermedades o de cambios naturales en el organismo.
- **VACUOLIZACION CITOPLASMATICA:** Fenómeno morfológico adaptivo y de supervivencia de las células luego de que estas han sido expuestas frente a patógenos ambientales que tienen la capacidad de producir muerte celular
- **CAMBIOS CELULARES:** respuesta de las células ante estímulos fisiológicos excesivos o patológicos, mediante la cual consiguen mantener, aunque algo alterado, un estado de equilibrio relativo que les permite preservar la viabilidad y función de la propia célula.
- **PARAQUERATOSIS:** Queratinización anormal y se emplea cuando las células de la capa córnea (corneocitos) conservan un núcleo picnótico.
- **HIPERQUERATOSIS:** Engrosamiento de la capa superficial de queratina.
- **ACANTOSIS:** Engrosamiento de la capa de células espinosas.



## INTRODUCCION

El tejido gingival se caracteriza histológicamente por presentar dos zonas, epitelio y corion o tejido conjuntivo. El epitelio está conectado al tejido conjuntivo por una interface ondulada o proyecciones papilares, observadas como crestas epiteliales interpapilares. En la encía libre puede observarse un epitelio queratinizado y no queratinizado. Además, se pueden apreciar cuatro capas celulares: basal, espinosa, granulosa y córnea. Mientras tanto el epitelio que recubre la encía libre puede diferenciarse así: epitelio bucal, ubicado hacia la cavidad bucal; epitelio del surco, quien se dirige hacia el diente sin ponerse en contacto con él y, epitelio de inserción, que permite el contacto entre encía y diente. También se pueden observar los melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Subyacente al tejido epitelial, encontramos el corion, un tejido conjuntivo semidenso que posee una cantidad similar de células como los fibroblastos, el cual es la célula predominante, células cebadas, macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos y plasmocitos. También se pueden apreciar fibras colágenas, fibras reticulares, escasas fibras elásticas, fibras de elastina y fibras de oxitalán. Las fibras colágenas principalmente son de tipo I en un tejido gingival sano. <sup>1</sup>

Por su parte, la Hipertrofia Gingival (HG) es una condición patológica indolora, caracterizada por el crecimiento excesivo y progresivo del tejido gingival de manera localizada o generalizada.<sup>2</sup> El inicio y progresión del HG se ha relacionado con enfermedades sistémicas, factores hormonales e idiopáticos.<sup>3</sup> También se ha reconocido que la ingesta prolongada de medicamento como los antihipertensivos (bloqueadores de calcio), anticonvulsivantes e inmunosupresores, son responsable de la aparición de HG.<sup>4</sup> Histológicamente, la HG por ortodoncia se caracteriza por una sobreproducción de tejido conjuntivo fibroso, rico en fibras de colágeno y fibroblastos, delimitado por epitelio; existe presencia de infiltrado inflamatorio crónico. El aspecto del tejido conjuntivo varía de acuerdo con el estado de desarrollo de la lesión: de tejido de granulación inmaduro en lesiones jóvenes a tejido conjuntivo denso y fibroso en lesiones más

antiguas. En muchos casos una misma lesión puede presentar diferentes aspectos microscópicos.<sup>5</sup>

La hipertrofia gingival se considera una lesión reactiva ya que se presenta como respuesta a un irritante crónico local; es una lesión común en pacientes adolescentes y de edad adulta debido a que su etiología principal se asocia a maloclusión, al uso de aparatología protésica u ortodóntica mal ajustada, así como a la presencia de biofilm. El tiempo de duración de la aparatología fija en el tratamiento ortodóntico, tiene un impacto negativo en la salud periodontal.<sup>6</sup>

Los cambios en el epitelio gingival de los pacientes con HG por aparatología ortodóntica, eventualmente pueden estar relacionados a la exposición con aleaciones metálicas en la boca. Las propiedades térmicas, microbiológicas y acuosas del entorno oral combinadas con la fluctuación en el pH y la ingesta de diversas bebidas, alimentos y enjuagues bucales facilitan la corrosión y dan como resultado la liberación de iones metálicos de los elementos ortodónticos en los tejidos orales y los fluidos biológicos de los pacientes sometidos a un tratamiento de ortodoncia fija. Se ha demostrado que el níquel, el cromo, el cobalto y otros iones metálicos que se liberan de los aparatos de ortodoncia causan riesgos biológicos para la salud.<sup>7</sup>

Los hallazgos encontrados en la HG cobran mucha relevancia, principalmente a nivel de la toxicología genética, debido a que la mutación cromosomal es un factor clave en los procesos de proliferación celular, por lo que se han evaluado los mecanismos moleculares de la apoptosis de fibroblastos gingivales humanos. Algunos estudios evaluaron la acumulación de níquel en los tejidos orales de pacientes con y sin hipertrofia gingival con una meticulosa higiene oral. Sus resultados no mostraron diferencia significativa en la acumulación del níquel en muestras con y sin hipertrofia gingival, pero afirman que, bajo el análisis espectrofotométrico empleado, este metal se bioacumula en tejido gingival, estimulando la proliferación de células epiteliales en respuesta a bajas concentraciones de níquel, mientras que, a dosis más altas, se observó citotoxicidad. Estos estudios demuestran que el níquel si es capaz de inducir cambios morfológicos irreversibles.<sup>8</sup>

Se ha demostrado que el níquel, el cromo, el cobalto y otros iones metálicos que se liberan de los aparatos de ortodoncia causan riesgos biológicos para la salud. Entre los efectos tóxicos de las aleaciones metálicas es la posibilidad de causar daño al ADN (genotoxicidad) en las células humanas. El efecto genotóxico de las aleaciones metálicas puede deberse a la generación de daño oxidativo del ADN (interacción directa) o interferencia con la replicación del ADN (interacción indirecta)<sup>7</sup>.

El daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas, pero son pocos los estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos y citotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad.<sup>9</sup> La genotoxicidad es la capacidad de un agente para ejercer efectos nocivos sobre el material genético de una célula, lo que afecta su integridad genética. La citotoxicidad es la capacidad de un agente de ser tóxico para las células vivas.<sup>10</sup>

Un fenómeno celular frecuentemente observado y relacionado con daños genéticos es la vacuolización celular (VC); este proceso se caracteriza por ser un cambio morfológico observado en células de mamíferos después de la exposición a patógenos bacterianos o virales, así como a diversos agentes físicos o químicos que a menudo pueden acompañar la muerte celular.<sup>10</sup> La VC puede ser transitoria o irreversible. La VC transitoria, se observa solo durante la exposición a un inductor que afecta de manera reversible el ciclo celular y la migración celular. Los inductores más conocidos de la vacuolización transitoria son los compuestos lipofílicos que contienen amina débilmente básicos. En el fluido extracelular neutro, las bases lipofílicas no están cargadas y pueden transportarse a través de la membrana plasmática a través de difusión pasiva o transporte activo dentro de la célula, las bases lipofílicas sin carga se difunden libremente a través de las membranas de los orgánulos. Pero después de entrar en los organelos ácidos endosomales-lisosomales y las cisternas de Golgi, se cargan positivamente y pierden la capacidad de difundirse a través de las membranas de los organelos hacia el citoplasma. La acumulación de formas

cargadas de bases débiles aumenta la presión osmótica al interior de las organelas celulares. El equilibrio de la presión osmótica por la difusión del agua a través de las membranas orgánulos conduce a la formación de las vacuolas citoplasmáticas. Por otra parte, la VC irreversible, hace referencia a condiciones citopatológicas que conducen a la muerte celular, siempre que el estímulo citotóxico esté presente. Además de los orgánulos ácidos, la VC irreversible puede afectar el retículo endoplásmico (RE), así como los orgánulos no ácidos conocidos del sistema endosómico-lisosómico y el aparato de Golgi.<sup>11</sup>

Algunos cortes histológicos de tejidos tratados con ortodoncia, por medio de la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E), revelan un mayor número de infiltrado de células mononucleares, hiperplasia y proliferación del epitelio de la bolsa periodontal, en el caso de que concomitantemente exista hipertrofia gingival además se logra apreciar una densa acumulación de células inflamatorias crónicas que ocupan grandes áreas de tejido conectivo. se describe la presencia de un epitelio irregularmente acantótico, paraqueratósico e hiperqueratósico, vacuolización de la capa de Malpighio, y espongiosis focal. En la lámina propia los hallazgos histológicos observados son el incremento del tejido conectivo, el aumento de la vascularización y el acúmulo de las células inflamatorias con predominio linfocitario y plasmocitario de variable densidad. Histológicamente la HG se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos, mastocitos, células endoteliales y tejido nervioso, pero las células más abundantes en este tejido son los fibroblastos. Su volumen se compone de un 5.6% del volumen total de la encía.<sup>11</sup>

El tratamiento de ortodoncia fija requiere de la utilización de componentes metálicos, como bandas, Brackets y alambres. Como resultado, los iones metálicos y los monómeros se liberan inevitablemente de los aparatos de ortodoncia al ambiente oral durante el tratamiento. Esta posibilidad es de gran preocupación clínica, especialmente para pacientes que están genéticamente predispuestos a ciertas condiciones clínicas. Además, existen cambios clínicos prevalentes en la encía de los pacientes con aparatología ortodóntica fija, que

pueden estar asociados a los movimientos dentales, la mala higiene oral y la dificultad para la remoción del biofilm dental, ya que esta actúa como medio retentivo y complica las técnicas de higiene oral, causando así inflamación, sangrado y la presencia de HG.<sup>10</sup>

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células de la cavidad bucal son la primera barrera en la ruta de inhalación o ingestión, capaces además de metabolizar cancerígenos a productos reactivos. Encontramos que aproximadamente el 90% del cáncer en humanos se produce a partir de células epiteliales, las cuales, además, representan un blanco preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al cuerpo por inhalación o ingestión.<sup>9</sup>

Existen diversas recopilaciones de datos acerca de los mecanismos moleculares de la formación de vacuolas en células del tejido inducidas por agentes químicos, bacterianos y virales, así como la relación de la vacuolización con la muerte celular y la supervivencia, que indica que en la mayoría de los casos se forman vacuolas citoplasmáticas a partir de componentes del retículo endoplásmico u organelos endosomales-lisosomales. Al mismo tiempo, la vacuolización de componentes del mismo compartimento puede depender de diferentes mecanismos de una manera dependiente del inductor. La vacuolización de los componentes endosomales-lisosomales está relacionada con la alteración de la clasificación y / o fusión de los orgánulos o el cambio del equilibrio iónico intraorganelar, lo que conduce a la disfunción de la macropinocitosis, la endocitosis y la autofagia; esta no es la causa de la muerte celular en la mayoría de los casos.<sup>11</sup> Cabe señalar que, a pesar del gran volumen de datos sobre inductores de vacuolización, los mecanismos subyacentes a su acción siguen sin estar claros para muchas toxinas bacterianas, virus e inductores de muerte celular de bajo peso molecular acompañados de vacuolización. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, el efecto de la vacuolización sobre la muerte celular y la supervivencia difícilmente puede evaluarse. Al mismo tiempo, los datos analizados, así como la conclusión general de que la formación de vacuolas no

es la causa de la Muerte celular, permite considerar la vacuolización como un efecto secundario de la acción de los factores citotóxicos.<sup>11</sup>

Otro factor de importancia implicado en producir alteraciones gingivales, son las aleaciones metálicas con las que se elaboran los diversos aditamentos de la aparatología ortodóntica fija, debido a que estas, al estar presentes en un medio acuoso como la cavidad oral, se exponen a interacciones iónicas que conllevan a la corrosión; este proceso posteriormente inducirá alteraciones de los tejidos orales como alergias, aparición de descamación labial, eritema multiforme, estomatitis de contacto, gingivitis y agrandamiento gingival.<sup>8</sup> Clínicamente la hipertrofia gingival que no es producto del acumulo de biofilm dental, se presenta con un agrandamiento indoloro globular en el margen gingival vestibular, lingual y en las papilas interdentes; a medida que la lesión progresa las inflamaciones de la hiperplasia marginal y papilar se unen y pueden transformarse en un repliegue macizo del tejido, que llegue a cubrir una parte considerable de las coronas y puede dificultar la oclusión. Cabe destacar, que cuando no hay inflamación la lesión es firme, de color rosado pálido y presenta una superficie finamente lobulada que no tiende a sangrar.<sup>12</sup>

Recientes estudios reportan que los iones níquel presentes en los aditamentos ortodónticos posiblemente sean el factor etiológico de la proliferación fibroblástica característica propia del agrandamiento gingival, Además de la alergia, alteraciones de citotoxicidad y genotoxicidad celular también estudios han reportado para el níquel cambios en la respuesta a los aparatos de ortodoncia, encontrando daño del ADN en las células de la mucosa oral lo cual determina el daño genotóxico de células de la mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóntica fija, concluyendo que los iones níquel y cromo emitidos en cantidades suficientes inducen efectos genotóxicos localizados, los aparatos ortodónticos fijos disminuyen la viabilidad celular, inducen daño en el ADN, y aumentan los contenidos de níquel y cromo en las células de la mucosa bucal .<sup>8</sup> Se espera que este estudio represente una nueva forma de diagnóstico, al exponer resultados certeros, acerca de los cambios que están ocurriendo genéticamente a nivel celular y de esta forma hacer conocer que no solo el acumulo de biofilm dental o el implemento de medicamentos pueden

desencadenar alteraciones a nivel celular que puede causar hipertrofia gingival; si no que también existen alteraciones a nivel celular, fomentadas por aditamentos usados durante el tratamiento de ortodoncia que pueden causar hipertrofia a nivel de las encías y pueden tener un potencial citotóxico y genotóxico.

Con los resultados obtenidos de este proyecto esperamos que se aumente el uso de los ensayos a corto plazo, donde sea posible valorar todas las características histológicas presentes en el epitelio gingival de pacientes con HG con aparatología ortodóntica fija e identificar posibles cambios como resultado de la exposición a grandes fuerzas aplicadas por el tratamiento ortodóntico además, la información obtenida puede ser utilizada como una alerta temprana del riesgo potencial de desarrollar a largo plazo problemas de salud.<sup>13</sup> Por lo cual surge la pregunta: ¿Cuáles son las características histológicas del epitelio gingival en pacientes con hipertrofia gingival por aparatología ortodóntica fija?

## 2. JUSTIFICACION

En la actualidad existen múltiples factores endógenos o exógenos, que pueden provocar alteraciones en la conformación celular, afectando su tamaño y proceso de división de las mismas. Dichas alteraciones pueden ser estudiadas a nivel microscópico y considerarse como potencialmente malignas o no.

La existencia de alteraciones gingivales producto del tratamiento ortodóntico se ha evidenciado a lo largo del tiempo, por lo que es necesario entender que pueden tener mucha relación, al momento de evaluar histológicamente el tejido gingival y encontrar cambios en este; como ocurre en la vacuolización citoplasmática, la cual se considerada un fenómeno morfológico adaptativo y de supervivencia de las células, luego de que estas hayan estado expuestas frente a patógenos ambientales, que tienen la capacidad de producir muerte celular.<sup>11</sup> De igual manera, algunos factores tales como sustancias genotóxicas, errores en la replicación, roturas cromosómicas, radiación y otros, pueden provocar

pérdida del material genético, de modo que la célula tendrá una pequeña masa nuclear separada del núcleo, es decir, un micronúcleo.<sup>14</sup>

La HG asociado al uso de aparatología protésica u ortodóntica que presenta mal ajuste, la presencia de biófilm y tiempo de duración de la aparatología fija durante el tratamiento ortodóntico, tiene un impacto negativo en la salud periodontal.<sup>4</sup>

En la cavidad oral de pacientes portadores de aparatología ortodóntica existen múltiples factores que pueden provocar daño celular, a causa de la biodegradación de los elementos de ortodoncia, fluctuaciones del PH salival, temperatura, movimientos dentales que llevan a cambios en la conformación del epitelio gingival. Dichos cambios celulares como respuesta a la aparatología fija son una causa de preocupación.<sup>4</sup> Pocos estudios han evaluado los cambios en la histología del epitelio gingival como consecuencia de la hipertrofia gingival producto de aparatos ortodónticos fijos, por tal motivo en este proyecto evaluaremos y caracterizaremos el epitelio gingival de los pacientes con HG por ortodoncia, enfocándonos en los cambios más notorios a nivel celular y compararlos con el tejido gingival de pacientes sanos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL:

Describir las características histológicas del epitelio gingival de pacientes con hipertrofia gingival con aparatología ortodóntica fija.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detallar los aspectos histológicos del epitelio gingival de los pacientes con hipertrofia gingival por ortodoncia.
- Detallar los aspectos histológicos del epitelio gingival de los individuos sanos.
- Identificar y comparar la presencia de cambios morfológicos celulares presentes en el epitelio gingival de pacientes con hipertrofia gingival por ortodoncia e individuos sanos.



- Cuantificar el número y área de los núcleos en células epiteliales del tejido gingival en pacientes sanos y pacientes con hipertrofia gingival por aparatología ortodóntica fija.

#### 4. MARCO TEORICO

En el epitelio oral se produce una constante renovación de células, en el cual las células que se desprenden son reemplazadas por nuevas células resultantes de la mitosis que se produce en la capa basal. Es en esta capa donde se encuentran las células madre capaces de expresar alteraciones genéticas durante la división celular. Las células hijas, que pueden o no incluir micronúcleos, se diferencian en la capa espinosa y la queratinizada para luego exfoliar en la cavidad bucal. Algunas de estas células pueden degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados, núcleos pignóticos o pueden perder por completo su material nuclear. Estos biomarcadores de daño genético y muerte celular se pueden observar tanto en linfocitos como en células de la cavidad bucal proporcionando mayor información sobre el daño del genoma.<sup>9</sup>

El término de hipertrofia gingival se refiere a un aumento de volumen de un tejido producido por el incremento en el número de sus células; en general, corresponden a un grupo de lesiones producidas como una respuesta exagerada de la mucosa bucal frente a irritantes crónicos de baja intensidad, motivo por el cual se le considera una lesión reactiva<sup>15</sup>. La HG localizada y de tipo inflamatoria del tejido conectivo, es más frecuente en adolescentes, adultos y relativamente común en niños (menos del 5%). La forma más común de HG ocurre como un agrandamiento benigno, lentamente progresivo y no hemorrágico de la encía. Afecta la mucosa masticatoria (la encía marginal, adherida y la papila interdental), pero no se extiende más allá de la unión mucogingival. El exceso de tejido gingival puede cubrir parte o la totalidad de la corona, y puede provocar diastemas, desplazamiento de los dientes o retención de dientes primarios o impactados, y también puede causar problemas masticatorios, fonéticos, psicológicos y estéticos.<sup>15</sup> Clínicamente la hiperplasia gingival comienza con un agrandamiento indoloro globular en el margen gingival vestibular y lingual y en

las papilas interdentes; a medida que la lesión progresa las inflamaciones de la hiperplasia marginal y papilar se unen y pueden transformarse en un repliegue macizo del tejido, que llegue a cubrir una parte considerable de las coronas y puede dificultar la oclusión. Cuando no hay inflamación la lesión es firme, de color rosado pálido y presenta una superficie finamente lobulada que no tiende a sangrar.<sup>15</sup>

Su etiología es variada y se asocia a la presencia de factores irritativos como la presencia de biofilm, cálculo, aparatología ortodóntica o protésica mal ajustada o sobreextendida, malposición dental y por desequilibrios hormonales. En las primeras etapas el irritante crónico estimula la formación de tejido de granulación; más adelante, el tejido comienza a sufrir un proceso de fibrosis. La presencia de factores irritativos en la mucosa desencadena un proceso inflamatorio crónico que culmina con la formación de tejido fibroso hiperplásico, asintomático, en las zonas de agresión, conocida como Hiperplasia Fibrosa Inflamatoria. Las lesiones de naturaleza inflamatoria constituyen aproximadamente el 66% de todas las lesiones de la cavidad oral, siendo la mayoría de estas lesiones atribuidas a la mala higiene y al uso de aparatología fija o removible.<sup>5</sup>

El diagnóstico de la HG se realiza principalmente sobre la base de un examen clínico y periodontal, un historial médico y familiar y pruebas de laboratorio. El examen clínico, el historial médico y las pruebas de laboratorio determinan inicialmente si la afección se hereda o se adquiere, la presencia de otras enfermedades, las terapias anteriores utilizadas y la implicación de la dentición primaria. El análisis histopatológico caracteriza las características típicas de la encía fibromatótica, como la tasa de acantosis epitelial, la densidad del tejido conectivo y el contenido celular, el grado de fibrosis o los infiltrados inflamatorios. El examen periodontal, que incluye rayos X e histopatología, sirve principalmente para evaluar el tipo (local, difuso, fibroso o inflamatorio) y la gravedad de la afectación gingival, incluida la erosión ósea, y permite al odontólogo elegir la opción de tratamiento óptima.<sup>16</sup>

#### 4.1.1 VACUOLIZACIÓN

La vacuolización citoplasmática es unos fenómenos morfológicos bien conocidos observados en células de mamíferos bacterianos o virales, así como a diversos compuestos naturales y artificiales de bajo peso molecular. La VC a menudo acompaña a la muerte celular; Sin embargo, su papel en los procesos de muerte celular sigue sin estar claro.<sup>11</sup>

La VC en células de mamífero puede ser transitoria o irreversible. La VC transitoria se observa solo durante la exposición a un inductor y afecta de manera reversible el ciclo celular y la migración. Los inductores más conocidos de la VC transitoria son compuestos lipofílicos que contienen amina débilmente básicos. En el fluido extracelular neutro, las bases lipofílicas no están cargadas y pueden transportarse a través de la membrana plasmática a través de difusión pasiva o transporte activo. Dentro de la célula, las bases lipofílicas sin carga se difunden libremente a través de las membranas de los orgánulos. Pero después de entrar en los organelos ácidos endosomales-lisosomales y las cisternas de Golgi, se cargan positivamente y pierden la capacidad de difundirse a través de las membranas de los organelos hacia el citoplasma. La acumulación de formas cargadas de bases débiles aumenta la presión osmótica intraorganelar. El equilibrio de la presión osmótica por la difusión del agua a través de las membranas orgánulos conduce a la formación de las vacuolas. Por lo tanto, los efectos osmóticos asociados con el equilibrio iónico alterado en los orgánulos en lugar del impacto en las proteínas que controlan las funciones celulares subyacen a la acción de los inductores de vacuolización transitorios<sup>11</sup>

A diferencia de la VC transitoria, la VC irreversible marca las condiciones citopatológicas que conducen a la muerte celular, siempre que el estímulo citotóxico esté presente. Además de los orgánulos ácidos, la vacuolización irreversible puede afectar el retículo endoplásmico (RE), así como los orgánulos no ácidos conocidos del sistema endosómico-lisosómico y el aparato de Golgi. Hasta la fecha, se ha demostrado la capacidad de inducir una vacuolización citoplasmática irreversible para una variedad de compuestos naturales y sintéticos de diferente estructura química, incluidos medicamentos médicos y contaminantes industriales. Además, se observa una vacuolización

irreversible en células infectadas por una multitud de agentes bacterianos y virales de enfermedades humanas y animales graves.<sup>11</sup>

#### 4.1.2 VACUOLIZACIÓN EN PACIENTES FUMADORES DE TABACO

En estudios realizados en pacientes fumadores de tabaco, se ha descubierto que este y algunos de sus componentes volátiles y no volátiles afectan muchos tipos de células, incluidos los fibroblastos gingivales. Debido a que el funcionamiento normal de los fibroblastos gingivales es fundamental para el mantenimiento del tejido conectivo oral y para la cicatrización de heridas, examinamos el efecto de dos componentes de humo en fase de vapor (acroleína y acetaldehído) sobre la proliferación y la ultraestructura de los fibroblastos gingivales humanos (HGF) en cultivo. En uno de los cultivos de estudio se utilizó una cepa de fibroblastos gingivales humanos derivada de individuos sanos. Las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de acroleína y acetaldehído y se evaluó la proliferación celular y la morfología fina. Los resultados muestran que la acroleína y el acetaldehído produjeron una inhibición dependiente de la dosis de la viabilidad del HGF y la alteración de los orgánulos citoplasmáticos. El principal hallazgo ultraestructural para el citoplasma de HGF fue la presencia de vacuolas y estructuras lisosómicas que se hicieron prominentes con el aumento de la concentración de acroleína y acetaldehído.<sup>17</sup>

#### 4.1.3 VACUOLIZACION E INFECCIONES VIRALES

Los primeros informes sobre la capacidad de los virus para inducir la VC en las células infectadas que conocemos se remontan a mediados del siglo pasado. Hasta la fecha, el efecto VC se ha demostrado para muchas familias virales. Entre los virus de ARN, estos incluyen picornovirus (virus de la hepatitis A y virus de la encefalomiocarditis), flavivirus (virus de la hepatitis C, diarrea del virus bovino, virus del dengue y el Nilo Occidental virus), rabdovirus (virus de la rabia), paramixovirus (virus de la enfermedad de Newcastle), nodavirus (virus de necrosis nerviosa viral) y retrovirus (virus de la leucemia murina, virus del

sarcoma de Rous, virus de la leucemia bovina, virus de inmunodeficiencia humana y de primates). Los virus de ADN que inducen la vacuolización incluyen hepadnavirus (virus de la hepatitis B), poliomavirus (SV40), rinovirus y papilomavirus. Las células infectadas por virus suele ser un indicio de su muerte inminente. Al mismo tiempo, los mecanismos que desencadenan estos tipos de muerte celular inducida por virus siguen sin explorar.<sup>11</sup>

#### 4.1.4 VACUOLIZACION Y PULPA DENTAL

Algunos estudios indican que ciertas reacciones pulpares características surgen de la extrusión de ortodoncia. Estas reacciones implican trastornos circulatorios con vasos sanguíneos congestionados y dilatados, degeneración odontoblástica, vacuolización y edema de los tejidos pulpares, y (hacia la cuarta semana) manifestación de cambios fibróticos. Se especula que la vacuolización de los tejidos pulpares que ocurre después de la aplicación de fuerzas de ortodoncia extrusivas en sujetos adultos jóvenes resulta de un prolapso de la pulpa, hecho posible por los agujeros apicales relativamente anchos. Sin embargo, la degeneración odontoblástica es probablemente el resultado de un suministro de sangre comprometido.<sup>18</sup>

#### 4.2 DIVISION CELULAR

Durante la división celular el material genético que está en el núcleo, se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Múltiples factores pueden afectar este proceso, como errores en la replicación, roturas cromosómicas y efectos genotóxicos, el resultado será una división del material genético no equitativo y pérdida cromosómica. El material genético que se desprende queda excluido del núcleo de la célula hija, formando un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal, llamado micronúcleo, el cual es fácilmente visible al microscopio óptico.<sup>13</sup>

Las características del epitelio de la mucosa oral que favorecen su utilización en pruebas para evaluar genotóxicos o citotóxicos, es el punto de contacto que tiene

con muchos agentes potencialmente peligrosos, por lo tanto; representa una barrera protectora para potenciales carcinógenos los que al ser metabolizados generarían múltiples metabolitos reactivos; este tejido sí protege al resto del organismo de que estos compuestos penetren a otros órganos; sin embargo, la mucosa al estar expuesta a estos agentes, es susceptible de sufrir daño. Por otra parte, es importante considerar que aproximadamente el 60% del total de la superficie de revestimiento oral es epitelio no queratinizado; lo que favorece la absorción de colorantes y facilita a la vez la observación e identificación de características morfológicas del núcleo y membrana celular a través del microscopio. Este epitelio, cuenta con una capacidad especial proliferativa, lo que permite que la población celular se mantenga constante; sin embargo, esta característica lo vuelve más vulnerable a lesiones producidas en el ADN; por lo que cobra relevancia, ya que se calcula que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen origen epitelial. Así que la mucosa oral podría ser usada para monitorear eventos genotóxicos tempranos causados por cancerígenos inhalados o ingeridos. Otra ventaja que presentan las células de este epitelio, es que presentan abundante citoplasma y conservan el núcleo al momento de ser exfoliadas; aun cuando son de fácil acceso y es posible colectarlas mediante técnicas mínimamente invasivas y relativamente indoloras, lo que produce mínimo estrés a las personas que se les toma la muestra por lo que es bien aceptada; e incluso, estas células se pueden estudiar sin necesidad de realizar cultivos celulares, facilitando y disminuyendo el costo de la técnica. Por lo tanto, es posible utilizar las células de la mucosa oral para evaluar el efecto genotóxico y citotóxico en poblaciones en alto riesgo, de forma sencilla, rápida y económica; esto mediante la prueba de micronúcleos (MN) y detección de diversas anormalidades nucleares (AN). Estas técnicas representan una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos del impacto del estilo de vida, exposición ocupacional, nutrición, evolución de enfermedades crónico degenerativas, procesos de envejecimiento, exposición a genotóxicos, como: medicamentos, radioterapia, tabaco, alcohol, drogas, y por supuesto cáncer, así como tratamientos antineoplásicos, entre otros.<sup>19</sup>

#### 4.2.1 ABERRACIONES CROMOSOMALES

Las aberraciones cromosomales consisten en anomalías en los cromosomas respecto al número (haploide, poliploide) o cambios estructurales (translocación, duplicación). Se interpreta entonces la presencia de aberraciones cromosomales como una respuesta frecuente e importante a la exposición ante agentes mutagénicos físicos o químicos. Su importancia se basa en la relación con enfermedades genéticas hereditarias y su participación en la carcinogénesis. Los defectos de segregación son una de las causas de inestabilidad cromosomal, cuando se forman núcleos céntricos y acéntricos durante la telofase, lo cual es de gran relevancia en los procesos oncogénicos. Las posibles consecuencias de esta inestabilidad son: alteración del número de copias de uno o más genes, un cambio en la expresión genética o cambio en la estructura genética de tal manera que la proteína es alterada, lo cual a su vez puede conducir tanto al aumento como a la disminución de la actividad de dicha proteína. Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento del riesgo de cáncer. La mutación cromosómica se identifica básicamente mediante ensayos citogenéticos que consisten en exponer células animales o humanas a la sustancia química en placas de cultivo, teñir cromosomas y luego visualizar directamente en el microscopio los cromosomas para detectar alteraciones en estructura o número, entre los cambios más significativos y aceptados actualmente están las aberraciones cromosomales y como una subcategoría encontramos los micronúcleos.<sup>9</sup>

#### 4.2.2 MICRONUCLEOS

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos. Existen factores capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en

una célula como la edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc.<sup>20</sup> Estos provienen principalmente de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricas o cromosomas completos que no se incluyen exitosamente en el núcleo de las células hija en la etapa de telofase por defectos en el proceso de segregación durante el anafase.<sup>13</sup>

#### 4.2.3. CÉLULAS MICRONUCLEADAS (CMN) EN MUCOSA ORAL COMO PARÁMETRO DE DAÑO GENOTÓXICO.

El monitoreo del daño genético en las poblaciones expuestas mediante la utilización de biomarcadores, se muestra como una herramienta útil en la prevención de tumores en la detección temprana de efectos secundarios, de enfermedades crónico degenerativas y envejecimiento precoz. Los MN son una herramienta útil para ello, ya que se forman durante la transición de metafase–anafase en mitosis y pueden ser cromosomas completos rezagados ocasionado por un daño al uso mitótico (efecto aneuploidógeno) o bien, fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico); en ambos casos; no lograron incorporarse al núcleo de las células hijas; lo que permite, diferenciarlos por el tamaño de los MN o la presencia del centrómero o cinetócoro. Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente, sin embargo, en presencia de ciertos agentes endógenos o exógenos, la presencia de MN incrementa; convirtiéndose estos, en indicadores del efecto de agentes mutágenos, genotóxicos o teratógenos específicamente, micronucleogénicos.<sup>19</sup>

El conteo de los MN, es llevado a cabo fácilmente en cualquier tejido que se divida, como en el epitelio de mucosa oral. Específicamente, los MN observados en células exfoliadas de tejido epitelial se forman en las células de la capa basal que es donde se lleva a cabo la división celular, esta migran a la superficie en el transcurso de 5 a 14 días, de tal manera que el monitoreo de poblaciones en este tejido puede reflejar el daño ocurrido durante este tiempo, la muestra se toma mediante un raspado de mucosa; se hace el extendido en portaobjetos



perfectamente limpios, se fijan en etanol al 80%, se tiñen con colorantes básicos o específicos para ADN y se analizan entre 500 a 4000 células.<sup>19</sup>

#### 4.2.4. MICRONÚCLEOS Y CÁNCER

La relación entre la presencia de micronúcleos y el desarrollo del cáncer está soportada por múltiples estudios, la mayoría de los argumentos incluyen la alta frecuencia de este biomarcador en pacientes con cáncer sin tratamiento, individuos con enfermedades congénitas que predisponen al cáncer, la presencia de alta frecuencia de micronúcleos en la mucosa oral, usado como biomarcador de cáncer en ensayos clínicos de quimioprevención, la correlación existente entre los agentes genotóxicos inductores de micronúcleos y la carcinogénesis, la relación inversa entre la frecuencia de micronúcleos y la concentración sanguínea y/o ingesta de los micronutrientes asociados a la prevención del cáncer como calcio, vitamina E, entre otros.<sup>8</sup>

#### 4.2.5. ORTODONCIA Y MICRONÚCLEOS

Durante un tratamiento de ortodoncia, los objetivos principales son proporcionarle al paciente los resultados estéticos que él espera en su imagen y sonrisa, sin dejar de tomar en cuenta los aspectos de una oclusión ideal, todo esto tratamos de hacerlo con la mejor comodidad, es decir sin provocar el más mínimo dolor ni reacciones adversas, pero en ocasiones esto no es posible. En gran parte por que los elementos que utilizamos dentro de esta área de la odontología son aparatos de metal, de acrílico o combinados, que nos pueden ocasionar lesiones por fricción o por traumatismos externos contra estos aparatos, así como por mal aplicación de éstos o falta de cuidados del paciente. Además, que se catalogarían como un cuerpo extraño en contacto con los tejidos y pueden ser parte importante de algunos accidentes y desencadenantes de lesiones en tejidos blandos o duros.

Existe un factor en este tipo de aparatología que puede causar alteraciones a nivel génico, como lo es la liberación de iones metálicos proveniente de los

mismos, como aleaciones de níquel y cromo en los pacientes que lo portan. Por lo tanto, es posible que estas aleaciones de níquel y cromo de los aparatos de ortodoncia, en cantidades suficientes, puede inducir efectos genotóxicos localizados, pero estos cambios revierten en la eliminación de los aparatos. La corrosión de una aleación es de fundamental importancia para su biocompatibilidad porque la liberación de elementos de la aleación es casi siempre necesaria para efectos adversos biológicos tales como toxicidad, alergia, mutagenicidad y carcinogenicidad. Aleación y corrosión proporciona iones libres que afectan a los tejidos alrededor de ella.<sup>13</sup>

## 5. METODOLOGIA

Estudio descriptivo comparativo donde se tomarán muestras de tejido gingival de pacientes atendidos en el Centro de Referencia de HG de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena. Los tejidos se seleccionarán mediante un muestreo no probabilístico a conveniencia, divididas en un grupo casos formado por pacientes con HG que tengan aparatología ortodóntica fija y, un grupo control constituido por individuos periodontalmente sanos, que por requerimientos protésicos o estéticos requieran cirugías de alargamiento coronal. Se obtuvo un total de 9 muestras. Según la resolución 8430 de 1993 esta investigación se clasifica como: investigación con riesgo mayor que el mínimo.

Para realizar el estudio se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de inclusión:

- Grupo casos: Los pacientes deben tener 18 años o más, presentar aparatología ortodóntica fija, diagnosticados con HG por ortodoncia, pacientes con ausencia de enfermedades sistémicas y aceptación de participar en el estudio mediante firma del "consentimiento informado".
- Grupo controles: Los pacientes deben tener 18 años o más, pacientes sistémicamente sanos, pacientes que por motivos protésicos o estéticos requieran cirugía de alargamiento coronal, pacientes con ausencia de HG,

ausencia de enfermedades sistémicas y aceptación de participar en el estudio mediante “consentimiento informado”.

Criterios de exclusión:

Embarazadas. Fumadores; Pacientes con HG asociada a biofilm dental; Pacientes con control de biofilm mayor a 15%; Pacientes que se encuentren bajo tratamiento farmacológico con inmunosupresores, anticonvulsivantes y bloqueadores de calcio. Así como los pacientes que usaron medicamentos antiinflamatorio o antibiótico en los últimos tres meses; Pacientes con enfermedades sistémicas; Pacientes con periodontitis y signos radiográficos de pérdida ósea o sometidos a cirugía periodontal previa menor a 1 año. No se tendrán en cuenta aquellos pacientes que se nieguen a diligenciar el “consentimiento informado” y pacientes con aparatología ortodóntica removible.

Muestras de Tejido gingival

Previa al procedimiento quirúrgico y recolección de tejido gingival en los pacientes. Se procederá con la explicación de objetivos de estudio y firma del consentimiento informado en cada paciente. A continuación, se llevará a cabo un examen clínico minucioso extra e intraoral. A cada uno de los pacientes se le realizará una profilaxis para disminuir la carga de biofilm y eliminar el grado de inflamación gingival.<sup>21</sup> Las muestras de tejido gingival se obtendrán por gingivectomía, para los pacientes con HG por ortodoncia y alargamiento coronario, en los individuos sanos; previa anestesia local y utilización de bisturí Bard Parker hoja número 15. Los tejidos gingivales colectados serán lavados tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, Gibco™). Estos tejidos, serán depositados en tubos Eppendorf de 5 ml y transportados al laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad de Cartagena.

Posteriormente, las biopsias serán fraccionadas entre 2-3 mm<sup>3</sup> y fijadas en paraformaldehído (PFA) tamponado a 4% durante 48 horas. A continuación, los tejidos gingivales serán sumergidos 2 veces durante 20 minutos en PBS 1X. Luego, en 2 baños de alcohol/ PBS a una concentración de 1:1 durante 30

minutos. Posteriormente, se harán 2 baños consecutivos en cada concentración crecientes de alcohol (70%, 85%, 95%, 100%) durante 30 minutos cada uno. A continuación, se procederá a realizar 2 baños en Xileno de 30 minutos cada uno. Finalmente, se depositará los tejidos gingivales en moldes de inclusión en acero inoxidable para parafina modelo M474 (24x24x5 mm) durante toda la noche a 55° C. Al día siguiente, se eliminará la parafina depositada el día anterior y se procederá a realizar el cambio de parafina. Los tejidos gingivales en sus bloques permanecerán a temperatura ambiente para su respectiva solidificación. Una vez obtenidos los bloques de parafina con los respectivos tejidos gingivales, se llevarán a cabo cortes entre 5-7  $\mu$ m en un micrótomo Leica RM2245 RST e inmediatamente se depositarán en baño de flotación para cortes de parafina, modelo MH8517. Por último, los cortes serán depositados en láminas Thermo Scientific™ SuperFrost J1800AMNZ.

#### Análisis histológicos

Para los análisis histológicos será necesario remover la parafina de las láminas mediante 2 baños en Xileno durante 5 minutos y concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 60% y 30%) cada una durante 5 minutos.<sup>22</sup> Posterior a esto se realizarán distintas coloraciones en los tejidos:

Coloración hematoxilina-eosina: Una vez se sumerjan los tejidos en 2 baños de xileno (Leica Biosystems) durante 5 minutos, los cortes de tejido gingival serán rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 60%, 30%); luego coloreados con Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos e inmediatamente lavados en agua. Después, se procederá a realizar una diferenciación acido-alcohol durante 30 segundos seguida de un lavado con agua destilada y posterior coloración con eosina durante 3 minutos. Finalmente, los cortes van a ser deshidratados con concentraciones de alcohol crecientes (70% y 2 veces al 100%), luego lavados en xileno y montados en DPX (medio de montaje anhidro - Sigma-Aldrich).

Inmunofluorescencia: Para determinar el área y el número de núcleos presentes en el epitelio gingival de cada paciente será necesario realizar coloración con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Para ello, se procederá al desparafinado de las muestras tal como se describió precedente en las coloraciones histológicas. Luego se procederá a enjuagar los cortes durante 15 minutos en una solución compuesta por PBS 1X y Tritón al 0.1%. Posteriormente, los cortes del tejido gingival serán incubados durante 1 hora en una solución de bloqueo, compuesta por: PBS 1X, gelatina y Tritón 0.1%. A continuación, se procederá a incubar las láminas con los tejidos gingivales con DAPI (1/1000) durante 15 minutos, previa dilución en la solución de bloqueo. Luego se realizarán 3 lavados de 10 minutos en PBS 1X + Tritón a 0.1% y finalmente se realiza el montaje entre las láminas y laminillas mediante Immu-Mount™ (Thermo Scientific).

#### Observación Microscópica

Una vez realizada las coloraciones y el respectivo montaje de los tejidos, se analizarán las muestras con microscopio Leica DM2500 con objetivo de 20x para imagen global del tejido y luego con objetivo de 100x para la identificación de las células de las capas del tejido epitelial (granulosa, espinosa y basal). Se procederá a registrar 10 imágenes por estrato del tejido epitelial de cada paciente. Para la identificación de los núcleos fluorescente se utilizará un microscopio Leica DM2500 LED.

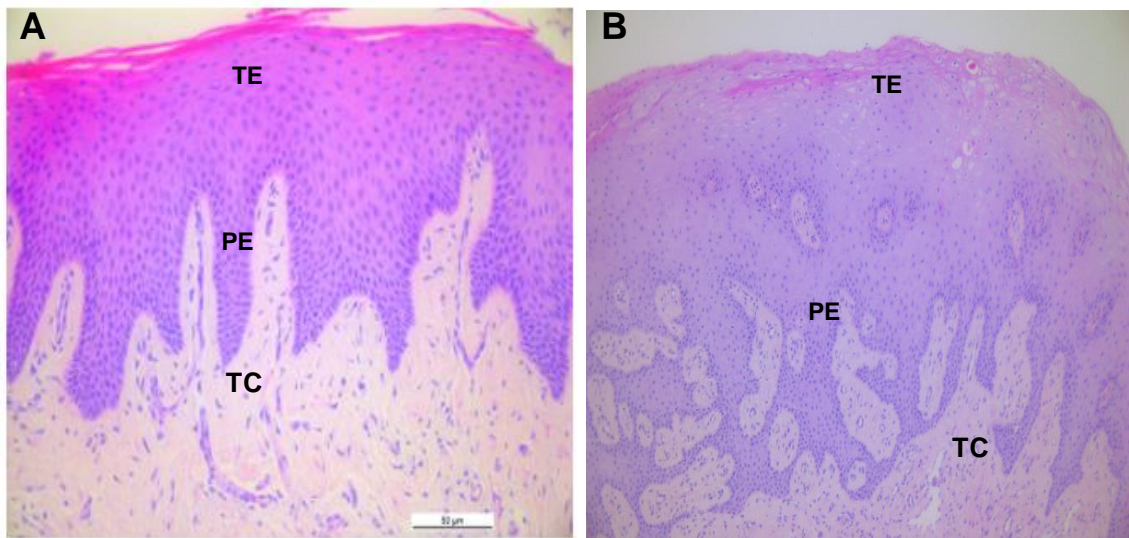
#### Análisis de imágenes

Luego de obtenidas las imágenes, éstas serán analizadas mediante el programa ImageJ, versión 1.50i, desarrollado por la National Institutes of Health (Maryland, Estados Unidos). Se procederá a contabilizar las células presentes en cada capa del epitelio gingival en las que se observe la presencia de vacuolización citoplasmática, excluyendo aquellas células que no se observen completamente sus límites en la imagen o se encuentren difusas. De esta forma se obtendrá el número de vacuolas presentes en cada capa del epitelio gingival y consecuente

a esto, el número total presentes en la extensión del tejido epitelial de los pacientes pertenecientes al grupo de casos y al grupo control.

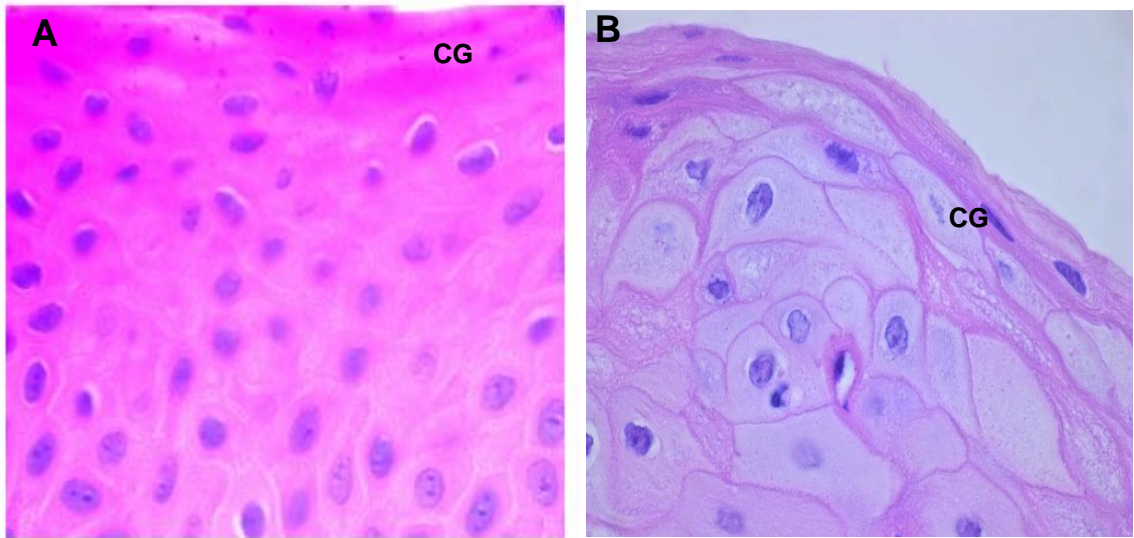
## 6. RESULTADOS

Se obtuvo un total de 9 muestras de tejido gingival, de las cuales 6 (66,7%) pertenecían al grupo de casos y 3 (33,3%) al grupo control (VER ANEXO 1). Histológicamente, en el epitelio gingival de las muestras del grupo control se observó un tejido epitelial con una delgada capa de queratina, núcleos celulares simétricos en cada una de las capas de queratinocitos y prolongaciones epiteliales que se insertaban en el tejido conectivo subyacente. En este último tejido, se pudo constatar la presencia de fibroblastos gingivales, vasos sanguíneos (arteriolas y vénulas) inmersos en una matriz extracelular con predominio de fibras de colágeno (figura 1.A). En las muestras del grupo de casos, se observó un epitelio hipertrófico con cambios en la disposición de los queratinocitos. Estas células presentaban una aparente modificación en las uniones intercelulares y pérdida en la polaridad apicobasal de las células que lo integraban. Principalmente, a nivel de las células que formaban la membrana basal. Se evidenció un epitelio gingival con acantosis debido a la multiplicación de células, paraqueratosis, hiperqueratosis y células que tenían una apariencia de 'globos', aspecto que evoca el proceso biológico denominado vacuolización celular. Estas vacuolas presentaban distintos tamaños y en algunas ocasiones eran confluentes. Estos aspectos morfológicos estuvieron acompañados de crestas epiteliales de gran tamaño y en algunos casos fusionadas en comparación con las prolongaciones epiteliales de los tejidos epiteliales de individuos periodontalmente sanos. En el tejido conectivo fue identificada una red densa de fibras de colágeno organizados de manera irregular. Estas fibras rodeaban los vasos sanguíneos que tuvieron aspecto dilatados, fibroblastos gingivales y un discreto infiltrado de células mononucleares (figura 1.B).



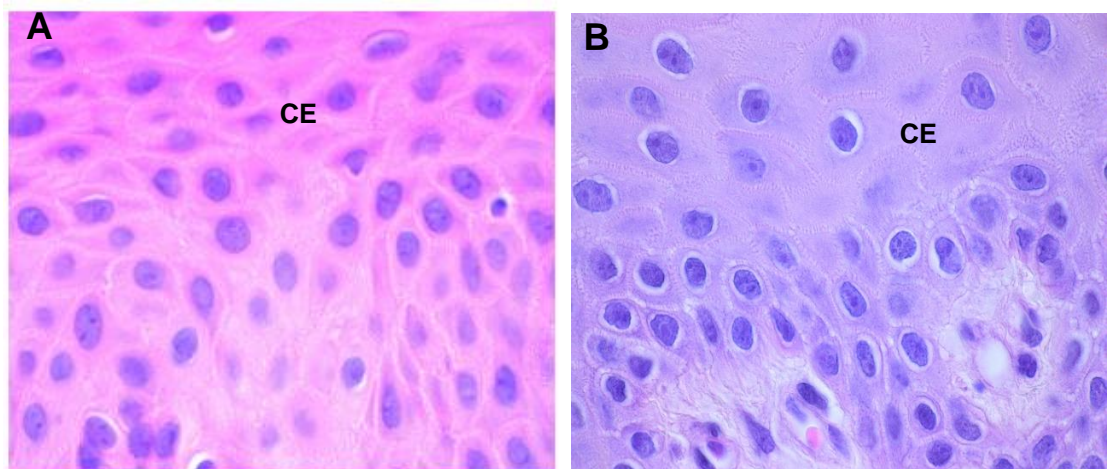
**Figura 1: Tejido gingival de paciente sano (A). Microfotografía de paciente con hipertrofia gingival por ortodoncia (B). Coloración de hematoxilina- eosina. Objetivo 20x. TE: tejido epitelial; PE: prolongaciones epiteliales; TC: tejido conjuntivo. Barra: 200 µm (A, B).**

Un análisis histológico más detallado permitió conocer la morfología y disposición de los queratinocitos en cada estrato epitelial. En la capa granulosa de los tejidos del grupo control, se observaron pocas células con vacuolización (figura 2. A), la media de células con estas características fue de 5,36 y la desviación estándar de 2,04. Mientras que, en los tejidos de los pacientes con hipertrofia gingival por ortodoncia, en la misma capa, se observó una mayor cantidad de núcleos con aspecto de vacuolización (figura 2.B). En este grupo de pacientes, la media de este hallazgo histológico fue de 6,86 con una desviación estándar de 3,10. Ver anexo 2.



**Figura 2:** Pocas células con vacuolización en paciente sano, en la capa granulosa (A). Vacuolización celular presente en la misma capa en paciente con hipertrofia gingival (B). Coloración hematoxilina- eosina. Objetivo 100x. CG: capa granulosa.

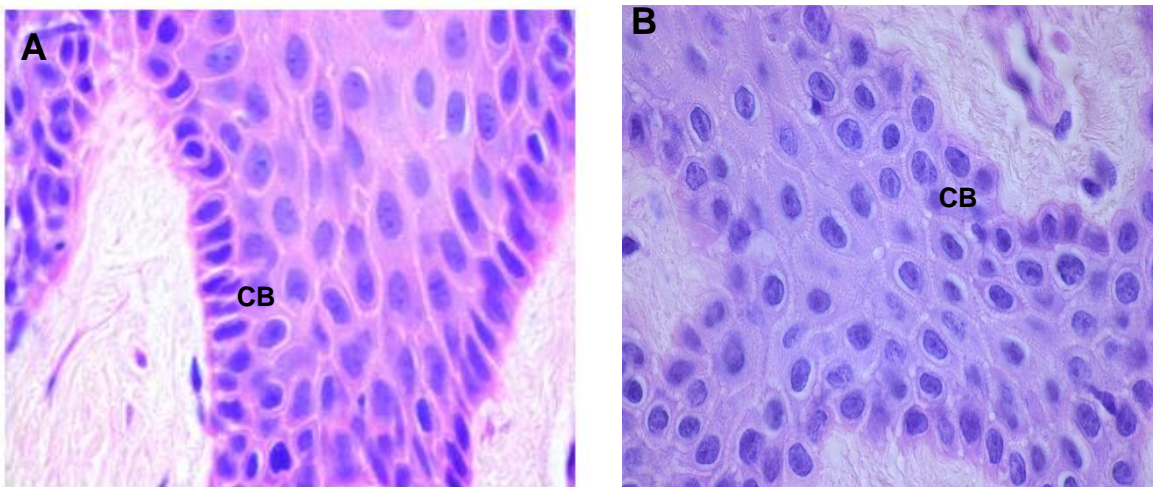
El análisis de la capa espinosa de los tejidos de los pacientes del grupo control permitió identificar escasas vacuolas (figura 3.A). La media fue de 7,93 y una desviación estándar de 3,45. Por su parte, en la misma capa de los tejidos de los pacientes con hipertrofia gingival, se constató la presencia de múltiples vacuolas y la confluencia entre algunas de ellas (figura 3.B.). Se obtuvo una media de 28,26 y una desviación estándar de 11,82. Ver anexo 3



**Figura 3:** Se observan muy pocas vacuolas en la capa espinosa del tejido del paciente sano (A). Se observa la presencia de vacuolización en la capa espinosa de los pacientes HG (B). Coloración Hematoxilina- eosina. Objetivo 100x. CE: capa espinosa.



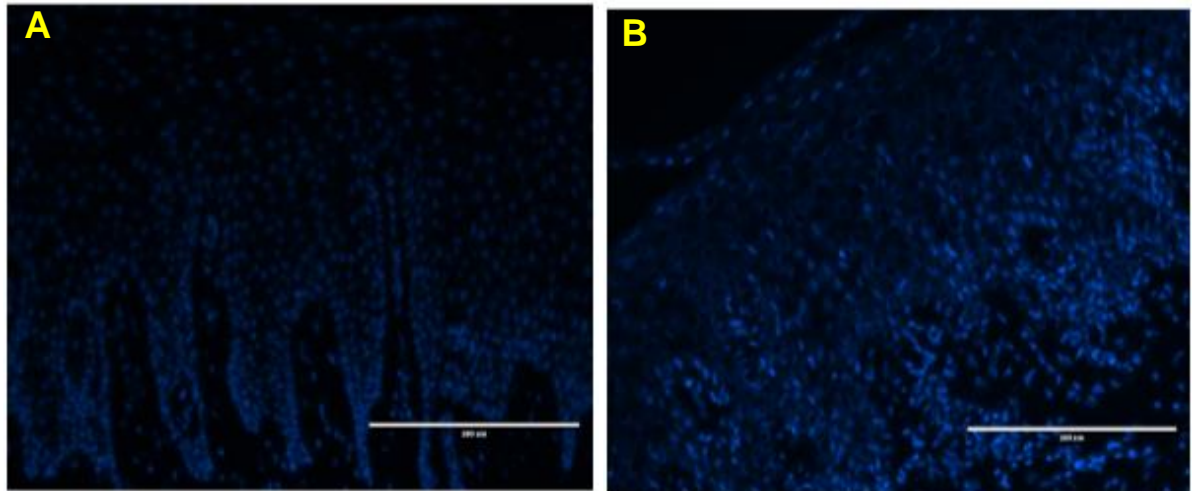
Finalmente, el estudio histológico reveló que, en la capa basal de los tejidos de pacientes sanos, no se presentaron cambios en el aspecto morfológico de sus células (vacuolización) (Figura 4.A.) La media fue de 12,60 y la desviación estándar de 4,51. Sin embargo, en los tejidos gingivales de pacientes con hipertrofia gingival, se evidenció la agrupación de múltiples vacuolas y la disminución del núcleo celular (figura 4.B) con una media de 25,90 y una desviación estándar de 5,16. Ver anexo 4



**Figura 4:** Se evidencian pocos cambios celulares en el tejido de paciente sano, ausencia de vacuolización, en la capa basal (A). Se observa la confluencia de múltiples vacuolas y disminución del núcleo celular (B). Coloración hematoxilina-eosina. Objetivo 100x. CB: Capa basal.

La tinción fluorescente del ADN con DAPI, evidenció una señal en los núcleos celulares de los tejidos de pacientes del grupo control. Estos núcleos presentaron un tamaño uniforme, redondos u ovalados y una delimitación bien definida (figura 5.A). La media para el total de núcleos en las muestras de este grupo fue de 2918,33, con una desviación estándar de 1098,32. Respecto al área de los núcleos, la media fue de 128923 y la desviación estándar de 10112,21. Por el contrario, en los tejidos de pacientes con hipertrofia gingival, la disminución en el tamaño y número de núcleos celulares debido a su desplazamiento hacia la periferia de la célula fue evidente (figura 5.B). La media para el total de núcleos

en el grupo casos fue de 2784 con una desviación estándar de 144,63 y el área nuclear, la media fue de 77398,33 con una desviación estándar de 9120. Ver anexo 5 y 6.



**Figura 5: Núcleos con tamaño uniforme en paciente sin hipertrofia gingival (A). Se observa disminución de tamaño y forma irregular en los núcleos del tejido de paciente con hipertrofia gingival (B). Coloración con DAPI. Objetivo 20x. Barra blanca: 200  $\mu$ m (A, B).**

El test de Shapiro-Wilk no rechazó el supuesto de normalidad y la prueba de Levene no rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas. Consecuentemente los datos fueron sometidos a la prueba t de muestras independientes con la ayuda del software SPSS v 25 y un nivel de confianza de  $p < 0,05$ . Para las muestras del grupo casos se obtuvo una mayor cantidad de vacuolización en las tres capas correspondientes al epitelio gingival (granulosa, espinosa y basal) en comparación a las muestras del grupo control las cuales arrojaron pocas células con procesos de vacuolización celular. En la capa granulosa ( $p=0,16$ ), en la capa espinosa ( $p=0,003$ ) y en la basal ( $p= 0,017$ ), con diferencia estadísticamente significativa en las 2 últimas respectivamente. De igual forma al comparar el número de núcleos y determinar el área de estos últimos en las muestras, los resultados fueron un número disminuido de núcleos y una menor área en los núcleos del grupo casos comparados con los del grupo control. Para el total de núcleos ( $p=0.799$ ) y para el área de núcleos ( $p=0,016$ ), con diferencia estadísticamente significativa en el área de los núcleos.

## 7. DISCUSION

Al estudiar las muestras del epitelio gingival de los pacientes con HG por el uso de aparatología ortodóntica se lograron observar la presencia de cambios morfológicos celulares presentes en el tejido como la acantosis, paraqueratosis, hiperqueratosis y vacuolización celular; así como también el aumento del número de células y disminución en el tamaño de sus núcleos. De igual manera, pero en menor proporción se encontraron cambios celulares como vacuolización en los pacientes control. Con esto podemos afirmar que la presencia de cambios celulares en el epitelio gingival no solo se producen por acumulo de biofilm dental o por el efecto de medicamentos, sino que también desempeña un papel muy importante la presencia de aparatología ortodóntica ya que en la cavidad oral de este tipo de pacientes se encuentran múltiples factores como biodegradación de los elementos de ortodoncia, fluctuaciones del PH salival, temperatura y movimientos dentales que llevan a cambios en la conformación del epitelio gingival. Tal y como lo describe Arcila et al. (2014) donde mencionan que las aleaciones metálicas con las que se fabrican los aditamentos ortodónticos pueden desencadenar la aparición de HG <sup>8</sup>. Sumado a esto Ghon Y et al (2011) reportan que la irritación mecánica y química de las bandas y cementos empleados en el tratamiento ortodóntico, desencadenan el desarrollo de HG en este grupo de pacientes<sup>23</sup>.

Otros estudios han reportado el comportamiento de los metales liberados por los aparatos de ortodoncia bajo diversos cambios de condiciones físicas y químicas. Estos demuestran que los iones níquel liberados en muestras de saliva o de sangre son significativamente inferiores al promedio de ingesta dietaria y sin alcanzar concentraciones tóxicas<sup>24-25</sup>. Sin embargo, concentraciones no tóxicas podrían ser suficientes para producir cambios biológicos en la mucosa oral <sup>26</sup>. Dichos cambios son evidentes en el presente estudio donde la presencia de aparatología ortodóntica conlleva a alteraciones en el tamaño, número y forma de las células del epitelio gingival.

Aunque los aparatos de ortodoncia no parezcan tener una relación íntima con los tejidos orales, el ambiente particular de la cavidad oral potencia la corrosión

y consecuente liberación de estos metales; siendo detectables en saliva, mucosa oral y encía; esta última revelada en pacientes ortodónticos con presencia de HG<sup>23</sup>. Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio y a la afirmación anteriormente citada, se puede evidenciar que aunque en el tejido epitelial de los sujetos sanos se encontraron cambios morfológicos, estos son significativamente menores a los encontrados en los individuos con HG por el uso de aparatología ortodóntica. Estas afirmaciones nos demuestran la posible relación que existe entre el uso de aparatología ortodóntica, la exposición prolongada y continua a los metales utilizados en odontología, pueden influir en la calidad de los tejidos y en los procesos bioquímicos que en estos ocurran.

Por otra parte, otros estudios expresan que, aunque se requieren procedimientos complejos para distinguir cada tipo de muerte celular, la formación de vacuolas es un proceso reversible o irreversible, que no siempre finaliza con muerte celular. Por lo tanto, monitorear y contar el número de vacuolas y la proporción de células con vacuolas es un método comúnmente utilizado para indicar y cuantificar la eficacia de la terapia. Varios estudios han demostrado que el procesamiento de imágenes puede proporcionar un medio rápido, conveniente y preciso para realizar la detección de células<sup>27</sup>. Esta enunciación es consecuente con el presente estudio donde fue posible la detección de los cambios celulares mediante el uso de la herramienta ImageJ, versión 1.50i, desarrollado por la National Institute of Health, en él se observó y contabilizó la presencia de vacuolización citoplasmática en las distintas capas del epitelio gingival del grupo casos y control. Para el estudio del área de los núcleos se usó el mismo programa en el que se observó que en los pacientes con hipertrofia gingival portadores de aparatología ortodóntica presentaban una disminución en el área de sus núcleos. Dichos resultados nos permiten concluir que la HG por aparatología ortodóntica promueve la aparición de cambios morfológicos celulares en el tejido más significativos que en los pacientes no portadores.

Toshihiko Aki y colaboradores mencionaron en el 2012 en su estudio, que, aunque las apariencias generales de las vacuolas parecen ser similar bajo microscopía óptica, la vacuolización citoplasmática puede ocurrir por una amplia variedad de estímulos<sup>28</sup>. Esta afirmación refuerza los resultados obtenidos en el

presente estudio, donde se demuestra que la presencia de aparatología ortodóntica fija en el grupo casos desencadena la aparición de cambios celulares ocurridos en el epitelio gingival como lo es el proceso de vacuolización, el cual fue evidente en el 100% de las muestras analizadas.

Se puede concluir que los pacientes que presentan HG asociada a tratamiento ortodóntico fijo tienden a desarrollar cambios morfológicos en las células del epitelio gingival. Incluyendo, la presencia de vacuolización citoplasmática, además de presentar un menor número y área de sus núcleos. Futuros estudios serán útiles para dilucidar y mejorar la comprensión de los cambios morfológicos y moleculares presentes en HG de pacientes con tratamiento ortodóntico.

## BIBLIOGRAFÍAS

1. [Nemtoi A, Scutariu M, Nemtoi A, Eva L, Dumitrescu G, Plamadeala P, Ferariu D, Haba D, Costea C. Clinical, imaging and histopathological correlations of gingival overgrowth: a retrospective analysis in northeastern Romanian population. Rom J Morphol Embryol 2019, 60\(3\):811–822.](#)
2. [Soriano-Angulo R, Cáceres-La torre A. Gingival enlargement resolution by means of non-surgical periodontal therapy: case report. Revista Odontológica Mexicana, 2016;20 \(4\): 253-258.](#)
3. [Cañas L, Pardo M, Arboleda S. Agrandamiento gingival inducido por medicamentos. Reporte de un caso clínico. Univ Odontol. 2017 Jul-Dic; 36\(77\).](#)
4. [Manzur-Villalobos I, Díaz-Rengifo IA, Manzur-Villalobos D, Díaz-Caballero AJ. Agrandamiento gingival farmacoinducido: Serie de casos. Univ. Salud. 2018;20\(1\):89-96.](#)
5. [Wierna A, Ansonnaud A, Carino S, Soria A, González M, & DIP A. Fibromatosis gingival idiopática unilateral: Reporte de un caso con cuatro años de seguimiento. Int. J. Odontostomat. 2015; 9\(1\):19-24.](#)
6. [Casian Romero A, Trejo Quiroz P, De León Torres C, Carmona Ruiz D. Hiperplasia Fibrosa Inflamatoria: reporte de un caso. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2011; 4\(2\): 74-79.](#)
7. [Heravi F, Abbaszadegan MR, Merati M, Hasanzadeh N, Dadkhah E, Ahrari F. DNA damage in oral mucosa cells of patients with fixed orthodontic appliances. J Dent \(Tehran\). 2013;10\(6\):494–500.](#)
8. [Gómez Arcila V, Fang Mercado L, Herrera Herrera A, Díaz Caballero A. El níquel y su vínculo con el agrandamiento gingival: Revisión de la literatura. Av Periodon Implantol. 2014; 26, \(2\): 83-89.](#)
9. [Díaz Caballero A, Mora Solano E, Herrera Herrera A. Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal. Revisión sistemática Av. Odontostomatol 2013; 29 \(2\): 95-102.](#)

10. [Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluación de la genotoxicidad y citotoxicidad en las células epiteliales bucales de pacientes sometidos a tratamiento de ortodoncia con tres compuestos de unión fotopolimerizados mediante el uso de pruebas de micronúcleos. \*Coreano J Orthod.\* 2014; 44 \(3\): 128–135.](#)
11. [Shubin A, Demidyu LL, Komissarov A, Rafieva L, Kostrov S. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. \*Oncotarget.\* 2016 Aug 23; 7\(34\): 55863–55889.](#)
12. [Enríquez A, Molano P. Hiperplasia gingival en aparatos de ortodoncia. Revisión de la literatura. \*Revista latinoamericana de ortodoncia y odontopediatra.\* 2017.](#)
13. [Torres-Bugarín O, & Ramos-Ibarra M. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. \*Int. J. Morphol.\* 2013; 31\(2\):650-657.](#)
14. [Taborga Manrique X, Quispe Aruhuito R, Larrea Poma M, Farfán Ochoa P, Revollo Zepita S. Presencia de micronúcleos en células exfoliadas de la mucosa oral en personas expuestas a agentes genotóxicos. \*Rev.Cs.Farm. y Bioq.\* 2016; 4\(2\): 35-44.](#)
15. [Casian Romero A, Trejo Quiroz P, De León Torres C, Carmona Ruiz D. Hiperplasia Fibrosa Inflamatoria: reporte de un caso. \*Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.\* 2011; 4\(2\): 74-79.](#)
16. [Gawron K, Łazarz-Bartyzel K, Potempa J, Chomyszyn-Gajewska M. Gingival fibromatosis: clinical, molecular and therapeutic issues. \*Orphanet Journal of Rare Diseases.\* 2016; 11\(9\).](#)
17. [Castellanos González M, et al. Efectos fisiopatológicos del tabaquismo como factor de riesgo en la enfermedad periodontal. \*Rev. Finlay.\* 2016; 6 \(2\): 2221-2434.](#)
18. [Quintero Builes p, Yepes Chamorro E, Rendón J. Reacciones del tejido pulpar a movimientos ortodóncicos específicos: Una revisión de literatura. \*Revista Nacional de Odontología.\* 2011; 7\(13\):54-60.](#)

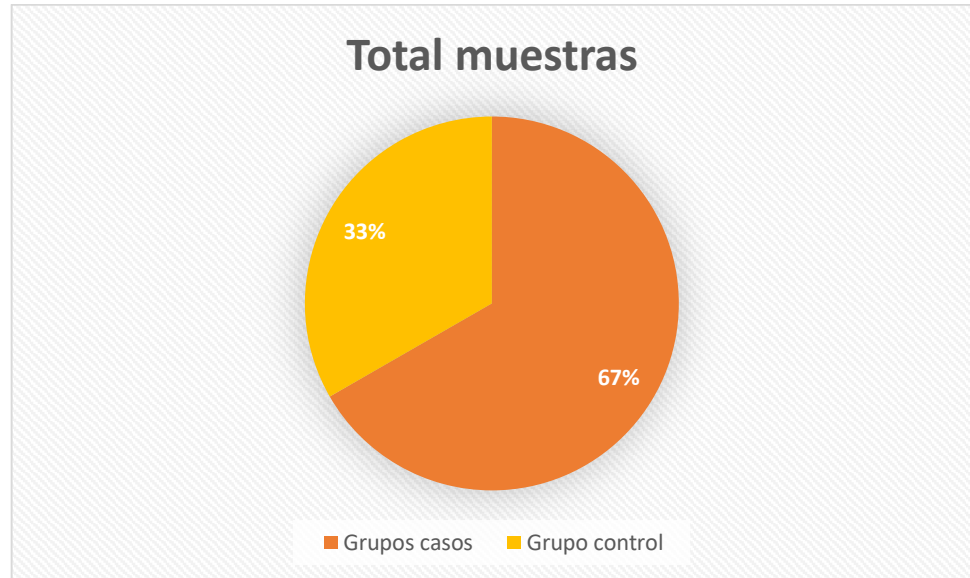
19. [Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna MG, Macriz-Romero N, Flores-García A, Ramos-Ibarra M. Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. Residente 2013; 8 \(1\): 4-11.](#)
20. [Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Anales Sis San Navarra.2005; 28\(2\): 1137-6627.](#)
21. [Lione R, Pavoni C, Noviello A, Clementini M, Danesi C, Cozza P. Conventional versus laser gingivectomy in the management of gingival enlargement during orthodontic treatment: a randomized controlled trial. Eur J Orthod. 2020;42\(1\):78-85.](#)
22. [Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, van Rossum DB, Vanselow DJ, Hubley MJ, Clark DP, Mandrell DT, Cheng KC. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2018; 208:38-46.](#)
23. [Gong Y, Lu J, Ding X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2011; 140:58-64.](#)
24. [Ousehal L, Lazrak L. Change in nickel levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. Int Orthod. 2012; 10:190-7.](#)
25. [Gursoy S, Acar AG, Sesen C. Comparison of metal release from new and recycled bracket-archwire combinations. Angle Orthod. 2005; 75:92-4.](#)
26. [Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M, Bouillaguet S. Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. J Oral Rehabil 2002; 29:133-9.](#)
27. [Pei-Ju C, Shao-Ming W, Min-Jen T 2, Pin-Jie H. Automated Bright Field Segmentation of Cells and Vacuoles Using Image Processing Technique. Cytometry A. 2018; 93\(10\):1004-1018.](#)



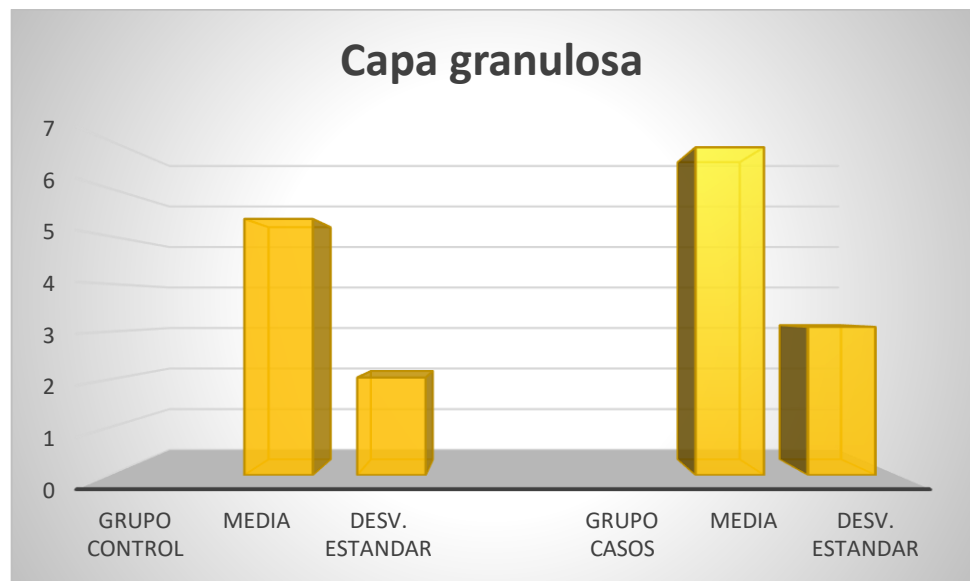
28. [Toshihiko A, Akina N & Koichi U. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. Cell Biol Toxicol. 2012; 28:125–131.](#)

## ANEXOS

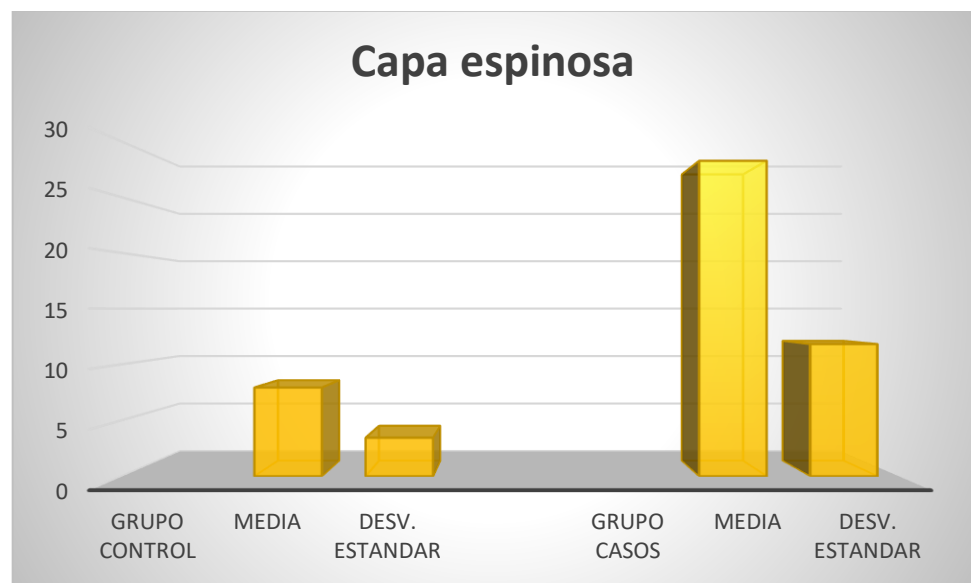
### Anexo 1



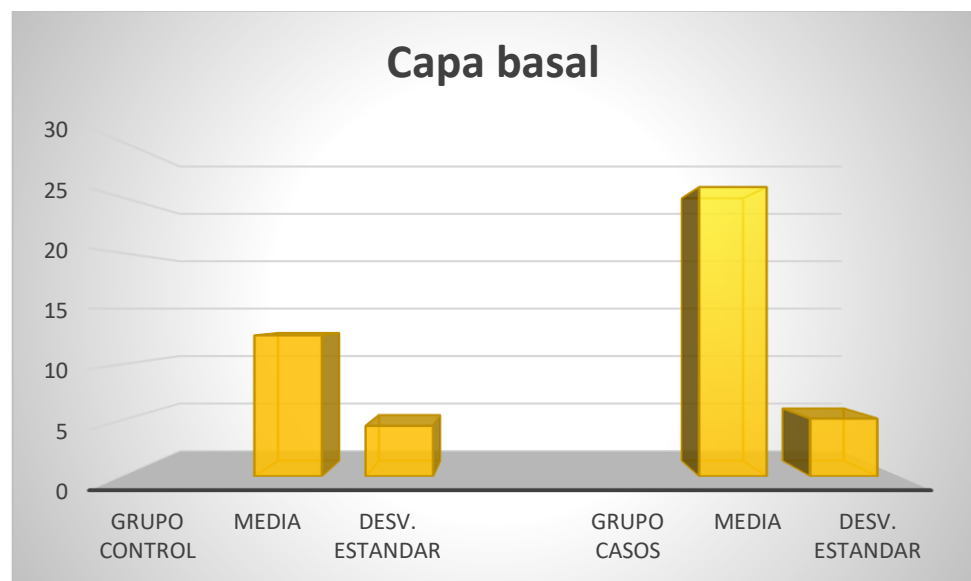
### Anexo 2



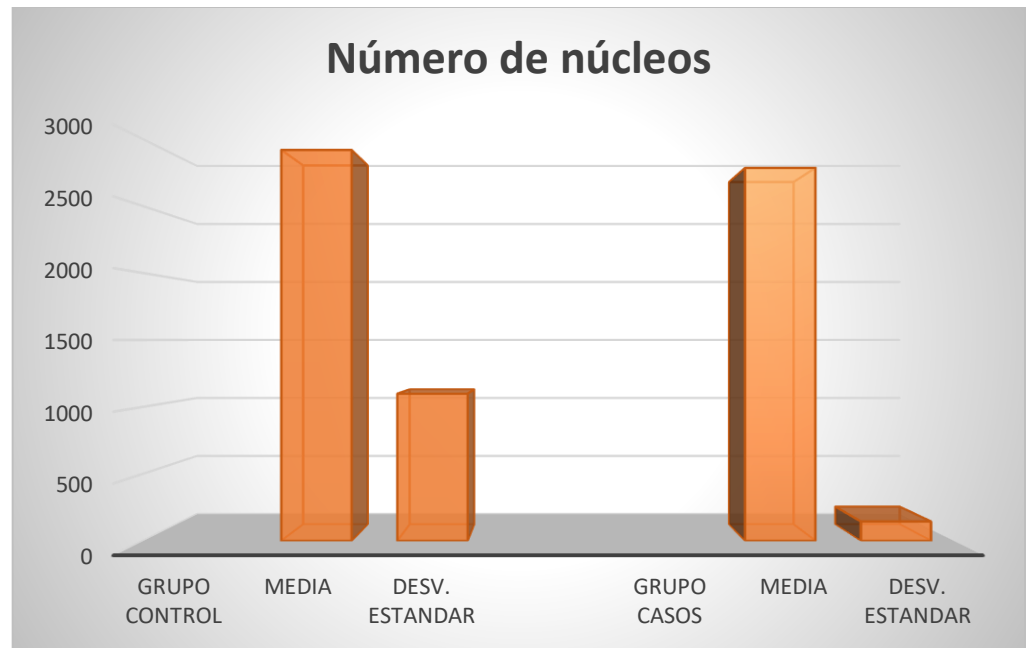
### Anexo 3



### Anexo 4



### Anexo 5



### Anexo 6

