

## Expresión de Ki-67 y PCNA en pacientes con agrandamiento gingival asociado al tratamiento de ortodoncia

*Expression of Ki-67 and PCNA in patients with gingival enlargement associated with orthodontic treatment*

Víctor Simancas-Escorcía<sup>1</sup>  Jorge Romero-Polo<sup>2</sup>  Eilien Tovío Martínez<sup>3</sup>  Antonio Díaz-Caballero<sup>3</sup> 

### RESUMEN


**Introducción:** El agrandamiento gingival inducido por tratamiento de ortodoncia (AGTO) es un incremento clínico e histológico localizado o generalizado del tamaño de la encía. El AGTO es considerado el principal efecto no deseado de la ortodoncia. Esta investigación tiene como objetivo identificar y comparar la expresión inmunohistoquímica del antígeno Ki-67 y PCNA como marcadores de proliferación celular en tejido gingival de pacientes con AGTO e individuos sanos. **Métodos:** Estudio descriptivo y comparativo donde se analizaron 30 muestras de tejido gingival de sujetos con AGTO (grupo estudio n=6) y 30 muestras de individuos sanos (grupo control: n=6) mediante análisis inmunohistoquímico con el antígeno Ki-67 y PCNA. Los inmunomarcajes fueron identificados como una tinción marrón. La cuantificación de Ki-67 y PCNA fue realizada con el software procesador de imágenes digitales ImagenJ, versión 1.50i. El software IBM SPSS Statistics 25 fue empleado para el análisis estadístico. Se declaró significancia si  $p < 0.05$ . **Resultados:** Se constató una heterogeneidad inmunohistoquímica de Ki-67 y PCNA circunscrito a nivel nuclear y núcleo-citoplasmático estadísticamente significativo entre las muestras de tejido gingival del grupo estudio y del grupo control. El marcaje inmunohistoquímico de Ki-67 se limitó a las células epiteliales de la capa basal mientras el antígeno PCNA fue visualizado ampliamente en las células de todas las capas de tejido epitelial analizadas. **Discusión:** Es posible que los aspectos anatómicos y la expresión de marcadores de proliferación celular obedezcan a cambios adaptativos del tejido epitelial como resultado de un sometimiento constante a fuerzas de tracción ortodóntica, reacciones alérgicas al níquel y el acúmulo de biopelícula en los pacientes portadores de tratamiento de ortodoncia. **Conclusión:** Las muestras de encía de pacientes con AGTO presentan un promedio mayor en la tasa de proliferación de células epiteliales evaluadas con Ki-67 y PCNA en comparación con muestras de encía de individuos sanos.

**Palabras clave:** Proliferación celular, Ki-67, PCNA, agrandamiento gingival, ortodoncia.

<sup>1</sup>Universidad del Sinú - Cartagena. Facultad de Ciencias de la Salud. Grupo GENOMA. Cartagena, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia

<sup>3</sup>Universidad de Cartagena, Grupo GITOU. Cartagena, Colombia.

**Autor de correspondencia:** Víctor Simancas 

**E-mail:** victor.simancas@unisinu.edu.co

**Recibido:** 06-07-2022

**Aprobado:** 14-11-2022

### ABSTRACT

**Introduction:** Orthodontic treatment-induced gingival enlargement (OTGE), a localized or generalized clinical and histological increase in the size of the gingiva. OTGE is considered the main unwanted effect of orthodontics. This research aims to identify and compare the immunohistochemical expression of Ki-67 antigen and PCNA as cell proliferation markers in gingival tissue of patients with OTGE and healthy individuals. **Methods:** Descriptive and comparative study where 30 gingival tissue samples from subjects with OTGE (study group: n=6) and 30 samples from healthy individuals (control group: n=6) were analyzed by immunohistochemical analysis with the Ki-67 antigen and PCNA. The immunolabels were identified as a brown stain. Ki-67 and PCNA quantification was performed with the ImagenJ digital image processing software, version 1.50i. IBM SPSS Statistics 25 Software was used for statistical analysis. Significance was declared if  $p < 0.05$ . **Results:** Statistically significant immunohistochemical heterogeneity of Ki-67 and PCNA circumscribed at the nuclear and nucleocytoplasmic level was found between the gingival tissue samples of the study groups and the control group. Immunohistochemical labeling of Ki-67 was limited to basal layer epithelial cells while PCNA antigen was widely visualized in cells from all epithelial tissue layers analyzed. **Discussion:** It is possible that the anatomical aspects and the expression of cell proliferation markers are due to adaptive changes in the epithelial tissue because of constant submission to orthodontic traction forces, allergic reactions to nickel and the accumulation of bacterial biofilm in patients with orthodontic treatment. **Conclusion:** Gingival samples from patients with OTGE present a higher mean epithelial cell proliferation rate evaluated with Ki-67 and PCNA compared to gingiva samples from healthy individuals.

**Keywords:** Cell proliferation, Ki-67, PCNA, gingival enlargement, orthodontic.

### INTRODUCCIÓN

El tratamiento de la ortodoncia tiene como propósito mejorar el aspecto estético y funcional de la oclusión en los pacientes. En décadas recientes se había considerado que la ortodoncia no tenía un impacto negativo sobre la salud periodontal mientras este último se mantuviera sano. Sin embargo, la literatura científica reciente ha señalado el efecto de la ortodoncia sobre el estado de salud periodontal indicando que el agrandamiento gingival asociado al tratamiento de ortodoncia (AGTO), también denominado hipertrofia o hiperplasia gingival, es el efecto no deseado comúnmente presentado en pacientes con tratamiento de ortodoncia (1). Este aumento excesivo y progresivo del tejido gingival, etiológicamente se relaciona con tratamientos de ortodoncia prolongados cuyo factor esencial es la acumulación de biopelícula dental (2). Entre

tanto, también se ha descrito que los pacientes portadores de tratamiento de ortodoncia tienen altos niveles de níquel en el tejido gingival y de proteínas carboniladas (3). La biopelícula como factor desencadenante del AGTO también ha sido reportada por parte de nuestro equipo observando incluso la persistencia del incremento del tejido gingival de pacientes portadores de ortodoncia que previamente recibieron un tratamiento periodontal quirúrgico con el propósito de mantener un índice de O'Leary  $\leq 15\%$ . (4)

Histopatológicamente, el agrandamiento gingival inducido por el tratamiento de ortodoncia se caracteriza por presentar un epitelio gingival hiperplásico e hipertrófico con grados variables en el espesor, la queratinización de las capas superficiales y muchas áreas con paraqueratosis (5,6). Otros hallazgos incluyen un tejido conectivo fibroso abundante en fibras de colágeno tipo I y colágeno tipo III (4). Recientemente hemos reportado en una población de pacientes con AGTO, la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima (EMT, siglas inglés) tales como S-100A4 y alfa actina del músculo liso- $\alpha$ -SMA. Los hallazgos de estos marcadores sugieren un eventual rol de la EMT en la fisiopatología de pacientes con AGTO. Aunque varios mecanismos pueden estar involucrados en estos procesos, la EMT como mecanismo de transdiferenciación celular implica la pérdida de contacto entre las células del tejido epitelial y la adquisición de aspectos fisiológicos de células mesenquimatosas (6). Asimismo, se ha señalado que en la EMT las células epiteliales no siempre atraviesan la membrana basal, sino que también pueden adquirir señales propias de células mesenquimatosas conservando su localización tisular sin ninguna migración hacia el tejido conectivo. (7)

Aunque los mecanismos exactos de la patogénesis del AGTO siguen ampliamente sin conocerse, el aumento del aspecto morfológico del tejido epitelial en pacientes con AGTO se ha asociado con el incremento clínico y generalizado de la encía. Indistintamente, si las células epiteliales cruzan o no la membrana basal, reportes señalan la presencia irrefutable de un aumento del tejido gingival y la fusión de las prolongaciones epiteliales en pacientes con AGTO (6,8). Estos aspectos morfológicos probablemente involucren una pérdida de la homeostasis tisular entre la tasa de proliferación celular y aquellos cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos distintivos de la muerte celular programada o apoptosis. Inicialmente, una manera de conocer esta homeostasis es estudiando la tasa de proliferación de las células del tejido epitelial en pacientes con AGTO. A este efecto, dos marcadores nucleares de proliferación celular son ampliamente aceptados en la literatura científica: el antígeno Ki-67 y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, siglas inglés). El objetivo de esta investigación es identificar y comparar la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 y PCNA como marcadores de proliferación en tejidos gingivales de pacientes con agrandamiento gingival asociado al tratamiento de ortodoncia e individuos sanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio observacional descriptivo y comparativo realizado en el Centro de Referencia de Agrandamiento Gingival de la Universidad de Cartagena, Colombia. Fue aprobado por el comité de ética en investigaciones de la Universidad de Cartagena (No. 349902016), cuyos procedimientos estuvieron de acuerdo con las directrices contempladas en la última revisión de la Declaración de Helsinki y estándares éticos presenten en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Los individuos participantes fueron informados sobre los procedimientos de estudio y aceptaron participar voluntariamente mediante firma del consentimiento informado.

La muestra fue tomada y dividida a conveniencia en dos grupos. Fueron recolectadas 5 muestras de tejido gingival por cada individuo perteneciente tanto al grupo control (n=6) como al grupo estudio (n=6). Los tejidos provenientes del grupo control eran de participantes sanos no portadores de tratamiento de ortodoncia sometidos a cirugía de alargamiento coronal por razones estéticas y, los del grupo estudio fueron tejidos gingivales de pacientes con diagnóstico de agrandamiento gingival generalizado portadores de tratamiento de ortodoncia sometidos a gingivectomía y cuyas cirugías se realizaron en la zona vestibular entre los dientes 16 al 26 y 36 al 46. Como criterio de inclusión se estableció: individuos mayores de 18 años con buen estado de salud general. Fueron excluidos los participantes fumadores, mujeres en estado de embarazo e individuos medicados con fármacos responsables de inducir agrandamiento gingival. El examen y procedimientos clínicos fueron realizados por el mismo examinador, un periodoncista previamente calibrado encargado de realizar la fase higiénica periodontal, que incluyó actividades de educación en salud oral, control del biofilm dental, raspado, alisado radicular y reevaluación tisular a todos los participantes del estudio. Estos procedimientos garantizaron un índice O'Leary  $\leq 15\%$ . Este último aspecto era requisito esencial para proceder a realizar la cirugía gingival programada al menos 20 días después de la fase higiénica periodontal.

Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia local con Lidocaína (2%) y epinefrina 1:80000 aplicada mediante abordajes de los plexos alveolares en maxilar superior e infiltraciones vestibulares en mandíbula, previa realización de incisiones a bisel externo e intrasulcular con una hoja de bisturí N°15c (9). Dos reevaluaciones postquirúrgicas (7 y 14 días) permitieron constatar la cicatrización y ausencia de complicaciones en todos los participantes.

**Procesamiento de tejidos.** Las muestras (biopsias) obtenidas después de la cirugía se sumergieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, Gibco™). Estas muestras se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% durante 48 horas y se incluyeron en parafina. Obtenidos los bloques de parafina, éstos fueron cortados a 5  $\mu$ m en un micrótomos Leica RM2125 RST. Se emplearon 3 cortes

por paciente para un total de 18 cortes por cada grupo de estudio. Todos los cortes realizados fueron colocados en portaobjetos de adhesión con polisina (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>).

**Inmunohistoquímica.** Las muestras en serie fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en alcohol. Inicialmente, se realizó la recuperación antigénica incubando las muestras en citrato pH6 durante 20 minutos a 97°C. Luego, se procedió al bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena en solución de peróxido de hidrogeno al 3% por 15 minutos. Las secciones de tejido se trataron con suero normal de caballo (*Vector Laboratories*) durante 20 minutos, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario de conejo AB9260 anti-Ki-67 (1:200, *Sigma-Aldrich*) y ratón anti-PCNA – 7H4F8 (1:500, *Thermo Fisher Scientific*) que reconoce la secuencia de aminoácidos 53-196 de PCNA humana. Todos los anticuerpos fueron incubados durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente las secciones tisulares fueron lavadas en solución salina tamponada con Tris (TBS 1X, *Gibco*<sup>TM</sup>) y monolaurato de polioxietileno (20 sorbitano o *Tween*®20) a 0.05%. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti conejo/ratón biotinizado (*Vector Laboratories*) a temperatura ambiente, seguido de 3 enjuagues consecutivos y la incubación en VECTASTAIN® ABC (*Vector Laboratories*) durante 30 minutos. La revelación fue realizada mediante el kit Vector NovaRED® (*Vector Laboratories*) donde se procedió a la incubación con un sistema de detección de peroxidasa (HRP, siglas inglés) por 5 minutos y finalizada con el lavado de los portaobjetos con tampón durante 5 minutos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En esta etapa fue visible la coloración nuclear color marrón. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en etanol, xileno y montados en un medio de montaje anhidro (*DPX, Sigma-Aldrich*).

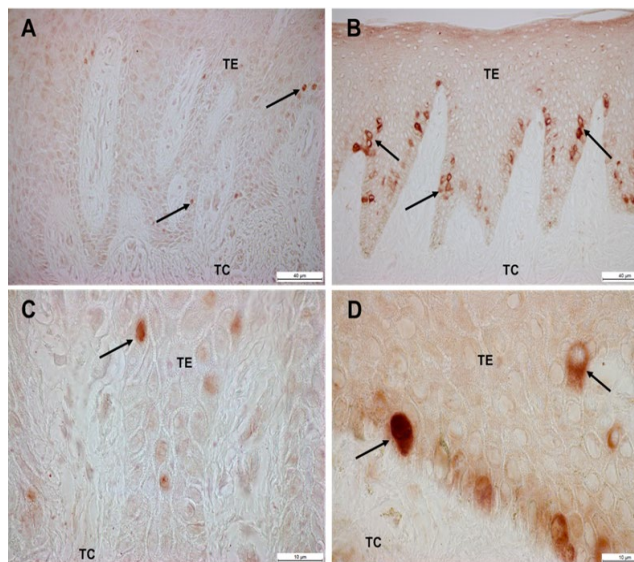
**Evaluación.** Las láminas con las secciones de tejido fueron observadas y registradas con un microscopio óptico Leica DM500 acoplado a una cámara digital. El marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo Ki-67 y PCNA fue identificado como una tinción marrón a nivel nuclear. Se realizaron secciones fotográficas con un aumento de 40x del tejido epitelial. Inicialmente se constató la orientación plana de las células epiteliales permitiendo reducir apariencias artificiales. Los cortes donde las células epiteliales no tenían un aspecto plano no fueron tenidos en cuenta. Se evaluaron 3 cortes de tejido gingival por cada paciente, en 5 ubicaciones diferentes por corte. Sólo se registraron como inmunorreactivas las células del tejido gingival teñidas de maneras uniformes y localizadas en el tejido epitelial. La cuantificación de la inmunoreacción de Ki-67 y PCNA fue realizada mediante el *software* procesador de imágenes digitales ImagenJ, versión 1.50i. Finalmente, los datos obtenidos fueron exportados a una hoja de cálculo en *Excel*. Todos los procedimientos fueron supervisados por un fisiopatólogo con experiencia en el estudio de estructuras histológicas gingivales.

**Análisis estadístico.** Para el desarrollo de los aspectos metodológicos se utilizó el *Software IBM SPSS Statistics 25*. Se realizó prueba de normalidad de distribución de datos mediante análisis gráficos, prueba de asimetría y curtosis, y ensayo de hipótesis a través de la prueba Shapiro-Wilk. Se declaró significancia si  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

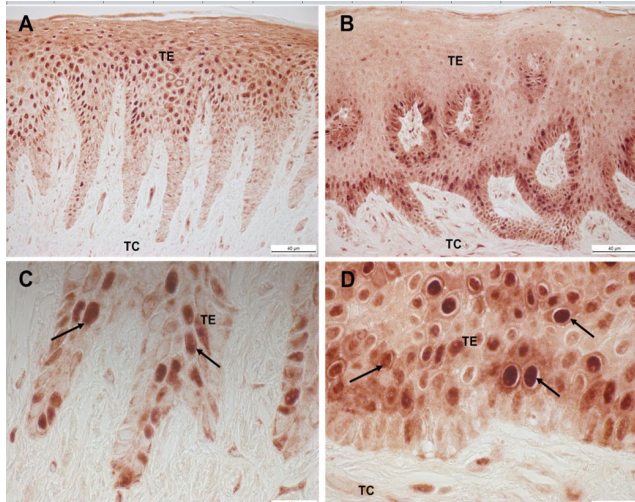
En la mayoría de los casos examinados se pudo constatar patrones de marcación heterogénea inmunohistoquímica de Ki-67. Este marcaje fue a nivel nuclear con variedad entre los grupos control y grupo estudio (Figura 1). En el grupo control se identificó un inmunomarcaje nuclear uniforme y puntiagudo, esencialmente a nivel de la capa basal del tejido epitelial (Figura 1, A,C).

En los pacientes del grupo estudio, el marcaje inmunohistoquímico de Ki-67 fue intenso a nivel nuclear y núcleo-citoplasmático. En este grupo se pudo verificar una inmunoreacción granular o difusa pero intensa de Ki-67, principalmente en el estrato basal. El grado de intensidad de Ki-67 fue similar en todas las muestras analizadas de pacientes con AGTO (Figura 1, B,D).



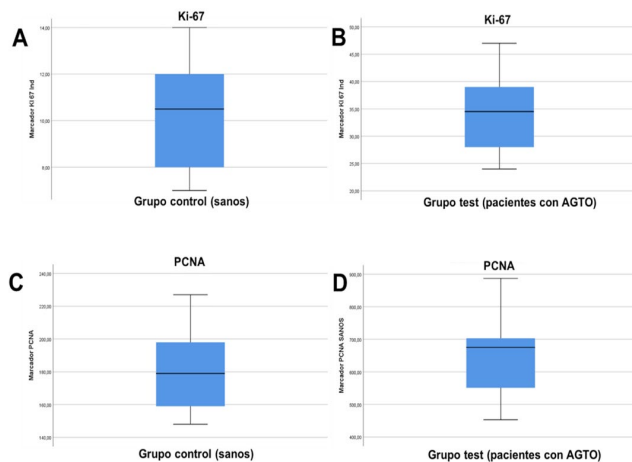
**Figura 1.** Detección inmunohistoquímica de Ki-67 en tejidos gingivales de individuos sanos (A,C) y tinción de Ki-67 en pacientes con agrandamiento gingival por ortodoncia (B,D). TE: tejido epitelial; TC: tejido conectivo. Barra negra: 40  $\mu$ m (A,B) y 10  $\mu$ m (C,D).

La expresión inmunohistoquímica del marcador de proliferación PCNA puso en evidencia una coloración de color marrón con distribución heterogénea en las capas epiteliales de las muestras de controles analizadas. Fue evidente constatar que las células positivas para PCNA se hallaban en el estrato basal pero también en el estrato espinoso de todos los sujetos del grupo control (Figura 2, A,C). Esta misma distribución se presentó de manera intensa en todas las muestras de pacientes con AGTO (Figura 2, B,D).



**Figura 2.** Localización inmunohistoquímica de PCNA en tejido epitelial de encías de individuos sanos (A,C) y paciente con agrandamiento gingival por ortodoncia (B,D). TE: tejido epitelial; TC: tejido conectivo. Barra negra: 40  $\mu$ m (A,B) y 10  $\mu$ m (C,D).

Una vez realizada la prueba de normalidad y verificada la distribución de datos a través de la prueba Shapiro-Wilk se pudo constatar una distribución no gaussiana de los datos. Por consiguiente, se decidió abordar el análisis mediante estadística no paramétrica, utilizándose el test U de Mann-Whitney para la comparación de medias en grupos independientes. Dicha prueba mostró diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las muestras en individuos sanos y los promedios de las muestras en pacientes con AGTO, tanto para el marcador Ki-67 ( $p=0,00$ ) como para PCNA ( $p=0,00$ ). Los resultados obtenidos de ambos marcadores de proliferación empleados en la presente investigación permitieron conocer el incremento en la tasa de proliferación de células epiteliales de las muestras de los pacientes con AGTO en comparación con las muestras analizadas pertenecientes al grupo control (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de caja basados en la diferencia de las muestras de tejido epitelial de encías de individuos sanos y paciente con agrandamiento gingival por ortodoncia con el marcador Ki-67 (A,B) y PCNA (C,D).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen en evidencia por primera vez la expresión inmunohistoquímica de marcadores de proliferación celular en pacientes con agrandamiento gingival asociado al tratamiento de ortodoncia. La comparación de los núcleos marcados con el antígeno Ki-67 entre las muestras del grupo control y del grupo con AGTO puso en evidencia una diferencia estadísticamente significativa. Esta diferencia también fue mostrada con el marcador de proliferación celular PCNA. Aunque la capacidad de proliferación de las células epiteliales no había sido establecida, en el presente trabajo de investigación se buscó identificar y evaluar el potencial proliferativo de las células del tejido epitelial a través del método inmunohistoquímico empleando dos marcadores específicos de diferentes etapas del ciclo celular.

El Ki-67 es el marcador de actividad celular proliferativa más empleado y utilizado en los últimos años. La evidencia científica indica que Ki-67 es una proteína nuclear presente en todas las fases del ciclo celular con excepción de la fase G0 y G1 temprana (10). El antígeno Ki-67 durante la fase del ciclo celular (interfase) es detectable únicamente dentro de los núcleos pero, durante la mitosis, esta proteína se sitúa en la superficie de los cromosomas celulares. Entretanto, los niveles de Ki-67 se reducen durante la anafase y la telofase (11). Estos aspectos bioquímicos del Ki-67 respaldarían los hallazgos reportados en el presente trabajo, donde se demostró un marcaje intenso y homogéneo en las muestras del grupo de células epiteliales tanto del grupo control como las provenientes de pacientes con AGTO. Si bien el índice proliferativo de Ki-67 ha sido empleado en otros procesos proliferativos como marcador pronóstico y predictivo, en la presente investigación el inmunomarcaje de Ki-67 en pacientes con AGTO no debería ser tomado como predictivo dado el número de muestras estudiadas. Ante ello, futuras investigaciones serán fundamentales para esclarecer el rol fisiopatológico de Ki-67 en pacientes con AGTO.

Así mismo, la evaluación inmunohistoquímica de Ki-67 es ampliamente conocida como biomarcador en la validación de una serie de procesos proliferativos malignos (13). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados histológicos evidenciados, los procesos celulares ocurridos en el AGTO son fuertemente compatibles con cambios celulares adaptativos de tipo hipertrófico e hiperplásico y no con procesos metaplásicos como los observados en los diferentes tipos de cáncer. En consecuencia, es menester señalar que posiblemente los cambios adaptativos del tejido epitelial pudiesen ser el resultado, entre otros, por el sometimiento constante a fuerzas de tracción ortodóntica, reacciones al níquel y el acumulo de biofilm bacteriano en los pacientes portadores de tratamiento de ortodoncia. (14)

Mediante el empleo del marcador PCNA, la presente investigación también pudo establecer las diferencias de las tasas de proliferación de las células del tejido epitelial en las muestras de individuos sanos en comparación con los

pacientes que presentaban AGTO. El PCNA es conocido por ser un marcador del ciclo celular, una proteína que se sintetiza en la fase S y se comporta como un homotrímero en solución. Así mismo, se ha demostrado que el PCNA suele ser un factor auxiliar para las polimerasas de replicación  $\delta$  y  $\epsilon$  (Pol  $\delta$  y Pol  $\epsilon$ ) incrementando su unión y deslizamiento a lo largo de la hélice de ADN de doble cadena (15). Los resultados evidenciados en la presente investigación destacan una diferencia estadísticamente significativa del marcaje de PCNA entre las muestras de tejido gingival de pacientes con AGTO comparada con las muestras analizadas del grupo control.

La función principal de PCNA es la replicación del ADN, sin dejar de lado las funciones en la replicación, control del ciclo celular, preservar y duplicar la estructura de la cromatina y establecer la cohesión de las cromatinas hermanas (16). En consecuencia, es altamente probable que las células epiteliales de tejido gingival analizadas tuvieron un promedio mayor de inmunomarcaje con PCNA debido a que esta proteína no sólo identifica las células que se encuentran en un proceso activo de división celular, sino que también permite reconocer las células que se encuentran en el proceso de replicación. Cambios morfológicos y daños en el ADN tanto *in vitro* como *in vivo* también han sido asociados con una mayor fosforilación de diferentes proteínas frente a la exposición con níquel (17). Ante ello, no descartamos que las células epiteliales de los pacientes con AGTO, dada la exposición mayor al níquel, sea el responsable de inducir inicialmente una inflamación y luego una fibrosis del tejido gingival durante el tratamiento de ortodoncia. Ante ello se hace necesario mediante futuros estudios experimentales *in vitro*, cuantificar la dosis-respuesta de células epiteliales frente a la exposición diferencial de níquel y la evaluación de diversos marcadores regulatorios como TGF- $\beta$ 1, fosfo-Smad2, COL1A1 y así como otras citocinas proinflamatorias y mediadores pro-fibróticos que contribuyan a esclarecer la fisiopatología del AGTO.

En conclusión, este estudio demostró que las muestras de encía de pacientes con agrandamiento gingival inducido por el tratamiento de ortodoncia presentaron una elevada tasa de proliferación de células epiteliales evaluadas mediante los antígenos Ki-67 y PCNA en comparación con muestras de encía de individuos sanos.

#### REFERENCIAS

- Alnazeh A, Kamran MA, Alshahrani I, Ali AH, Saad OM, Fahad A. Effect of fixed orthodontic appliance therapy on periodontal health status of patients evaluated through community periodontal index. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020; 34(3):1067-1070. <https://doi.org/10.23812/20-154-L-27>
- Almansob YA, Alhammadi MS, Luo XJ, Alhadj MN, Zhou L, Almansoub HA, Mao J. Comprehensive evaluation of factors that induce gingival enlargement during orthodontic treatment: A cross-sectional comparative study. *Niger J Clin Pract*. 2021; 24(11):1649-1655. [https://doi.org/10.4103/njcp.njcp\\_69\\_21](https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_69_21)
- Orozco PJ, Méndez RM, Rodríguez CE, Díaz CA, Méndez CD. Protein carbonylation associated with nickel liberation in orthodontic gingival overgrowth. *Arch Oral Biol*. 2021; 125:105103. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105103>
- Simancas EV, Lozada MA, Díaz A. Alteración del colágeno en la Hipertrofia Gingival en pacientes con ortodoncia: caracterización histológica e inmunohistoquímica. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud*. 2021; 53: e309. <https://doi.org/10.18273/saluduis.53.e:21007>
- Pascu EI, Pisoschi CG, Andrei AM, Munteanu MC, Rauten AM, Scricieiu M, Taisescu O, SurpăȚeanu M, BaniȚă IM. Heterogeneity of collagen secreting cells in gingival fibrosis-an immunohistochemical assessment and a review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2015; 56(1):49-61. <https://rjme.ro/archive/56/1/5/>
- Simancas EV, Carmona LM, Díaz CA. Immunolocalización de s100a4 y  $\alpha$ -sma en tejidos gingivales de pacientes con hipertrofia gingival por tratamiento ortodóntico: estudio preliminar. *Arch Med (Manizales)*. 2021; 21(1):24-34. <https://doi.org/10.30554/archmed.21.1.3693.2021>
- Liu L, Sun Q, Davis F, Mao J, Zhao H, Ma D. Epithelial-mesenchymal transition in organ fibrosis development: current understanding and treatment strategies. *Burns Trauma*. 2022; 10:tkac011. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkac011>
- Simancas EV, Leal BJ, Díaz CA. Expression of type III collagen in hypertrophic gingival tissue of patients with orthodontic treatment: a pilot study. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2020; 32(2): 53-63. <https://doi.org/10.17533/udea.rfo.v32n2a5>
- Martínez AM, Blanquicett AR, Villalobos IM, Hayashi M. Middle Superior Alveolar Technique: Efficacy in the Premolar Maxillary Region. *Compend Contin Educ Dent*. 2019; 40(5):e1-e6. [www.aegisdentalnetwork.com/cced/2019/05/middle-superior-alveolar-technique-efficacy-in-the-premolar-maxillary-region](https://www.aegisdentalnetwork.com/cced/2019/05/middle-superior-alveolar-technique-efficacy-in-the-premolar-maxillary-region)
- Andrés SN, Fisher D, Krasinska L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci*. 2022; 135(11):jcs258932. <https://doi.org/10.1242/jcs.258932>
- Davey MG, Hynes SO, Kerin MJ, Miller N, Lowery AJ. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(17):4455. <https://doi.org/10.3390/cancers13174455>
- Drăghici EC, CrăiȚoiu Ș, MercuȚ V, Scricieiu M, Popescu SM, Diaconu OA, Oprea B, Pascu RM, CrăiȚoiu MM. Local cause of gingival overgrowth. Clinical and histological study. *Rom J Morphol Embryol*. 2016; 57(2):427-35. <https://rjme.ro/RJME/resources/files/570216427435.pdf>
- Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, Vakili Saatloo M, Kouhsoltani M, Vahed N. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021; 15(1):66-75. <https://doi.org/10.34172/joddd.2021.012>
- Vincent-Bugnas S, Borsa L, Gruss A, Lupi L. Prioritization of predisposing factors of gingival hyperplasia during orthodontic treatment: the role of amount of biofilm. *BMC Oral Health*. 2021; 21(1):84. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01433-2>
- González MA, Blanco FJ. Human PCNA structure, function and interactions. *Biomolecules*. 2020; 10(4):570. <https://doi.org/10.3390/biom10040570>
- Arbel M, Choudhary K, Tfilin O, Kupiec M. PCNA Loaders and unloaders-One ring that rules them All. *Genes (Basel)*. 2021. [cited 2022]; 12(11):1812. <https://doi.org/10.3390/genes12111812>
- Mo Y, Zhang Y, Zhang Y, Yuan J, Mo L, Zhang Q. Nickel nanoparticle-induced cell transformation: involvement of DNA damage and DNA repair defect through HIF-1 $\alpha$ /miR-210/Rad52 pathway. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19(1):370. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01117-7>