

# *Hipertrofia gingival por ciclosporina: Estudio de los efectos del suero de los pacientes tratados con ciclosporina-A sobre los fibroblastos humanos in vitro*

J. Aubia, M. Nàcher, M. Mir, J. Puig Marí, A. Oliveras, J. Lloveras y J. Masramón

Servicio Nefrología. Hospital l'Esperança. Institut Municipal Investigació Mèdica (IMIM). Departamento Medicina. Universitat Autònoma. Barcelona.

## RESUMEN

*Uno de los efectos secundarios al tratamiento con ciclosporina-A (CsA) es la hipertrofia gingival, que consiste en una hiperplasia debida a la proliferación de fibroblastos de la encía y una fibrosis como consecuencia del aumento de la matriz extracelular. Para examinar los efectos de la CsA a nivel celular hemos estudiado la influencia de la droga, así como de los sueros de pacientes tratados con dicho inmunosupresor sobre la proliferación de fibroblastos in vitro. Los resultados se expresaron como Índice/40, que representa las veces que el suero problema estimula la captación de timidina respecto al suero normal cuando las células se incuban con un 40 % de suero. La CsA a concentraciones entre 1.200 y 4.800ug/ml inhibió la proliferación de los fibroblastos. Para un grupo de 15 pacientes con patologías renales diversas (IR), el Índice/40 fue de  $1,04 \pm 0,1$  y de  $0,90 \pm 0,14$  después de 48 y 96 horas de incubación respectivamente. Para un grupo de 23 pacientes tratados con CsA, el Índice/40 fue de  $0,89 \pm 0,15$  ( $p < 0,05$ ) y de  $0,77 \pm 0,35$  ( $p < 0,05$ ) después de 48 y 96 horas de incubación, respectivamente. No se observaron diferencias en cuanto a estimulación fibroblástica entre los grupos con diferente grado de hipertrofia gingival y tampoco se encontró correlación entre los niveles sanguíneos de CsA y la proliferación fibroblástica. Se concluye que el suero de pacientes tratados con CsA induce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular mayor que el inducido por este inmunosupresor a las mismas concentraciones que las presentes en el suero, por lo que se deben buscar otros factores que puedan justificar la inhibición encontrada.*

Palabras clave: **Cultivo de fibroblastos. Hipertrofia gingival. Ciclosporina-A.**

Recibido: 8-II-93.

En versión definitiva: 7-VII-93.

Aceptado: 9-VII-93.

Correspondencia: Dr. J. Aubia.

Servei Nefrologia Hospital de l'Esperança.

S. Josep de la Muntanya, 12.

08024 Barcelona.

## GINGIVAL HYPERTROPHY AND CYCLOSPORIN. EFFECT OF SERA FROM TREATED PATIENTS ON FIBROBLAST PROLIFERATION

### SUMMARY

*One of the secondary effects of Cyclosporin-A (CsA) treatment is gingival hypertrophy. This lesion consists of a hyperplasia due to fibroblast proliferation of gingival connective tissue and to fibrosis as a consequence of an increase of the extracellular matrix. To examine the CSA effects at cell level we have studied the influence of the drug as well as that of the sera from patients treated with this immunosuppressor, on fibroblast proliferation in vitro. The results were expressed as Index/40 representing the times that the problem serum stimulates the thymidine uptake versus the normal serum when cells are incubated with 40 % of sera. CsA concentrations between 7,200 and 4,800 ug/m/ inhibited fibroblast proliferation. For a 15 patient group with various renal pathologies (IR) the Index/40 was  $1.04 \pm 0.1$  and  $0.90 \pm 0.14$  after 48 and 96 incubation hours respectively. For 23 CsA treated patient (CsA) the Index/40 was  $0.89 \pm 0.75$  ( $p < 0.05$ ) and  $0.77 \pm 0.35$  ( $p < 0,05$ ) after 48 and 96 incubation hours respectively. No differences were observed in fibroblast stimulation in the groups with different grade5 of gingival hypertrophy and no correlation was found in the CsA levels and fibroblast proliferation. We conclude that the sera from the CsA treated patients induce a higher inhibitory effect on cellular proliferation than that induced by this immunosuppressor at the same concentrations as the ones present in the sera. Consequently, other factors that could explain the inhibition we observed should be investigated.*

Key words: **Fibroblast culture. Gingival hypertrophy. Cyclosporin-A.**

### Introducción

Uno de los efectos adversos de la utilización de la ciclosporina-A (CsA) es la hipertrofia gingival (HG) que aparece en grados de diversa intensidad en una proporción variable de los pacientes trasplantados renales que reciben CsA de forma crónica<sup>1,2</sup>, que puede llegar hasta el 70 % de los mismos. Existe una cantidad limitada de estudios sobre la fisiopatología de este fenómeno y, por tanto, su mecanismo exacto no está establecido. La lesión consiste básicamente en la fibroplasia del tejido conectivo de la encía por la proliferación de fibroblastos (hiperplasia) y por el aumento de la matriz (fibrosis). Esta última puede ser consecuencia a su vez de una síntesis celular exagerada de estas sustancias o bien ser debida a una inhibición de los procesos fisiológicos de degradación que también son realizados por los fibroblastos.

Esta patología gingival no solamente produce un problema estético más o menos importante sino que en algunos casos llega a provocar graves problemas funcionales en la masticación. En nuestra experiencia este problema ha comportado que algunos pacientes hayan intentado abandonar la medicación inmunosupresora. En un porcentaje importante de estos pacientes se ha debido recurrir a la cirugía correctora, y además recientemente se ha demostrado que puede ser una lesión potencialmente cancerígena<sup>3</sup> por tanto,

el conocimiento de su fisiopatología tiene un interés evidente.

En los meses recientes hemos desarrollado un método de cultivo de fibroblastos humanos, sobre el que hemos desarrollado métodos de medida para ver la capacidad de diversos sueros de inducir respuestas proliferativas sobre estos cultivos de fibroblastos y sobre las otras funciones celulares. Algunos de los sueros que hemos podido estudiar eran de pacientes trasplantados renales que estaban en tratamiento con CsA, y, por tanto, esto nos ha permitido observar esta respuesta como una fórmula original para avanzar en el estudio de la fisiopatología de la hipertrofia gingival secundaria a la CsA. Hasta ahora se habían publicado algunos trabajos que han estudiado la capacidad de inducir proliferación en los cultivos, pero utilizando la CsA directamente sobre el cultivo, y con resultados muy divergentes, cuando no contradictorios, entre sí<sup>4,5</sup>. Nosotros hemos creído que en la fisiopatología de este trastorno la CsA no debe actuar aisladamente, sino en relación con otros factores (metabolitos intermedios, citoquinas efectoras, etc.), y por ello decidimos estudiar si los efectos de la CsA podían observarse investigando la influencia de los sueros de los pacientes bajo tratamiento con CsA, en los cuales existen diversos factores de crecimiento capaces de influir sobre la mitogenicidad del fibroblasto, que a su vez podrían estar alterados por los efectos de la CsA o por sus metabolitos. Pre-

sentamos a continuación los resultados de este modelo experimental.

## Material y métodos

Veintiún pacientes trasplantados renales y dos pacientes con nefropatías glomerulares que estaban en tratamiento con CsA entraron en el estudio. Se obtenían 10 cc de sangre de los pacientes cuando acudían al laboratorio para su analítica de rutina y el suero se congelaba después de centrifugar hasta su utilización en el cultivo celular. La edad media de los pacientes era de 43,1 años (28-61). De ellos, nueve (**37 %**) tenían una hipertrofia gingival muy evidente (> un tercio de la corona) y con repercusión funcional en la masticación (grado 3 de McGaw<sup>6</sup>); en 10 casos, las encías se consideraron normales o con una hinchazón simple del borde gingival (grado 1). En los cuatro casos restantes era apreciable una hipertrofia, pero de intensidad moderada y sin repercusión funcional (<un tercio de la corona: grado 2). Estos pacientes habían estado bajo tratamiento con CsA durante 42 meses de media (de 6 a 70). Los niveles sanguíneos de CsA en sangre completa fueron de  $194 \pm 13$  ug/ml determinados por radioinmunoensayo con anticuerpo monoclonal (Inmunonuclear); el rango terapéutico buscado había sido de alrededor de 150 ug/ml. En el grupo control se ha incluido un grupo de 15 pacientes no diabéticos con patologías renales diversas (dos glomerulares, dos con poliquistosis, seis con probable nefroangiosclerosis benigna y cinco con nefropatías intersticiales) que estuviesen en un rango de edad parecido y que tuviesen un grado de insuficiencia renal también comparable (edad CsA:  $43 \pm 11$  años, IR= $50 \pm 14$ ; creatinina CsA,  $2,22 \pm 0,97$  mg/dl, IR =  $2,45 \pm 1,52$  mg/dl). Para las normalidades se ha utilizado un pool constituido por sueros de 25 sujetos normales.

### Cultivo de fibroblastos

Los fibroblastos son obtenidos a partir de biopsias de piel humana de dos adultos sin desórdenes metabólicos de 17 y 55 años de edad. El motivo de la biopsia de piel fue la escisión de nevus. Las muestras de piel normal se cortan en explantes de 1 o 2 mm aproximadamente y se transfieren a frasco de cultivo de 50 mL (Cell Cut). Se incuban en medio MEM con penicilina y estreptomycinina (100 UI/mL y 100 ug/mL, respectivamente) y suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal (Biological Industries, Beth Haemek, Israel). Los frascos son mantenidos a 37° C en atmósfera húmeda con un 5 % de CO y se dejan incubar durante dos o tres semanas, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana, hasta que los fibroblastos han migrado a partir del tejido y el frasco es confluyente.

Se realizan sucesivos subcultivos de las células en proporción 1:4. Se han utilizado fibroblastos entre los subcultivos cuatro y diez de las dos líneas celulares (cada línea celular proviene de un sujeto del que se extrajo la muestra de piel), una de las cuales se utilizó para los experimentos con CsA y otra para los experimentos con sueros de enfermos en tratamiento con este inmunosupresor. Previamente se comprobó que el tiempo de duplicación era comparable.

### Captación de timidina marcada

Se ha realizado de acuerdo con el método de Madson y cols.<sup>7</sup> con algunas modificaciones propias. Se tripsinizan (Difco Laboratories, Detroit, MI) los fibroblastos y se distribuyen en placas para cultivo de células de 96 pocillos (Nunc, Copenhagen) a una densidad de 5.000 células/pocillo y se incuban con medio MEM suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal y con penicilina y estreptomycinina durante 24 horas. Se cambia el medio de cultivo y se añade medio MEM sin suero y se incuba 48 horas más. Se aspira el medio y se añade medio frasco con triplicados de las diferentes diluciones de los sueros a estudio, así como unos pocillos con medio sin suero. Se incuban durante 48 o 96 horas, añadiéndose durante las últimas 24 horas 1 µCi/mL de timidina tritiada (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra, 44 Ci/mmol). Se aspira el medio de cultivo y gracias a un Cell Harvester se lavan las células con ácido acético al 2,5 % y se tratan con tritón X-100, tras lo cual se recogen en filtros de fibra de vidrio que se depositaron en viales de centelleo y se contaron en un contador de centelleo sólido como dpm/pocillo. La capacidad de estimulación del suero problema comparado con un pool de sueros de sujetos normales se expresa como Índice/20 o Índice/40, que representa las veces que el suero problema estimula la captación de timidina tritiada respecto al suero normal. Para valorar esta actividad mitogénica de los diversos sueros tanto de pacientes en CsA como de insuficientes renales-contrales y de normalidades hemos escogido representarla como la proporción entre la captación de timidina en el cultivo sin suero y las captaciones después de añadir suero problema al 20-40 %. Esta proporción se expresa como un Índice entre las captaciones inducidas por los sueros problema y las inducidas en este mismo experimento por los sueros normales. Así, un Índice/20 igual a uno significa que el suero problema añadido al cultivo celular a una concentración final del 20 % produce una estimulación igual a la inducida por el suero normal.

**Cálculos estadísticos:** En Statview®, comparación entre grupos: Test Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, t independiente comparación entre normales y CsA, regresión lineal simple, significación inferior al 5 %.

**Resultados**

En la primera serie de experimentos se incubaron los fibroblastos en presencia de cantidades progresivas de CsA, desde 75 ug/ml hasta 4.800 ug/ml, para ver el efecto directo de la CsA sobre la capacidad de proliferación. En la figura 1 no observamos ninguna estimulación inducida por la CsA, sino que, por el contrario, hay una inhibición de la misma que se observa cuando se incrementan las concentraciones.

Cuando un cultivo de células fibroblásticas se enfrenta al suero normal se produce una estimulación en la captación de timidina-<sup>3</sup>H, que es proporcional a la concentración de suero en el medio de cultivo a consecuencia de la presencia en el mismo de factores de crecimiento. En la figura 2 se puede observar este fenómeno. En la figura 3 se representa el efecto combinado del suero humano normal al 20 % y la presencia de CsA a las mismas concentraciones que en el experimento anterior. Se observa que, a pesar del aumento de los valores de captación -en ordenadas-, que han pasado de valores alrededor de 1.000 a 60.000 dpm/pocillo, la CsA sigue siendo capaz de producir una inhibición de las captaciones cuando se añade a altas concentraciones en las incubaciones de 96 horas.

En la figura 4 se puede observar que los valores del Índice/40 a las 48 y a las 96 horas en los tres grupos de sueros mostraron diferencias significativas entre pacientes tomando CsA, insuficientes renales de control y sueros normales: Índice/40 a las 48 horas de incubación CsA = 0,89 ± 0,15, en IR = 1,04 ± 0,19; p < 0,05; a las 96 horas CsA=0,77 ± 0,35, en IR = 0,9 ± 0,14, p < 0,05.

Los niveles plasmáticos de CsA en el grupo de estudio fueron de 194 ± 53 ug/ml y, por tanto, en un rango de concentración en que los efectos directos de la CsA serían indetectables. Se debe concluir, por tanto, que el suero de los pacientes en tratamiento con CsA parecen poder inducir un efecto más evidente que el que se consigue por la simple presencia de la droga en el cultivo. Pero estos efectos no han sido de estimulación de la proliferación fibroblástica, sino de inhibición de la misma.

Cuando se clasificó a los pacientes según el grado de hipertrofia gingival, no se pudo observar que entre los grupos con mayor y menor hipertrofia hubiese diferencias significativas en los índices de estimulación fibroblástica. Tampoco pudieron obtenerse correlaciones significativas entre niveles sanguíneos de CsA y los valores del índice de estimulación.

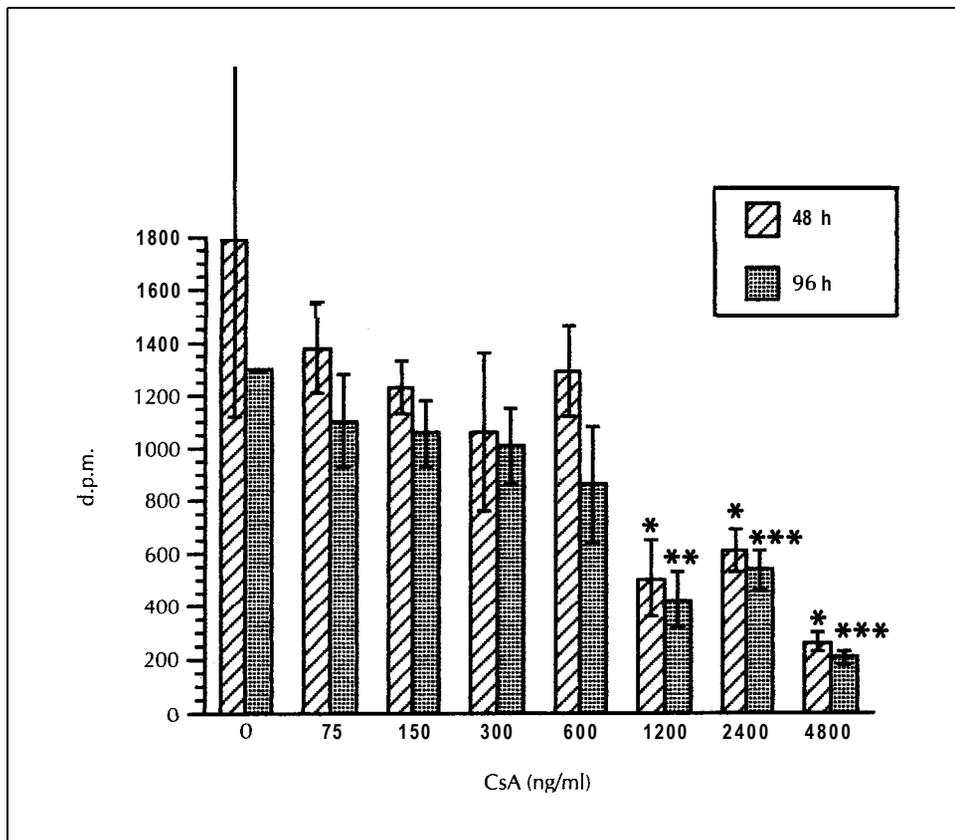


Fig. 1.-Captación de timidina tritiada por parte de fibroblastos en presencia de diferentes concentraciones de CsA y a diferentes tiempos de incubación (48 y 96 horas). A partir de concentraciones de 1.200 ug/ml se observa un descenso significativo de los valores de captación de timidina respecto a los valores basales. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001.

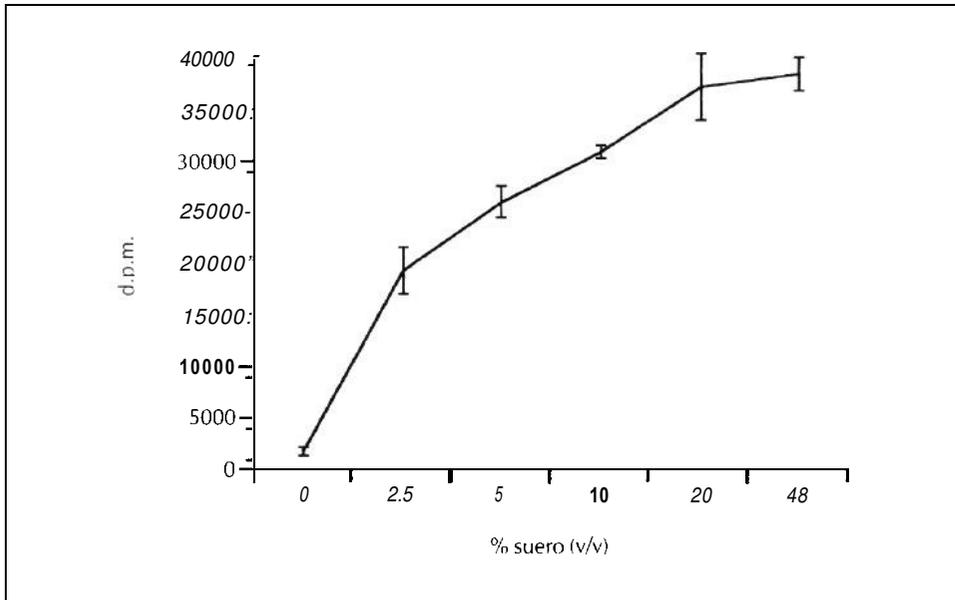


Fig. 2.-Estimulación de la captación de timidina tritiada en fibroblastos incubados durante 48 horas en presencia de suero humano normal.

**Discusión**

Las publicaciones del efecto de la CsA sobre los cultivos de fibroblastos *in vitro* han dado en algunas series resultados que muestran una estimulación en la proliferación de fibroblastos tanto de origen gingival como de piel a diversas concentraciones de CsA, pero con intensidades de respuesta muy heterogéneas<sup>8</sup>. En algunos modelos, la respuesta a la CsA es de estimulación<sup>9</sup>; pero en otros, como en el nuestro, la respuesta fibroblástica es de inhibición de la proliferación<sup>10</sup>. Se había

sugerido que estas diferencias pudiesen depender de las concentraciones de CsA, de la duración del estímulo, del origen celular o de otros factores genéticos no conocidos de las células cultivadas, y a pesar de que en algunos de los modelos publicados estas variables se han intentado controlar, se debe convenir que muchos factores que deben ser operativos en la fisiopatología humana no son conocidos y, por tanto, no pueden individualizarse. El trabajo de Bartold<sup>8</sup> muestra una respuesta estimuladora de la proliferación, pero que sólo es evidente a concentraciones más de 1 .000 veces su-

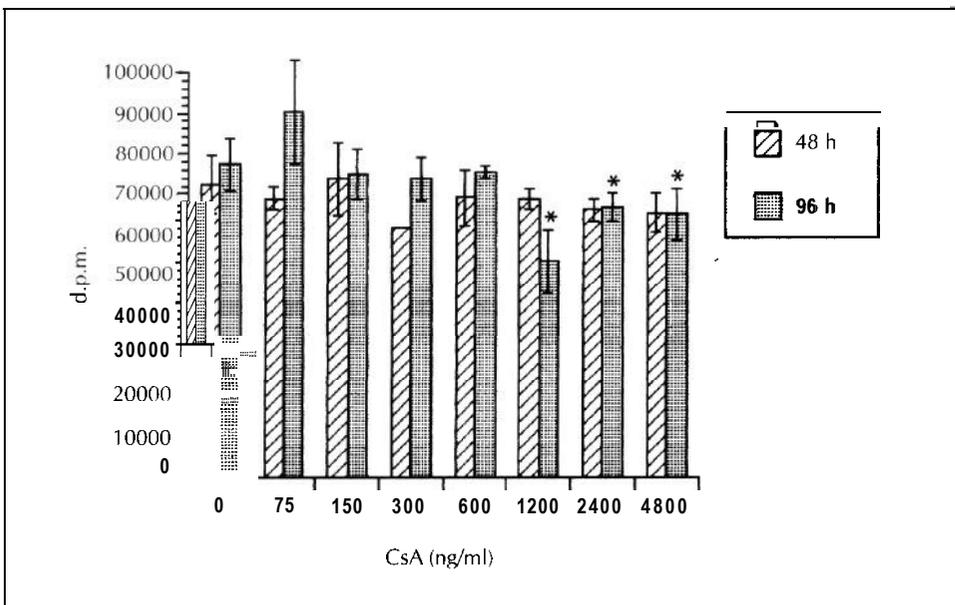


Fig. 3.—Captación de timidina tritiada por parte de fibroblastos incubados en presencia de suero humano normal al 20 % y concentraciones crecientes de CsA. Se observa una inhibición significativa a partir de concentraciones superiores a 1.200 ug/ml durante 96 horas de incubación. \*p < 0,05

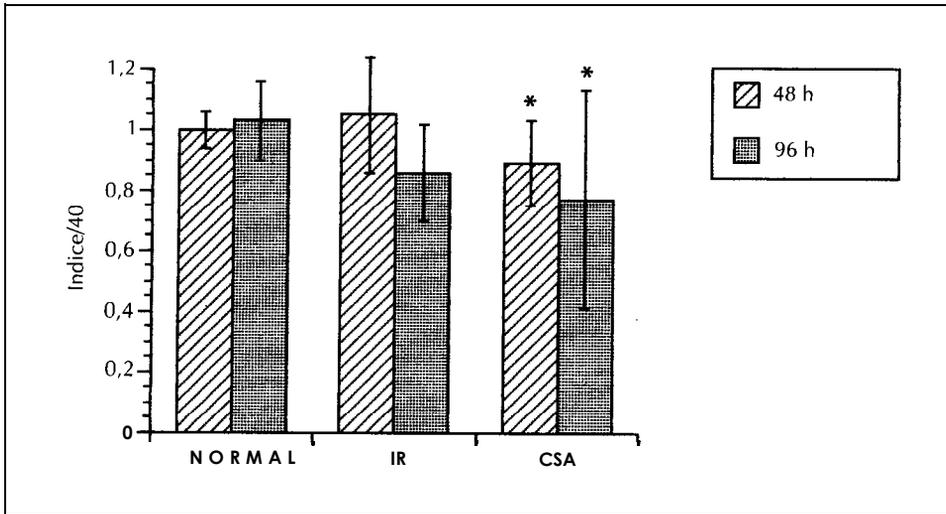


Fig. 4.-Captación de timidina tritiada en presencia de sueros de enfermos con insuficiencia renal (n = 15) y de trasplantados en tratamiento con CsA (n = 23) a una concentración del 40 %. Los resultados muestran una inhibición significativa medida como Índice/40 de la proliferación respecto al suero normal. \*p < 0,05.

periores a los niveles terapéuticos. Hassell <sup>11</sup> presenta evidencias experimentales que muestran que en el curso de la inflamación pudieran actuar sobre los fibroblastos moléculas efectoras intermedias secretadas por los linfocitos. Estos factores actuarían activando la proliferación de algunos fibroblastos y la síntesis de colágena. No se conocen estos factores, pero se sabe que algunos fibroblastos tienen receptores para la interleukina-1 <sup>12</sup> que es capaz de acelerar *in vitro* la síntesis de colágena y regular la proliferación celular de fibroblastos, y que es bien sabido que está bajo la influencia de la CsA. Sin embargo, otros autores han demostrado que la distribución o la intensidad de la IL-1 en el tejido gingival determinada por histoquímica no es diferente en la hiperplasia por CsA de la que se observa en otras patologías, como la inflamación inespecífica o la inducida por hindantoínas <sup>13</sup>, y por tanto su papel sería poco relevante.

Parecía evidente, por tanto, que un modelo experimental útil en este problema pudiera ser el que nosotros proponemos, consistente en enfrentar los cultivos de fibroblastos humanos, no a la CsA aislada ni a la CsA asociada a algunos factores concretos y conocidos, sino enfrentarlos al suero total de pacientes trasplantados tratados con CsA, presenten o no hipertrofia gingival, para intentar cuantificar la respuesta global que en estas circunstancias se produce comparada con la respuesta del suero normal de sujetos sin CsA. Somos conscientes de que las condiciones en la sangre periférica (en el suero) no tienen por qué ser equivalentes a la situación en la encía, donde pueden existir otros factores locales relacionados con la inflamación y donde la capacidad del tejido gingival de acumular CsA <sup>19</sup> puede modular la respuesta; sin embargo, creíamos que este modelo podía aportar elementos para avanzar en el conocimiento de este trastorno. Además se debe recordar que el efecto inductor de fibrosis provocado por

la CsA parece no ocurrir sólo en las encías, sino que se han descrito fibrosis en el corazón y en el propio riñón de los pacientes en tratamiento con CsA <sup>14,15</sup> que pudieran tener una patogenia común, por lo que la cuantificación de la capacidad del suero de los pacientes trasplantados en inducir proliferación fibroblástica pudiera ser de interés también en estas patologías. Por este motivo no se escogieron fibroblastos de origen gingival, sino fibroblastos cutáneos normales. La capacidad de inducir *in vitro* proliferación en los fibroblastos puede estar alterada en la insuficiencia renal <sup>16,17</sup>, que todos nuestros pacientes presentaban en un cierto grado. Por ello escogimos un grupo control con un grado de insuficiencia renal similar al del grupo con CsA.

La lesión predominante en la hipertrofia gingival (HG) inducida por la CsA es la hiperplasia fibroepitelial, cuyos componentes son la proliferación de fibroblastos, los infiltrados de células inflamatorias y la presencia de hiperplasia epitelial. La interrelación entre estos tres tipos de células y su relación con los efectos de la CsA son motivo de controversia. Existen otros medicamentos que pueden también provocar hiperplasia gingival como la difenilhidantoína, o la nifedipina. Pero según algunos autores, la CsA produce una hipertrofia con características morfológicas específicas <sup>18</sup>, sobre todo en la estructura celular de los fibroblastos que presentan organizaciones fibrilares que los asemejan a los miofibroblastos.

Los fibroblastos de la HG de la CsA parecen tener una capacidad fagocítica disminuida sobre la colágena si se compara con los fibroblastos de otras situaciones inflamatorias <sup>6</sup>. Tipton <sup>19</sup> encuentra también efectos inhibidores de la CsA en la actividad de la colagenasa de los fibroblastos gingivales de la mayoría de sus cultivos, si bien sus respuestas son muy heterogéneas según el origen de las células. Esta inhibición podría explicar

los efectos de la CsA sobre el acúmulo de colágena y de otros componentes de la matriz. Además, si la patología del fibroblasto consistiese en esta inhibición funcional, se explicaría el porqué la HG suele ser más evidente en las situaciones con procesos inflamatorios gingivales asociados. Algunos autores parecen hallar correlación entre HG y la presencia o la intensidad de patologías inflamatorias de la placa dentaria <sup>20</sup>. Sin embargo, en un estudio reciente, el control preventivo de dicha placa dentaria, aunque disminuyó la intensidad de las manifestaciones inflamatorias, no pudo evitar la aparición de hipertrofia gingival en una proporción significativa de pacientes trasplantados con CsA <sup>21</sup>.

Nuestros datos demuestran que la CsA a altas concentraciones puede producir una inhibición fibroblástica, pero también demuestran que los sueros de los pacientes en tratamiento, a pesar de que sus concentraciones son menores (dentro del rango terapéutico), parecen inducir también una inhibición de los fibroblastos. En nuestra opinión, nuestros datos son un sólido apoyo a la hipótesis de que los efectos de la CsA sobre los fibroblastos podrían ser el resultado de la inhibición funcional de los mismos y no contradicen los supuestos estímulos proliferativos.

Sean cuales sean los otros factores locales operativos en la HG que pudiesen determinar los efectos de la CsA, son hoy por hoy desconocidos y se requieren más investigaciones para su detección.

## Nota

«Este trabajo ha sido realizado con ayuda FISS (nº. 90/0617) de la que Monserrat Nácher es becaria»

## Bibliografía

1. Wysocki GP, Cretzinger HA, Laupacis A, Ulan RA y Stiller CR: Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg Ora/ Med Ora/ Pathol*, 55 (3):274-278, mar, 1983.
2. Adams D y Davies G: Gingival hyperplasia associated with cyclosporin A. A report of two cases. *Br Dent J* 175 (3):89-90, 1984.
3. Qunibi WY, Akhtar M, Ginn E y Smith P: Kaposi's sarcoma in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Am J Kidney Dis* 11 :349-352, 1988.
4. Coley C, Jarvis K y Hassel T: Effect of Cyclosporine-A on human gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 65:353, 1986.
5. Zebroski EJ, Singer DL y Brunka JR: Cyclosporin-A, nifedipine and phentoin: comparative effects on gingival fibroblast metabolism. *J Dent Res* 65:331, 1986.
6. McGraw WT y Porter H: Cyclosporine induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. *Ora/ Surg Ora/ Med Ora/ Pathol* 65:186-190, 1988.
7. Madsen K, Friberg U, Roos P, Eden S e Isaksson O: Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature* 304:454-457, 1983.
8. Bartold PM: Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodont Res* 24:314-321, 1989.
9. Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G: Einfluss von Cyclosporin A(CYA) auf wachstum und stoffwechselaktivität von gingivafibroblasten. *Schweiz-Monatschr-Zahnmed* 101 :18-23, 1991.
10. Ono M, Hatamochi A, Arakawa M v Euki H; Effects of cyclosporin. A on cell proliferation and collagen production by human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2:274-280, 1991.
11. Hassell TM, Romberg E, Sbhani S, Lesko L y Douglas R: Lymphocyte-mediated effects of cyclosporine on human fibroblasts. *Transplant-Proc* 20 (3 suppl. 3):993-1 002, 1988.
12. Dower S, Kronheim S y Mardi C: *J Dent Res* 67:273, 1988.
13. Niimi A, Tohnai T, Kaneda T, Takeuchi M y Nagura H: Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin A on gingival epithelium. *J Oral Pathol Med* 19:397-403, 1990.
14. Klintmalm G, Bohman SO, Sundelin B y Wilczek H: Interstitial fibrosis in renal allografts after 12 to 46 months of cyclosporin treatment: beneficial effect of low doses in early post-transplantation period. *Lancet* 2:950-954, 1984.
15. Ruiz P, Kolbeck PC, Scroggs MW y Sanfilippo F: Associations between cyclosporine therapy and interstitial fibrosis in renal allograft biopsies. *Transplantation* 45:91-95, 1988.
16. Delaporte C, Gros F, Jonsson C y Bergstrom J: In vitro cytotoxic properties of plasma fractions from uremic patients. *Artif Organs* 4(S):68-70, 1981.
17. Ehrlich K, Holland F, Turnham T y Klein E: Osmotic concentration of polypeptides from hemofiltrate of uremic patients. *Clin Nephro* 14:31-35, 1980.
18. Yamasaki A, Rose CG, Pinero CJ y Mahan CJ: Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Ora/ Pathol* 16:129-134, 1987.
19. Tipton D, Stricklin G y Dabbous M: Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 46:152-165, 1991.
20. McCraw T, Lam S y Coates J: Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporin levels in serum and saliva. *Ora/ Sum Oral kted Ora/ Paiho* 64:293-297, 1987.
21. Seymour RA y Smith DC: The effect of a plaque control program on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J Clin Periodonto* 18:107-110, 1991.