

DPTO. DE ANATOMIA PATOLOGICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

HIPERPLASIA GINGIVAL INDUCIDA POR  
*CICLOSPORINA A* EN TRANSPLANTADOS  
RENALES. ESTUDIO CLINICO, MORFOMETRICO  
INMUNOHISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL.

TESIS DOCTORAL

*Francisco Luis Mesa Aguado*

1992



DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA E  
HISTORIA DE LA CIENCIA  
Facultad de Medicina  
18012-GRANADA

Anatomía Patológica Tels.: 24 35 09  
24 35 10  
24 35 11  
H.<sup>a</sup> de la Medicina Tels.: (958) 24 35 12  
24 35 13

D. JOSE ANEIROS CACHAZA, CATEDRATICO DE ANATOMIA  
PATOLOGICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR DE LA FACULTAD  
DE ODONTOLOGIA DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta D. FRANCISCO LUIS  
MESA AGUADO, titulada "Hiperplasia gingival inducida por  
ciclosporina A en trasplantados renales. Estudio clínico,  
morfométrico, inmunohistoquímico y ultraestructural" ha sido  
realizada bajo mi dirección y que, revisada la misma, la  
encuentro conforme para ser juzgada por el tribunal correspon-  
diente.

Granada, Noviembre de 1992

Fdo: Prof. José Aneiros Cachaza.



DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA E  
HISTORIA DE LA CIENCIA  
Facultad de Medicina  
18012-GRANADA

Anatomía Patológica Tels.: 24 35 09  
24 35 10  
24 35 11  
H.ª de la Medicina Tels.: (958) 24 35 12  
24 35 13

D. FRANCISCO JAVIER O'VALLE RAVASSA, PROFESOR TITULAR  
INTERINO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA E HISTORIA DE  
LA CIENCIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta D. FRANCISCO LUIS  
MESA AGUADO, titulada "Hiperplasia gingival inducida por  
ciclosporina A en trasplantados renales. Estudio clínico,  
morfométrico, inmunohistoquímico y ultraestructural" ha sido  
realizada bajo mi dirección y que, revisada la misma, la  
encuentro conforme para ser juzgada por el tribunal correspon-  
diente.

Granada, Noviembre de 1992

Fdo: Prof. Francisco Javier O'Valle Ravassa.

*A Conchi, Ana M<sup>a</sup>, Laura  
Isabel, M<sup>a</sup>José.*

*A mis padres y hermanos.*

AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

Al terminar este trabajo, deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización del mismo, y en especial:

Al prof. D. José Aneiros Cachaza, director de esta tesis, que me ha ayudado a entender la patología de las lesiones hiperplásicas de la encía que él también conoce, su incondicional ayuda e ilusión por el trabajo me ha permitido aumentar mis conocimientos e interés por esta parte de la medicina.

Al Prof. D. Francisco O'Valle Ravassa, director de esta tesis, por haber compartido conmigo sus conocimientos, experiencia y tiempo " que no ha sido poco" para el desarrollo de una labor bien hecha, por su crítica siempre constructiva y su enseñanza que se ha extendido más allá de esta tesis y por su ilusión e infatigable capacidad de trabajo vertido en la misma.

Al Prof. D. Raimundo García del Moral, que desde un principio me orientó y asesoró sobre la realización del trabajo, por su ayuda imprescindible en partes del mismo y por sus consejos, que me han servido en otros aspectos de mi relación con él.

Al Dr. Antonio Montes que siempre me prestó su colaboración y conocimiento en tratar a un grupo de pacientes especiales como son los enfermos trasplantados de riñón.

A todo el Departamento de Anatomía Patológica, desde médicos, en especial la Dr<sup>a</sup> Caracuel, técnicos de laboratorio: Sra. D<sup>a</sup> Purificación Alfaro, Sra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez, y Sra. D<sup>a</sup> Francisca Sáez, administrativos, por su ayuda siempre amable y desinteresada.

A mi mujer, Concepción López Leyva, médico estomatólogo, que desde un primer momento hizo suya también esta labor, dándole prioridad y sacrificando otros aspectos, por su ayuda y comprensión prestada en todo momento, no sólo material sino también moral, para finalizar este trabajo.

A mis compañeros de Servicio en la Facultad de Odontología, Dr. Francisco Medina, Dr. Juan Gijón y Dr. Gerardo Moreu.

A la Srta. Inmaculada Morillas Puente, fotógrafa de la Facultad de Odontología, por su trabajo, paciencia y disponibilidad para obtener un buen material fotográfico.

A las asociaciones de trasplantados renales de Granada, ADER y ALCER que desde un principio vieron la utilidad del trabajo y prestaron su más firme apoyo.

A los Laboratorios Sandoz Pharma Sae, que nos ha cedido el AcMo anticiclosporina, utilizado para la determinación intralesional del fármaco.

y en general mi agradecimiento a todos, los mencionados y los no.....

INDICE



I.	INTRODUCCION.....	1
I-1.	GENERALIDADES.....	1
I-2.	LA CICLOSPORINA A.....	1
	I-2.1. DESCRIPCION QUIMICA.....	3
	I-2.2. FARMACOCINETICA.....	5
	I-2.2.1. ABSOCION.....	5
	I-2.2.1,1. Via oral.....	5
	I-2.2.1,2. Via intramuscular.....	7
	I-2.2.1,3. Via intavnosaa.....	7
	I-2.2.2. DISTRIBUCION.....	7
	I-2.2.3. METABOLISMO.....	8
	I-2.2.4. EXCRECION.....	10
I-3.	RESPUESTA INMUNE FRENTE A INJERTOS.....	11
	I-3.1. MECANISMO CELULAR.....	12
	I-3.2. RESPUESTA HUMORAL.....	14
I-4.	MECANISMO DE ACCION DE LA CsA.....	15
	I-4.1. Mecanismo de acción de la CsA como inmunosupresor.....	15
I-5.	EMPLEO DE LA CsA EN TRASPLANTES.....	21
I-6.	MONITORIZACION DEL TRATAMIENTO CON CsA.....	24
I-7.	REACCIONES ADVERSAS.....	26
I-8.	CLASIFICACION DE LOS AGRANDAMIENTOS GINGIVALES.....	27
I-9.	MODELO EXPERIMENTAL DE INDUCCION DE HIPERPLASIA GINGIVAL.....	42
I-10.	INTRODUCCION GENERAL AL ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES. ANALISIS DE IMAGENES DIGITALIZADAS, FUNDAMENTOS BASICOS SOBRE DIGITALIZACION Y TRATAMIENTO DE IMAGENES.....	44
	I-10.1. ADQUISICION DE IMAGENES.....	44
	I-10.2. DIGITALIZACION DE LA IMAGEN.....	45
	I-10.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE LAS IMAGENES..	46
	I-10.3.1. Técnicas de análisis de imagen mediante operadores puntuales.....	46
	I-10.3.2. Técnicas de análisis de imagen mediante operadores locales.....	47
	I-10.3.3. Técnicas de análisis de imagen mediante operadores globales.....	48
	I-10.4. SEGMENTACION Y CLASIFICACION DE LA IMAGEN.....	48
	I-10.5. PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN BINARIA.....	49
	I-10.6. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS ANALITICOS...	49

I-11. ESTUDIO INMUNOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO DE SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS.....	51
I-11.1. Grupos de diferenciación de leucocitos humanos (CD).....	52
I-11.1.1. Grupo de diferenciación de células T.....	52
I-11.1.2. Grupo de diferenciación de células B.....	53
I-11.1.3. Grupo de diferenciación de linaje no específico. ....	53
I-11.1.4. Grupo de diferenciación de linaje específico.....	53
I-11.1.5. Grupo de antígenos de activación.....	54
I-12. ESTUDIO CON AcMo DE BIOPSIAS GINGIVALES DE ENFERMOS TRATADOS CON CSA.....	55
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	58
III. PACIENTES MATERIAL Y METODOS.....	60
III.1. PACIENTES.....	60
III.2. MATERIAL Y METODOS.....	61
III-2.1. PROTOCOLO CLINICO.....	61
III-2.2. PROTOCOLO ODONTOLOGICO. ....	61
III-2.2.1. INDICE DE PLACA.....	61
III-2.2.2. INDICE GINGIVAL.....	63
III-2.2.3. SESION DE PROFILAXIS.....	64
III-2.2.4. GINGIVECTOMIA.....	65
III-2.3. PROTOCOLO HISTOLOGICO.....	66
III-2.3.1. ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO.....	67
III-2.3.1,1. TECNICAS CONVENCIONALES DE MICROSCOPIA OPTICA.....	67
III-2.3.1,2. TECNICA DE CONGELACION Y OBTENCION DE SECCIONES CRIOSTATICAS.....	68
III-2.3.1,3. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS.....	68
III-2.3.1,4. TECNICA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	74
III-2.4. FOTOGRAFIA EN BLANCO Y NEGRO DE SECTORES ANTERIORES DE AMBAS ARCADAS.....	77
III-2.5. ANALISIS DIGITAL DE IMAGEN.....	78
III-2.6. METODOS ESTADISTICOS. ....	79
IV. RESULTADOS.....	82
IV-1. DESCRIPCION GENERAL DE LA SERIE.....	82
IV-1.1. RESULTADOS CLINICOS GENERALES.....	82
IV-1.2. RESULTADOS GENERALES DE MORFOMETRIA.....	88

IV-1.3.	RESULTADOS HISTOLOGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES.....	92
IV-1.4.	RESULTADOS GENERALES DE INMUNOHISTOQUIMICA....	93
IV-2.	DESCRIPCION DEL GRUPO CONTROL.....	97
IV-2.1.	RESULTADOS CLINICOS GENERALES.....	97
IV-2.2.	RESULTADOS GENERALES DE MORFOMETRIA MEDIANTE ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES.....	97
IV-2.3.	RESULTADOS GENERALES DE INMUNOHISTOQUIMICA....	99
IV-3.	RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE GRUPO DE PACIENTES TRASPLANTADOS Y GRUPO CONTROL.....	102
IV-3.1.	ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ENTRE LOS INDICES DE SALUD ORAL DE AMBOS GRUPOS.....	102
IV-3.2.	ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ENTRE LOS INDICES MORFOMETRICOS DE AMBOS GRUPOS.....	104
IV-3.3.	INTERPRETACION DE RESULTADOS ESTADISTICOS OBTENIDOS AL COMPARAR LOS INFILTRADOS INFLAMATORIOS DE LAS BIOPSIAS DEL GRUPO DE ENFERMOS FRENTE A LOS SUJETOS CONTROL.....	104
IV-4.	RESULTADOS ESTADISTICOS DE LA VALORACION DEL GRADO DE AGRANDAMIENTO GINGIVAL COMPARADO CON LOS PARAMETROS CLINICOS EN EL GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS.....	108
IV-5.	RESULTADOS ESTADISTICOS DE LA COMPARACION DE LOS INDICES MORFOMETRICOS CON LOS DATOS CLINICOS EN LA SERIE DE ENFERMOS TRASPLANTADOS.....	114
IV-6.	ANALISIS DE LOS RESULTADOS ESTADISTICOS ENTRE HIPERPLASIA GINGIVAL CLINICA Y EL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LA BIOPSIA GINGIVAL DEL GRUPO DE ENFERMOS.....	119
IV-7.	ANALISIS DE LOS RESULTADOS DEL GRADO DE CORRELACION ENTRE LOS PARAMETROS ESTUDIADOS EN EL GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES.....	125
V.	DISCUSION.....	131
V-1.	DISCUSION DE RESULTADOS EPIDEMIOLOGICOS Y CLINICOS DE LA SERIE GLOBAL.....	131
V-2.	DISCUSION DE RESULTADOS DE MORFOMETRIA.....	134

V-3. DISCUSION SOBRE LOS EFECTOS DE LA MEDICACION INMUNOSUPRESORA EN LA INFLAMACION PERIODONTAL.....	138
V-4. DISCUSION SOBRE EL FENOTIPO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LA HIPERPLASIA GINGIVAL SECUNDARIA A CICLOSPORINA A.....	138
V-5. DISCUSION SOBRE EL MECANISMO DE INDUCCION DE HIPERPLASIA GINGIVAL SECUNDARIA A FARMACOS.....	142
VI. CONCLUSIONES.....	146
VII. BIBLIOGRAFIA.....	148

## I. INTRODUCCION

## I.- INTRODUCCION

### I-1. GENERALIDADES.

El aumento en el tamaño de la encía, es uno de los principales signos de enfermedad gingival, reconoce como factores etiológicos causas muy diversas, desde el acúmulo de irritantes locales (placa bacteriana, sarro, respiración bucal etc..) donde la encía primero se inflama (Gingivitis) y después aumenta de tamaño (Agrandamiento Gingival Inflamatorio Crónico) (CARRANZA & PERRY, 1988) hasta el producido por el uso de medicamentos, unos un poco en desuso como es el caso de la Difenilhidantoina, y otros con un amplio porvenir en terapéutica clínica como los Inhibidores de los Canales lentos del Calcio (LEDERMAN et al., 1984) y la Ciclosporina A.(CsA) (CALNE et al., 1979).

En el presente trabajo de investigación hacemos un estudio clínico (aportando datos de salud oral), bioquímico (mediante niveles sanguíneos de diferentes parámetros), morfométrico (empleando análisis de imagen), histológico e inmunohistoquímico (con un panel de anticuerpos monoclonales) del agrandamiento gingival producido por la CsA en una población de pacientes trasplantados de riñón, de las provincias de Granada y Málaga.

### I-2. LA CICLOSPORINA A.

En 1969/70, en el Departamento de Microbiología de Sandoz, Basilea, se aislaron dos nuevas cepas de hongos imperfectos a partir de muestras telúricas procedentes de Wisconsin (EE.UU) y del Fiordo Hardanger (Noruega). Una de ellas, el *Cylindrocarpon Lucidum Booth* sólo crece en cultivos de superficie por lo que se abandonó su estudio. La otra cepa fue clasificada originalmente como *Trichoderma Polisporum Rifai*, pero su nombre taxonómico correcto es

## *Introducción*

***Tolypocladium infatum* Gams.** Ambos hongos sintetizan ciclosporinas, pero dado que únicamente esta cepa crece en cultivos sumergidos, es la que se utiliza para la producción a gran escala de ciclosporina por fermentación.

En 1976, Jean Borel descubrió que la CsA tenía una gran actividad inmunosupresora in vitro e in vivo (KAHAN & GREVEL, 1988).

La introducción de la CsA proporciona un enfoque completamente nuevo dentro del ámbito de la inmunosupresión, por su alta capacidad selectiva para inhibir la activación de las células T (BOREL et al., 1976), (BOREL, 1983), (SHEVACH, 1985), (KAHAN & BACH, 1988), sobre todo helper ó cooperadores, que es generalmente atribuida a la inhibición de la síntesis de varias linfocinas, especialmente interleucina-2 (IL-2), una molécula clave en el desarrollo de la inmunorespuesta.

A diferencia de los fármacos usados previamente en el trasplante de órganos, la CsA a dosis terapéuticas no es citotóxica ni produce mielosupresión (HELIN & EDGINGTON, 1984).

En virtud de lo anteriormente expuesto y desde 1978 (CALNE et al., 1978), la CsA se ha hecho imprescindible en la prevención del rechazo de órganos trasplantados, en particular en injertos renales (HELDERMAN et al., 1985), hepáticos (WONIGEIT et al., 1984), cardíacos (COOLEY et al., 1983) (OYER et al., 1983), de páncreas (TRAEGER et al., 1984), médula ósea (HOWS et al., 1982) e intestino delgado (DELTZ et al., 1984).

Sin embargo, el espectro de actividad biológica de la CsA es mas amplio, reconociéndose efecto antiparasitario, antifúngico, antiinflamatorio (BOREL & RYFFEL, 1985) y antiproliferativo sobre queratinocitos (QCs) en cultivos de distintas zonas y sobre líneas celulares de estirpe epitelial cuando se emplea a dosis altas (BOREL, 1988). Este fenómeno es el que sustenta

## Introducción

el uso clínico de la CsA en el tratamiento del psoriasis (ELLIS et al., 1986) y otras dermatosis como la ictiosis vulgar (VELTHUIS & JESSERUN, 1985). Paradójicamente, posee una acción estimulante sobre los QCs localizados en los folículos pilosos, ocasionando una hipertricosis.

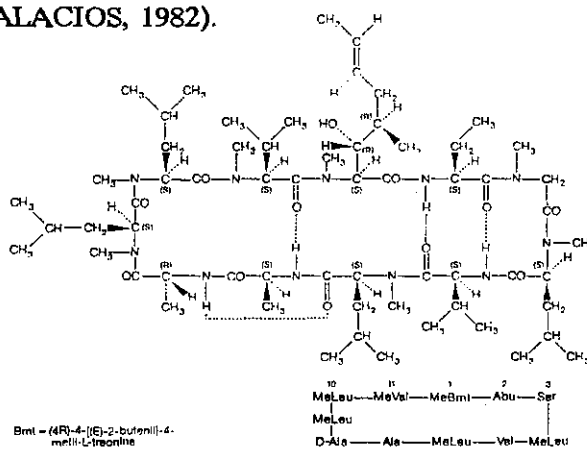
Se puede decir que con la CsA comienza la fase de la inmunofarmacología, caracterizada por la inmunorregulación selectiva mediante el empleo de sustancias ó métodos que, específicamente, modulan subpoblaciones definidas de células inmunocompetentes. Desde entonces, la inmunofarmacología ha desarrollado nuevas vías con la aparición de agentes con acción selectiva sobre la adquisición de respuesta inmunológica, reconocimiento de estímulos inmunológicos por células receptoras, inducción de diferenciación y maduración de linfocitos, interacciones celulares y modulación de funciones efectoras. Sin embargo, la CsA continúa siendo la primera droga en importancia que cumple totalmente estos requerimientos en alguna extensión (BOREL, 1983).

### I-2.1. DESCRIPCION QUIMICA.

La ciclosporina A (SANDIMUN \*) (CsA) es un fármaco inmunosupresor descubierto por Borel (BOREL et al., 1976). A través de su acción sobre las células T, la ciclosporina actúa como un potente inhibidor de la inmunidad celular y en menor grado, de la formación de anticuerpos (WENGER, 1986).

Al examinar su estructura química, se observa que se trata de un péptido cíclico, neutro y muy lipofílico que, por tanto, es insoluble en agua pero muy soluble en varios solventes orgánicos y en lípidos (BRITTON & PALACIOS, 1982).

Estructura de la ciclosporina:





## *Introducción*

La molécula de ciclosporina A, C(62)H(111)N(11)O(12) tiene un peso molecular de 1202.6 (BRITTON & PALACIOS, 1982), y está compuesta de 11 aminoácidos varios de los cuales son N-metilados. Uno de estos, el situado en posición 1, era desconocido previamente y ha sido designado como:(4R)-4-((E)-Butenil)-4,N-dimetil-L-treonina (MeBmt) (WENGER, 1986) (WENGER, 1990). Este aa participa de forma importante en las acciones biológicas de la misma, aunque no es, por sí mismo, el único responsable de su principal acción, es decir la inmunosupresión.

La CsA tiene un solo residuo D-aminoácido en posición 8 y el residuo metil-amido entre los residuos 9 y 10 está en la configuración cis, en tanto que todos los demás residuos metil-amido están en la forma trans (HANDSCHUMACHER, 1991).

Hasta ahora, al menos 46 análogos naturales ó semisintéticos de la CsA han sido descritos (VON WARTBURG & TRABER, 1986). Estudios farmacológicos han demostrado que cambios en la molécula nativa (tales como desmetilación), hacen disminuir ó desaparecer la actividad inmunosupresora (WENGER, 1986).

No existen datos que relacionen la estructura molecular de la CsA y su actividad citostática sobre células epiteliales. Sin embargo, estudios in vitro han demostrado que análogos de la CsA que han perdido total o parcialmente la actividad inmunosupresora, todavía retienen un efecto citostático, tal es el caso de la ciclosporina H (NICKOLOFF et al., 1988) (RAMIREZ-BOSCA et al., 1989), de la cual no se conoce aún el papel que pueda jugar en la producción de la hiperplasia gingival que su uso terapéutico no está estudiado.

Se conocen cuatro tipos de ciclosporina diferenciados por la naturaleza del segundo aminoácido (BOWERS & CANAFAX, 1984):

- La Ciclosporina A (la utilizada en terapéutica), con ácido-alfa- metil aminobutírico.

- La Ciclosporina B, con alanina.
- La Ciclosporina C, con treonina y
- La Ciclosporina D, con valina.

## I-2.2. FARMACOCINETICA.

La CsA es un péptido cíclico, hidrofóbico, neutro, que debe ser disuelta en líquidos o solventes orgánicos antes de su administración. Así, para su administración oral, la droga es disuelta en una solución base de aceite de oliva; para su administración intravenosa se utiliza un vehículo de aceite de castor polioxietilado compatible tanto con dextrosa como con suero salino (VAN BUREN et al., 1982).

### I-2.2.1. ABSORCION.

#### I-2.2.1.1. Via oral.

Parece ser que la absorción oral de CsA se produce solamente en la parte superior del intestino delgado (ATKINSON et al., 1983), (GREVEL et al., 1986), (KAHAN, 1989), (MORALES & ANDRES, 1991), en contra de lo que expresan algunos autores (LE BIGOT et al., 1987) de que el papel fundamental lo juegan los vasos linfáticos del ileón distal.

Administrada por via oral la absorción de la CsA es lenta e incompleta, encontrándose amplias variaciones en los datos de la biodisponibilidad, según los autores y el tipo de trasplante. En trasplantes de médula ósea encontramos biodisponibilidades en torno al 34%, con variaciones entre el 20 y el 50% (WOOD et al., 1983), en trasplantes renales la biodisponibilidad parece algo menor: entre 5 y 89% con una media de 27,6% (PTACHCINSKI et al., 1985). En trasplantes hepáticos es también del 27% (PTACHCINSKI et al., 1986).

## *Introducción*

Parece que la biodisponibilidad aumenta durante el tratamiento: según Kahan la biodisponibilidad llega a aumentar desde el 10 al 57% al cabo de las dos semanas en un paciente con trasplante renal.

No está clara la influencia en la biodisponibilidad de la ingesta de alimentos: un mismo autor, Keown, encuentra en 1982 que los alimentos disminuyen aquella, mientras que en 1983 concluye que no hay influencia alguna. A similares conclusiones llega Maurer. Ptachcinski, en cambio, encuentra que ciertos alimentos aumentan la biodisponibilidad de la CsA (PTACHCINSKI et al., 1985).

Aunque existen múltiples factores que pueden modificar la absorción de CsA, no todos los autores coinciden en ellos. Al parecer, el tratamiento con colestaramina, la presencia de colestasis (VENKATARAMANAN et al., 1985), el aumento de la movilidad gastrointestinal (WADHWA et al., 1987), la esteatorrea, la disminución de la secreción exocrina pancreática y el drenaje externo de la bilis (BURCKART et al., 1986), disminuyen la absorción de la CsA. Sin embargo, la presencia de niveles normales de lipoproteínas de baja densidad y el tratamiento prolongado promueven la absorción del fármaco (KAHAN, 1989).

La biodisponibilidad está claramente disminuida (hasta el 12%) en pacientes con hepatopatías severas por el importante papel que juegan la bilis y las sales biliares en la absorción de la CsA.

La concentración máxima, tras la administración oral, se alcanza al cabo de 3-4 horas (BEVERIDGE et al., 1981), Ptachcinski y col. dan aún una mayor variabilidad: entre 1 y 8 horas. La vida media de absorción se sitúa en torno a la hora (BEVERIDGE et al., 1981). Los valores de concentración máxima son muy variables: 538ng/ml en suero (intervalo 242-1246ng/ml) con dosis de 600mg según Beveridge; 862-3431ng/ml en sangre total con dosis de 17,5mg/kg según Ptachcinski.

**I-2.2.1.2. Via intramuscular.**

Beveridge y colaboradores, demostraron que la absorción por esta vía es extremadamente pobre y errática (BEVERIDGE et al., 1981).

**I-2.2.1.3. Via intravenosa.**

Es la de elección en el protocolo inmediato pre y postrasplante (NIEDERBERGER et al., 1983).

**I-2.2.2. DISTRIBUCION.**

La CsA se ajusta a un modelo multicompartmental, ya que su lipofilia hace que se concentre en el tejido adiposo y en diversos órganos: hígado, páncreas, glándulas suprarrenales, bazo, nódulos linfáticos... en los que alcanza concentraciones superiores a las séricas (PTACHCINSKI et al., 1986). A las 8 horas de la administración la cantidad de CsA en compartimentos periféricos es 8 veces superior a la existente en el compartimento sangre; las cantidades de CsA en el riñón e hígado son 15 y 20 veces, respectivamente, superiores a la cantidad en plasma (BOWERS & CANAFAX, 1984), (MORALES Y ANDRÉS, 1991).

No se encuentra CsA en el LCR (PTACHCINSKI et al., 1986), lo que evidencia la falta de paso a través de la barrera-hematoencefálica. Este hecho se correlaciona mal con la toxicidad S.N.C encontrada en la clínica. Por el contrario si se detecta CsA en el líquido amniótico- por tanto, atraviesa la placenta y en leche materna por lo que debe evitarse la lactancia natural en las pacientes tratadas con este inmunosupresor.

La distribución de la CsA entre los elementos de la sangre está muy estudiada: El 60% se encuentra en los hematíes, el 5% en los granulocitos, el 5% en los linfocitos y el 30%

### *Introducción*

restante en el plasma (NYEDERBERGER et al., 1983). De estos 30% del plasma, el 2% está disuelto en el agua plasmática, el 7% está unido a proteínas séricas y el 21% está unido a las lipoproteínas, mayoritariamente a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (BOWERS & CANAFAX, 1984) (LEMAIRE & TILLEMENT, 1982) y a los quilomicrones (GURECKI et al., 1985) (RYFELL et al., 1988). Una pequeña fracción circula libre en el plasma y no se correlaciona con los niveles de CsA en sangre total ni con los efectos secundarios.

Si los niveles de colesterol son menores de 120 mg/dl, los posibles efectos tóxicos de la CsA en el sistema nervioso central pueden aumentar (DE GROEN et al., 1987).

En los hematíes la CsA se localiza en el interior de las células, asociada al contenido celular, fundamentalmente a la hemoglobina según Niederberger, aunque algunos estudios sostienen que la unión al pigmento respiratorio es baja (WOOD & LEMAIER, 1985).

#### **I-2.2.3. METABOLISMO.**

La CsA se metaboliza en el hígado a través del sistema enzimático citocromo P-450 (MAURER, 1985), (BURCKART et al., 1986), (MAURER & LEMAIER, 1986), que muestra distinta actividad enzimática según la edad del sujeto (GREVEL, 1988).

Estudios hechos con cromatografía líquida han medido hasta un total de 18 metabolitos en sangre, hígado, corazón, riñón, médula, bilis y orina, siendo identificada claramente la estructura de 11 de ellos (MAURER & LEMAIER, 1986), (CHRISTIANS et al., 1988), (WANG et al., 1988).

Estos metabolitos conservan la estructura básica de undecapéptido y se forman a través de reacciones de N- Demetilación (PTACHCINSKI et al., 1986).

## *Introducción*

Estudios mas recientes realizados por Wenger (1990), hacen referencia a cinco puntos fundamentales de ataque oxidativo, localizados en la cara opuesta de la parte activa de la molécula de CsA. Por incubación de la CsA con microsomas de hígado, se demuestra que los primeros productos de oxidación son los metabolitos M17, M1 y M21, oxidados en posición 1, 9 y 4 (N) respectivamente. Una mayor oxidación de éstos podría dar lugar a M8 (oxidado en 1 y 9), M10 (oxidado en 4 y 9) y M13 (oxidado en 4 (N) y 9). En orina humana se han aislado 2 metabolitos fundamentales mas, M9 y M16, ambos oxidados en posición 6, los cuales podrían ser considerados como productos del M13 y M1 respectivamente. Realizando todas las combinaciones posibles, Wenger considera que existen 21 metabolitos mono y dioxidados producto de la CsA, de los cuales 11 han sido aislados desde hace tiempo y un razonamiento similar le conduce a un total de 41 metabolitos de CsA, mono, di y trioxidados, que espera aislar en su totalidad en breve tiempo.

Los metabolitos recirculan en la sangre, vuelven al hígado, posteriormente se introducen en el árbol biliar y se dirigen al intestino donde pueden ser reabsorbidos (LE BIGOT et al., 1987) (KEOWN & STILLER, 1988).

Algunos metabolitos parecen tener un poder de inmunosupresión mayor que el fármaco de origen, puesto de manifiesto en estudios de cultivos mixtos de linfocitos (ZEEVI et al., 1988), aunque la contribución de los metabolitos en el efecto inmunosupresivo global es probablemente menor que el de la CsA nativa (RYFFEL et al., 1988). Sin embargo, aún queda por establecer cual es el papel de estos metabolitos en los efectos terapéuticos ó tóxicos del fármaco (FREED et al., 1987), (RYFFEL et al., 1988).

El metabolismo está disminuido, como era de esperar, en pacientes con hepatopatías, encontrándose valores de aclaramiento del orden de la mitad de los normales en enfermos cirróticos (PTACHCINSKI et al., 1986).

Se ha comprobado que el metabolismo de la CsA es más rápido en pacientes

pediátricos con trasplante renal o hepático (BURCKART et al., 1986).

La administración concomitante de otros fármacos que interactúan con el sistema P-450 puede afectar al metabolismo de la CsA. Así, inhibidores del sistema enzimático citocromo P-450 que pueden aumentar los niveles de CsA incluyen: Algunos antagonistas del calcio, como el diltiazem, verapamil (KOHLHAW et al., 1988), (WAGNER et al., 1988) y nicardipina (BOURBIGOT et al., 1986), contraceptivos orales (DERAY et al., 1987), ketoconazol (DIEPERINK & MOLLER, 1982), eritromicina (HARNETT et al., 1987) (MORALES y cols., 1987), andrógenos y metilprednisolona (KLINTMALON et al., 1984). Por otra parte, los agentes que producen inducción enzimática del sistema P-450 originan disminución de los niveles de CsA, tal es el caso de la rifampicina (DANIEL & SAWE, 1984), fenobarbital, fenitoina (PATCHCINSKI et al., 1985), carbamacepina (LELE et al., 1983) y valproato.

Ptatchcinski y colaboradores, han observado que la terapia esteroidea hace aumentar el aclaramiento de CsA en los pacientes, posiblemente porque los esteroides pueden inducir al sistema enzimático microsomal.

#### I-2.2.4. EXCRECION.

La excreción urinaria de CsA es poco importante, (WOOD et al., 1983) representando apenas un 6% del total de la dosis administrada (MORALES & ANDRÉS, 1991). La excreción fundamental es a través de las heces, procedente de la bilis (MAURER, 1985), (BURCKART et al., 1986), (MAURER & LEMAIRE, 1986), (CHAMORRO y cols., 1987). Las concentraciones de CsA encontradas en la bilis son muy superiores a las sanguíneas. Kahan y col. defienden la existencia de una recirculación enterohepática de la CsA, pero tal recirculación afecta más bien a los metabolitos que al medicamento original.

## *Introducción*

El estado funcional del hígado influenciará la eliminación del fármaco. Se ha demostrado que cuando los niveles de bilirrubina están elevados, se reduce el aclaramiento para la CsA. Esto mismo ocurre cuando aumenta la actividad enzimática de la alanina aminotransferasa (GREVEL, 1988), por lo que en estos casos son necesarios intervalos mas dilatados entre las dosis de CsA (KAHAN, 1989).

El aclaramiento, de bajo a intermedio, es muy variable y está influenciado por el tipo de trasplante, estado de la enfermedad, edad del paciente y medicación asociada (KAHAN, 1989). Asimismo, existen diferencias diurnas en el aclaramiento de CsA, de forma que parece ser mayor durante la última parte de la noche y por la mañana temprano que durante el día. Esto indica la necesidad de monitorizar los niveles a la misma hora cada día en un paciente individual.

El 78% de la variabilidad en el aclaramiento podría ser explicado haciendo una regresión lineal múltiple usando dos parámetros, la tasa de triglicéridos y la de LDL-colesterol (LITHELL et al., 1986).

El alto grado de unión de la CsA a los elementos de la sangre y su extensa distribución extravascular explican por qué la eliminación mediante hemodiálisis no tiene trascendencia.

### **I-3. RESPUESTA INMUNE FRENTE A INJERTOS**

Clásicamente se reconoce que la acción del sistema inmune contra el injerto puede tener lugar por dos mecanismos: el celular y el humoral. Mientras la vía celular parece predominar en el rechazo del injerto primario, al menos en órganos sólidos; la vía humoral es la principal en receptores presensibilizados.



### I-3.1. MECANISMO CELULAR

Las células del sistema inmune se diferencian entre sí por los distintos receptores que portan en su membrana (BERNARD et al. 1984). Cuando estas células entran en contacto con el antígeno se activan y proliferan. Las células T sólo reconocen antígenos extraños cuando son presentados junto con moléculas MHC o bien cuando estos antígenos son moléculas alo-MHC, actuando así al mismo tiempo como antígenos y moléculas presentadoras.

#### - RECEPTOR ANTIGENICO DE LOS LINFOCITOS T

La estructura receptora del antígeno en los linfocitos T (Tcr) está formada por dos moléculas unidas por puentes disulfuro y se asocia al CD3 (complejo que se encuentra en todos los linfocitos T maduros) (DAVIS & BJORKMAN, 1988). A partir de ésta unión se activa la correspondiente clona linfocitaria T.

El Tcr de los linfocitos T-CD4 + (linfocitos T inductores /colaboradores), sólo es capaz de unirse a un antígeno si se encuentra presentado por moléculas HLA de clase II, mientras que los linfocitos T-CD8 precisan que el péptido antigénico esté unido a las moléculas HLA de clase I. Actualmente, se conocen dos tipos de Tcr en los linfocitos T-CD4, el alfa-beta que reconoce péptidos extraños unidos a moléculas HLA-DR y el gamma-delta que reconoce péptidos unidos a HLA-DQ (STROMINGER, 1989). Es importante subrayar que la activación de los linfocitos T-CD4 (eslabón inicial y principal del rechazo) sólo puede producirse a través de células portadoras de moléculas HLA de clase II y que sólo algunas células tienen éstas moléculas. Por tanto, la posibilidad de que se desencadene la reacción depende de "estas células presentadoras de antígenos": macrófagos, algunas células endoteliales y células dendríticas (AUSTYN & STEINMAN, 1988).

#### - INTERACCION ENTRE EL Tcr Y LA CELULA PRESENTADORA DEL ANTIGENO

## *Introducción*

La unión del Tcr del linfocito T-CD4, al complejo formado por el HLA y el antígeno de la célula presentadora produce una señal transmitida a través de la membrana por el complejo CD3 asociado al Tcr. Esta señal, junto al estímulo de la interleuquina 1 (IL1) segregada por los macrófagos, provoca la activación del linfocito T CD4 (CRABTREE, 1989). Esta activación se manifiesta por la liberación de enzimas intracelulares (fosfolipasas y tirosin-quinasa) que dan lugar a la aparición de inositol-trifosfato, diacilglicerol y aumento del calcio libre intracelular; estos procesos aumentan la expresión de genes de activación, lo que da lugar a la síntesis y liberación de un conjunto de interleuquinas, especialmente interleuquina 2 (IL2) y a la aparición en la membrana de receptores de las mismas. Bajo la acción de la IL2, la clona de linfocitos T-CD4 activada prolifera y se expande (KRENSKY et al., 1990).

Además, en la activación del linfocito T-CD4 se libera también interleuquina 3, que estimula la maduración de células tales como granulocitos, macrófagos y otras células hematopoyéticas, y gamma-interferon que induce la expresión de moléculas HLA de clase II, con lo que se facilita la activación de los linfocitos T-CD4, se potencia la reacción inmunológica y se estimulan las funciones de los macrófagos.

Por otro lado, los linfocitos T-CD8 (supresores /citotóxicos) a través del receptor se unen a los antígenos del injerto, presentados, en éste caso, por una molécula de clase I, con lo que se activan y expresan receptores para la IL2 segregada por los linfocitos T-CD4 activados. La clona T-CD8 se diferencia y se expande. (SMITH, 1988).

En la vía celular del rechazo la acción lesiva tiene lugar por las células que infiltran el órgano rechazado; existe actividad citotóxica específica a cargo, principalmente, de las células T (MASON & MORRIS, 1986). Otras células que infiltran el trasplante como los macrófagos, granulocitos eosinófilos, basófilos e incluso polimorfonucleares, ejercen una acción lesiva del injerto, probablemente por mecanismos inflamatorios inespecíficos (SANFILIPPO, 1990). Otras células que pueden tener un papel lesivo son las denominadas "natural killer", aunque otros autores consideran

## *Introducción*

que podrían jugar más bien un papel de regulador en la maduración de las células inmunológicamente competentes (SHABTAI et al., 1990).

### I-3.2. RESPUESTA HUMORAL

Los linfocitos B reconocen directamente al antígeno. A través de las inmunoglobulinas de membrana que poseen, se adaptan a los antígenos del injerto y después del contacto con los mismos expresan receptores para IL-4-5-6. Estas moléculas también son segregadas por los linfocitos T-CD4 activados y actúan provocando la expansión y diferenciación de la clona de linfocitos B que dará lugar, en última instancia a la producción de células plasmáticas secretoras de los anticuerpos específicos.

En la respuesta humoral tenemos pues, dos grupos de factores humorales responsables del rechazo del injerto: a) el inespecífico, integrado por las interleuquinas (IL) (diez IL distintas hasta la fecha) (DALLMAN & CLARK, 1991), factores de crecimiento y de diferenciación de los linfocitos T y B así como mediadores de la inflamación, principalmente IL1, gamma-interferon y factor alfa de necrosis tumoral (HENNEY, 1989) y b) el específico donde están los Ac, que se pueden detectar en el receptor después del rechazo del injerto. Los Ac IgM, Ig G1 e Ig G3 activan el sistema del complemento por la vía clásica, provocando finalmente la ruptura de la membrana celular, tras la formación del complejo C5-C9 de ataque a la membrana. Los Ac que no activan el complemento pueden ejercer una acción lesiva en el injerto a través de otras células que posean receptores del Fc en su membrana, provocando así la lisis de la célula portadora del antígeno (citotoxicidad dependiente de células o anticuerpos o inmunidad tipo ADCC).

Una vez desarrollada la respuesta inmune normal, pasamos a describir los niveles donde actúa la CsA y los pasos que interfiere en esta respuesta.

#### I-4. MECANISMOS DE ACCION DE LA CsA.

Como mencionamos anteriormente, cada vez es mayor el número de efectos terapéuticos que se atribuyen a la CsA, si bien y a pesar del número creciente de estudios realizados, el mecanismo de acción preciso de la CsA a nivel molecular permanece sin aclarar. Los efectos de la CsA que con mayor profusión se han estudiado han sido el efecto inmunosupresor (BOREL & RYFFEL, 1985), (DRUGGE & HANDSCHUMACHER, 1988), (HESS & COLOMBANI, 1988) y su actividad antiproliferativa, si bien esta última de forma menos extensa. Se ha especulado sobre la posibilidad de que ambos efectos compartan, al menos en parte, los mismos mecanismos moleculares. De hecho, un efecto antiproliferativo sobre células inmunocompetentes (tales como CD4+) conducirá indefectiblemente a una inmunosupresión (KANITAKIS & THIVOLET, 1990).

##### I-4.1. Mecanismos de acción de la ciclosporina como inmunosupresor.

La CsA altera selectivamente la respuesta inmune interfiriendo directamente con la función de los linfocitos T (LILLEHOFF et al., 1984), (BENNETT & NORMAN, 1986), (KAHAN, 1989a). La acción predominante de la CsA va dirigida contra las poblaciones de células T colaboradoras (Helper) (KAY & BENZIE, 1984), (LILLEHOJF et al., 1984). Este efecto en las células T-helper previene la producción de varias linfoquinas, tales como IL-2, IL-3, IL-4 y gamma interferon (MORRIS, 1991), siendo la IL-2 (BOREL et al., 1976), la más estudiada hasta el momento. La inhibición en la formación de linfoquinas, especialmente IL-2, impide por tanto la liberación de las segundas señales necesarias para la maduración de las células T y B, suprimiendo la proliferación y generación de los linfocitos T citotóxicos.

La síntesis de IL-2 está disminuida, in vitro, (HESS et al., 1982) mediante una única

## *Introducción*

exposición de CsA e, in vivo, en receptores de trasplante de médula ósea (AZOGUI et al., 1983) y de riñón que reciben crónicamente CsA (YOSHIMURA & KAHAN, 1985).

En orden a testificar la hipótesis de que la inhibición de la producción de IL-2 es un efecto crítico inmunosupresor de la CsA, se hizo reaccionar una sonda de c-ADN construida contra m-ARN IL-2, con extractos citoplasmáticos de linfocitos de pacientes tratados con CsA, mediante un ensayo de Northern-blot. Se demostró que el componente m-ARN IL-2 actúa como un potente depresor en pacientes tratados con CsA (YOSHIMURA et al., 1987).

Aunque la CsA inhibe la formación de IL-2, tiene poco efecto sobre la expresión del receptor de superficie de membrana de baja afinidad para IL-2, -CD25- (MIYAWAKI et al., 1983), (KERMANI-ARAB et al., 1985). Este receptor, después de la unión con IL-2, se elimina en el suero ó alternativamente se interioriza. Los niveles en suero del receptor de IL-2 en voluntarios normales, en candidatos pretrasplantados con enfermedad renal en estadio terminal y con función del injerto renal estable postrasplante y en individuos que padecen nefrotoxicidad inducida por la droga, están alrededor de  $300 \pm 200$  U/ml. En contraste, pacientes sufriendo activación inmune causada por rechazo agudo ó en respuesta a agentes infecciosos, muestran niveles del receptor de IL-2 mayores de 1000 U/ml (SMITH et al., 1989). Por tanto, el receptor de IL-2 libre en suero, ó incluso mas sensiblemente, el índice de este nivel con el nivel de CsA en suero, proporciona un dato útil para diagnosticar la activación inmune en pacientes trasplantados. Además, estos hallazgos confirman observaciones previas de que, pacientes recibiendo dosis terapéuticas de CsA, muestran niveles normales del receptor de baja afinidad para IL-2 (KAHAN, 1989).

Sin embargo, otros autores consideran que la CsA puede adicionalmente involucrar un efecto sobre la formación del receptor de IL-2 (GRANELLI-PIPERNO et al., 1987) ó inhibir su expresión (HEROLD et al., 1986), sobre todo en lo referente a su cadena  $\beta$  ó receptor de alta afinidad para la IL-2.

## *Introducción*

In vivo, la terapia con CsA inhibió la capacidad de las células de los pacientes para generar gamma interferon (KAHAN et al., 1987). En este sentido, los linfocitos de pacientes con enfermedad renal en estadio terminal bajo estimulación con fitohemaglutinina (PHA), produjeron 1100 U/ml de gamma interferon. Por el contrario, y tras una semana de postrasplante, los linfocitos activados con PHA derivados de pacientes bajo terapia de CsA-prednisona, secretaron menos de 50 U/ml de gamma interferon. La capacidad para producir gamma interferon permaneció deprimida durante 12 semanas de postrasplante en aproximadamente 100 U/ml, creciendo después a 600 U/ml a las 14 semanas de postrasplante y al valor de pretrasplante entre las 16 y 20 semanas.

La CsA inhibe indirectamente la función monocítica al suprimir la producción de linfoquinas, tales como  $\alpha$ -interferon por parte de linfocitos T4 (REEM et al., 1983), el factor inhibidor de los macrófagos (HELIN & EDGINGTON, 1984), el factor quimiotáctico de los macrófagos (GRANELLI-PIPERNO et al., 1984) y la actividad procoagulante macrofágica (KEOWN & STILLER, 1988). Asimismo, la producción de IL-1 por los monocitos está inhibida (PALACIOS, 1982), sin que se conozca si es debido a un efecto directo concomitante sobre el macrófago.

Se ha descrito que la CsA inhibe la generación de los factores de crecimiento de los linfocitos B (IL-5 y IL-6) (O'GARRA et al., 1986), y también se ha observado que este fármaco inhibe "in vitro" la activación de los linfocitos B por anticuerpos antiinmunoglobulinas (MURAGUCHI et al., 1983), (KLAUS & HARWRYLOWICZ, 1984). Es probable que la CsA impida el primer paso en la activación de las células B via receptores de Ig sobre la superficie de la célula.

El mecanismo molecular de la acción de la CsA, inhibiendo a la vez la producción de IL-2 y síntesis de enzimas capaces de mediar la función citotóxica, no está claro. La CsA no afecta a la unión inicial del antígeno de membrana a los receptores de las células T, ó a su transducción a través del complejo receptor CD3 a proteína G, con activación de fosfolipasa C y

## *Introducción*

catálisis de difosfato fosfoinositol a trifosfato fosfoinositol y 1,2 diacilglicerol. Además, la activación de la proteinquinasa C y la liberación de las reservas internas de  $Ca^{2+}$  no son deprimidas por la CsA. Aunque puede haber efectos posteriores sobre la permeabilidad del canal de  $Ca^{2+}$ , no hay evidencia de efectos tempranos (KAHAN, 1989). Mas recientemente, se ha observado que la CsA inhibe la formación de la señal de activación citoplásmica, lo cual provoca frenaje de la incorporación de timidina tritiada en el núcleo. Un efecto variable de la droga previene a los núcleos de las células tratadas con CsA de responder como responde un citoplasma normal activado. El nivel de esta inhibición refleja las concentraciones intranucleares de CsA ya que núcleos conteniendo  $43 \pm 3$  ng/ml de CsA, usando el radioinmunoensayo policlonal no selectivo de oveja, mostraron poca inhibición, y sin embargo núcleos con  $126 \pm 49$  ng/ml presentaron un 35% de reducción, (CITTERIO & KAHAN, 1989). Puesto que estas diferencias interindividuales en el componente nuclear de CsA fueron observadas tras incubación con una dosis de 1000 ng/ml de CsA, la respuesta nuclear inhibida reflejó probablemente diferencias de afección por el receptor (KAHAN, 1989).

Una vez que la CsA penetra en la célula, probablemente contacta con algunas proteínas citosólicas, de las cuales las más conocidas son la Calmodulina (CaM) y la Ciclofilina (CYP).

Fueron Colombani y colaboradores (1985), quienes describieron por primera vez la posible relación entre el efecto inmunosupresor de la CsA y la unión de esta droga a la CaM, con la consecuente interferencia con el  $Ca^{2+}$ . Algunos estudios posteriores que investigaron el posible efecto e interacción entre antagonistas y bloqueantes de la CaM y la CsA (COLOMBANI et al., 1987), reafirmaron la idea de que una alteración del contenido intracitoplasmático de  $Ca^{2+}$  por alteración de la CaM al unirse con la CsA, conducen a un defecto en los primeros pasos de la activación de los linfocitos quiescentes sometidos a inmunoestimulación. Sin embargo, no todos los trabajos llegaron a estas conclusiones, minimizando e incluso negando que esta unión tuviera relevancia en dicho mecanismo (LE GRUE et al., 1986), (FOXWELL et al., 1988), (QUESNIAUX

## *Introducción*

et al., 1988). La CYP (FOXWELL et al., 1988), (HARDING & HANDSCHUMACHER, 1988), (QUESNIAUX et al., 1988) es una proteína de peso molecular 17.737, con estructura terciaria globulosa y un contenido hidrófobo a manera de core (DALGARNO et al., 1986) en su interior y que ha sido descrita como la principal molécula a la que la CsA se une a nivel citoplasmático (HANDSCHUMACHER et al., 1984), (HARDING & HANDSCHUMACHER, 1988) de manera estereoespecífica. Respecto a su estructura secundaria, se observa una alternancia del patrón de hélice alfa y de estructura de beta plegada (HARDING & HANDSCHUMACHER, 1988). La CYP contacta con los residuos de la CsA números 1, 2, 10 y 11 que, junto con el 3, son los necesarios para que esta droga tenga acción inmunosupresora (QUESNIAUX et al., 1988), (HSU et al., 1990). Los estudios de NMR <sup>1</sup>H sugieren que dicha unión provoca cambios en la estructura de la CYP, sobre todo en los restos metílicos y aromáticos (DALGARNO et al., 1986), (HSU et al., 1990), con una fuerte correlación entre dicha acción inmunosupresora y el nivel de unión de la CsA con la CYP, hecho que no se ha encontrado para la CaM (QUESNIAUX et al., 1988).

La CYP también se ha descrito en células no inmunes de mamíferos como los murinos (MERKER et al., 1983), sobre todo a nivel de riñón, ganglios linfáticos y cerebro, detectándose también en QCs. Kolestsky y colaboradores (1986), han aumentado el espectro de tejidos normales a tejidos tumorales, entre los que se incluyen líneas de carcinomas epidermoides y otras neoplasias de estirpe epitelial, así como en otras especies filogenéticamente distintas, creyéndose que los genes que la codifican pertenecen a una familia multigenética. Todos estos datos indican que la CYP es una molécula filogenéticamente primitiva y por ello pudiera estar implicada en procesos celulares muy primarios, con una amplia repercusión fisiológica.

Entre los efectos que la CYP tienen en la bioquímica celular caben destacar los siguientes: a) Actividad proteinquinasa (HANNINK & DONOGHUE, 1985), y autores como Harding y Handschumacher (1988) sugieren que la CYP podría actuar como una fosfotransferasa, pudiendo ejercer esta actividad sobre otras proteínas, entre las que se citan las histonas; b) Actividad peptidil-propil-cis-trans isomerasa, interviniendo en la isomerización de la prolina durante



## *Introducción*

la síntesis de proteínas (TAKAHASHI et al., 1989), (MOORE et al., 1991), (STEINMANN et al., 1991a), (STEINMANN et al., 1991b) y c) Acción inhibitoria del activador de replicación del ADN (WONG et al., 1987), (KIMBALL et al., 1991). La unión CsA-CYP parece alterar todas estas funciones, aunque se desconoce su efecto final.

El hecho de que la acción inmunosupresora de la CsA puede ejercerse merced a su unión específica con CYP, que como se ha mencionado contribuye al plegamiento de otras proteínas por su actividad isomerasa (HARDING & HANDSCHUMACHER, 1988), (TAKAHASHI et al., 1989), retardaría la formación de la estructura terciaria de numerosos mediadores protéicos fundamentales, en los estadios iniciales de la activación de los linfocitos T cooperadores (STEINMANN et al., 1991a), (RINGE, 1991). No obstante, existe gran controversia en esta teoría y muchos de sus puntos permanecen oscuros.

La reciente descripción de que el gamma interferón tiene un papel regulador de la síntesis colágena, actuando a nivel transcripcional como inhibidor de la expresión genética de dichas proteínas, apoya la hipótesis anterior y abre nuevas perspectivas acerca de la cuestión, ya que el gamma interferón podría actuar como una señal de parada en el proceso de fibrogénesis (KOVACS, 1991). En este sentido, se ha señalado que disminuye la actividad mitogénica del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) sobre los fibroblastos. Por todo ello, cabe la posibilidad de que la fibrosis incrementada, que acontece en el curso de la toxicidad crónica por CsA, sea mediada por un déficit crónico de gamma interferón, dependiente del efecto inmunosupresor provocado por la CsA. Este efecto supondría una demostración indirecta de los múltiples mecanismos de regulación celular en los que es capaz de interferir la CsA.

Otros mecanismos de la inmunosupresión dependientes de CsA pueden operar al nivel del timo y/o de la formación de células supresoras. En este sentido, la terapia con CsA inhibe la médula tímica, interfiriendo por tanto con el proceso por el cual los linfocitos aprenden a reconocer lo propio (HESS et al., 1985). Además, la CsA fomenta la producción por células tímicas

## *Introducción*

de hormonas humorales supresoras, que pueden regular a la baja la respuesta sistémica inmune (DARDENNE et al., 1987). Por ello, existe un gradual crecimiento en la actividad postrasplante de las células supresoras, posiblemente fomentado en parte por el aumento de la producción de hormonas tímicas y el desequilibrio tímico medular, favoreciendo la maduración de linfocitos tímico-derivados hacia el camino supresor y/ó por producción creciente de prostaglandinas por células adherentes (WHISLER et al., 1984). La producción creciente de prostaglandina E-2 puede disminuir la síntesis de IL-1 y la expresión de los antígenos de superficie HLA-Dr, así como aumentar la formación de AMP cíclico, inhibiendo por tanto la necesaria actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC) para la formación de poliamina (PA) y síntesis de ADN. Además, la CsA prescinde de la generación de células supresoras tanto in vitro (HESS & TUTSCHKA, 1980), como in vivo (VAN BUREN et al., 1982), permitiendo la aparición de elementos que regulan a la baja la activación de la células T-Helper, vía producción de receptores antiidiotipo ó antiantígeno.

### **- Acción de la ciclosporina en las enfermedades autoinmunes.**

Para que se activen los linfocitos es necesario la existencia de dos estímulos (BOREL & RYFELL, 1985).

- 1-interacción con una célula presentadora del antígeno (CPA).
- 2-estímulo de la linfocina.

La ciclosporina al inhibir la activación de los linfocitos, bloquea la producción de linfocina de las células T cooperadores (segundo estímulo), interrumpiendo la formación de autoanticuerpos y células T citotóxicas.

### **I-5. EMPLEO DE LA CICLOSPORINA EN TRASPLANTES.**

Hoy, diecinueve años después del descubrimiento del hongo productor del principio

## *Introducción*

activo, puede afirmarse que la ciclosporina ha hecho posible el advenimiento de una nueva era en el trasplantes de órganos (CALNE et al., 1978). La supervivencia de los injertos renales ha aumentado de forma considerable y los trasplantes hepáticos y cardíacos se han convertido en una realidad (COOLEY et al., 1983), (WONIGEIT et al., 1984).

A principios de los años setenta y debido al rápido desarrollo de técnicas quirúrgicas adecuadas, el problema fundamental de los trasplantes de órganos ya sólo consistía en la aceptación de un órgano de un donante extraño y el mantenimiento adecuado de su función en el cuerpo del receptor mediante la inhibición selectiva de las células inmunocompetentes activadas (ALSINA, 1988). La ciclosporina, al resolver este problema, ha convertido una práctica casi experimental en un procedimiento terapéutico de aplicación a gran escala (COOLEY et al., 1983), (WONIGEIT et al., 1984).

En la última década, la ciclosporina ha sido utilizada en trasplantes de riñón, corazón, corazón/pulmón, hígado, páncreas y médula ósea (COOLEY et al., 1983), (WONIGEIT et al., 1984) psoriasis (COOPER et al., 1990), (ELLIS et al., 1986), artritis reumatoidea (VAN RIJTHOVEN & DISKMANS, 1986), oftalmopatía del síndrome de Graves (KUENTY et al., 1986), lupus eritematoso sistemático (FEUTREN, 1986), (FEUTREN et al., 1987), alopecia areata (GUPTA et al., 1990), cirrosis biliar primaria (ROUTHIER et al., 1980), (KORNER, 1991), pioderma gangrenoso (ELGART et al., 1991) granulocitopenia del S.de Felty (CANVIN et al., 1991), púrpura trombocitopénica idiopática (SASAKI, 1990), granulomatosis de Wegener (SCHOLLMEYER & GROZT, 1990), anemia aplástica (PARK, 1989), dermatitis atópica (MUNRO et al., 1991), síndrome hemolítico urémico (VENKAT et al., 1991) además de otros múltiples procesos de etiología incierta entre los que se encuentran: Glomerulonefritis (MEYRIER, 1989), diabetes mellitus tipo I (STILLER et al., 1983), liquen plano (LEVELL et al., 1991), penfigo vulgar (BONDESSON & HAMMAR, 1990), enfermedad de Crohn (ALLAN et al., 1987), enfermedad de Behcet (MUFTUOGLU et al., 1987), (PISANTY et al., 1988), y una enfermedad congénita de base hereditaria como la ictiosis vulgar (VELTHUIS & JESSERUN, 1985). En este último caso, la acción

## ***Introducción***

beneficiosa de la CSA dependería más de su capacidad antiproliferativa sobre los queratinocitos epidérmicos (KANITAKIS & THIVOLET, 1990) que de su capacidad inmunomoduladora. En relación con la patología tumoral, la CsA induce remisiones parciales en pacientes con linfomas tipo Hodgkin (ZWITTER et al., 1987).

El trasplante renal, primero en ser realizado en el ser humano, es actualmente el que se efectúa con mayor frecuencia (CALNE, 1987). En todo el mundo se realizan anualmente más de 15000 trasplantes de riñón. El tratamiento de estos pacientes con ciclosporina ha permitido aumentar de forma significativa la tasa de supervivencia del órgano trasplantado (CALNE et al., 1978). Además, la acción selectiva de este fármaco asegura al paciente la conservación de sus funciones de defensa contra las infecciones.

Incluso en pacientes considerados previamente como de alto riesgo, como los ancianos, diabéticos y retrasplantados, los resultados obtenidos son, gracias a la ciclosporina, similares a los de los restantes pacientes. Además, los pacientes pueden retornar antes a una vida normal al acortarse el tiempo e estancia hospitalaria y el número de reingresos (ALSINA, 1988).

Se cuentan entre las ventajas específicas de la inmunosupresión con ciclosporina, la alta potencia inmunosupresora, la selectividad para los linfocitos T, sin efectos tóxicos en la médula ósea ni sobre la fagocitosis, y el hecho de que este efecto sea rápidamente reversible, unido a una monitorización fácilmente controlable (SANDORAMA, 1988). En particular las ventajas clínicas obtenidas con el uso de la CsA en el trasplante renal son:

El aumento de la supervivencia del órgano trasplantado, la reducción de la frecuencia de episodios de rechazo, la disminución de la necesidad de administrar corticoides y por último y en consecuencia, la reducción de la morbilidad (SANDORAMA, 1988).

- Otras acciones de la CsA

## ***Introducción***

De igual forma la CsA ha demostrado acción bloqueante sobre los receptores celulares de prolactina (RUSSEL et al., 1984) y la actividad fosfolipasa A2 de membrana (FAN & LEWIS, 1985) provocando deplección de algunas prostaglandinas y elevación de los niveles intersticiales y séricos de tromboxano A2 (BROWN et al., 1990). Recientemente se ha descrito un efecto antiproliferativo de la CsA sobre queratinocitos en cultivo (QC) y diversas líneas celulares de estirpe epitelial (KANTAKIS & THIVOLET, 1990), (BOREL, 1988). Este fenómeno sustenta el empleo clínico de la CsA en el tratamiento del psoriasis (ELLIS et al., 1986) y otras dermatosis como la ictiosis vulgar (VELTHUIS & JESSERUN, 1985). Paradójicamente, la CsA posee una acción estimulante sobre los queratinocitos localizados en los folículos pilosos, ocasionando una hipertrichosis como frecuente efecto secundario. De lo anterior se deduce el prometedor campo de investigación que se abre para el futuro, con el uso clínico de agentes antiproliferativos tipo CsA no inmunosupresoras para el tratamiento de enfermedades en que se encuentra incrementada la tasa de proliferación celular, como es el caso de las neoplasias.

### **I-6. MONITORIZACION DEL TRATAMIENTO CON CsA.**

Las diferencias intra e interindividuales de la farmacocinética de la CsA hacen necesaria la monitorización cuidadosa de los niveles sanguíneos del fármaco (CHAMORRO y cols., 1987). Por un lado, los niveles en sangre excesivamente bajos suponen la no eficacia del producto y por otro, la incidencia de efectos secundarios es mayor si se sobrepasan unas cifras umbrales (SCOTT & HIGENBOTTAN, 1988), (MORALES Y ANDRES, 1991).

El uso de diferentes sistemas de ensayo para medir niveles en sangre de CsA es un tema muy discutido (SHAW et al., 1987). Los métodos de laboratorio hoy día mas eficaces para medir CsA son: La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sistema que resulta costoso tanto en tiempo como en materiales necesarios para su ejecución (MAURER, 1985), (ROSANO et al., 1986) y el radioinmunoanálisis (RIA) (DONATSCH et al., 1981), (SHAW, 1989). Mientras que el HPLC permite la determinación de la CsA, el RIA mide a la vez CsA y metabolitos, puesto que

## *Introducción*

el antisuero de oveja contra CsA también reconoce algunos metabolitos. Como las reacciones son muy variables, ensayos usando diferentes anticuerpos policlonales dan diferentes resultados (SHAW, 1989). Con el hallazgo de anticuerpos monoclonales frente a CsA, ha sido posible seleccionar dos anticuerpos, uno que reconoce casi exclusivamente CsA y otro que no distingue entre CsA y la mayor parte de los metabolitos (QUESNIAUX et al., 1987). No obstante, la cuantificación de los diferentes metabolitos tiene que ser hecha mediante la técnica de HPLC (RYFFEL et al., 1988).

No está claro cual es el método de ensayo y fluido biológico mas apropiado para monitorizar CsA (YEE et al., 1988). La concentración de CsA puede ser medida en suero (KEOWN & STILLER, 1988), plasma ó sangre total , prefiriendo la mayoría de los autores la determinación en este último fluido (FAYNOR et al., 1984), (BURCKLE, 1985). La mayoría de los participantes al Congreso Internacional de CsA (1988) monitorizaron la terapia con CsA mediante uno de los tres métodos siguientes: 1º) concentraciones de CsA en plasma medidas por RIA, 2º) concentraciones de CsA en sangre total medidas por HPLC y 3º) concentraciones de CsA en sangre total medidas por RIA. Los proponentes de plasma argumentaron que, éste transporta la CsA y sus metabolitos al tejido periférico y proporciona por tanto el índice mas preciso de la concentración de la droga y sus metabolitos en tejidos periféricos. Los proponentes de sangre total (FAYNOR et al., 1984) argumentaron que, puesto que la distribución de CsA entre los hematíes y plasma varía con la temperatura, las mediciones en sangre no dependen de las condiciones de procesar la muestra tales como la temperatura y que, la CsA y sus metabolitos, tienen una afinidad mayor para la fracción celular de la sangre. Cambios en las concentraciones de CsA y de sus metabolitos en sangre, reflejarían por tanto cambios en las concentraciones de tejidos diana (YEE et al., 1988).

Keown y Stiller utilizan la medición con RIA para la monitorización clínica rutinaria y la técnica de HPLC la aplican a pacientes con alteraciones en la función hepática. Si la función hepática es normal, el cociente fármaco original/compuesto inmunorreactivo total es de aproximadamente el 70% en el pico de concentración del fármaco y del 30 al 40% para concentraciones medias. En los casos de disfunción hepática, este cociente puede disminuir a menos

## *Introducción*

del 10%, por lo que es necesario monitorizar, utilizando HPLC, para determinar si el nivel del compuesto original es lo suficientemente elevado para poder conseguir un nivel adecuado de inmunosupresión (KEOWN & STILLER, 1988).

Por otro lado, se ha visto que el desarrollo de nefrotoxicidad está correlacionado con la dosis de CsA y niveles en plasma medidos por RIA (MIHATSCH et al., 1983), (HOLT et al., 1986), pero no con niveles en plasma determinados por HPLC (YEE et al., 1986), (YEE et al., 1988). Este y otros descubrimientos sugieren que los metabolitos, mejor que el componente madre, podrían ser responsables de la nefrotoxicidad (RYFFEL et al., 1988). Por tanto, ha sido sugerido que el RIA es el método de elección para monitorizar CsA si lo que queremos evaluar es toxicidad.

Los valores en rango terapéutico de CsA determinados por HPLC oscilan entre 100 y 450 ng/ml (PTACHCINSKI et al., 1985b). Los valores en sangre total con el RIA monoclonal específico oscilan entre 150 y 400 ng/ml (KEOWN, 1988). Ambos métodos producen resultados cuantitativos y reproducibles de la droga sobre sangre total (ABBOT & PIPPENGER, 1985).

### I-7. REACCIONES ADVERSAS.

Al carecer de acción mielodepresora, la CsA presenta claras ventajas sobre los fármacos inmunodepresores con acción citotóxica.

Las reacciones adversas de CsA suelen ser ligeras o moderadas y dosis-dependientes. Generalmente en la primera semana de administración oral, el paciente puede sentir una sensación subjetiva de entumecimiento en las manos y los pies.

De entre las reacciones adversas de CsA, cabe destacar la alteración de la función renal, la cual guarda una relación con la dosis. La hipertensión grave y la administración de aminoglucósidos, anfotericina B, melfalan y trimetropin pueden favorecer la aparición de dicha

disfunción renal (SCOTT & HIGENBOTTAM, 1988).

Pueden producir también una alteración de la función hepática, con hiperbilirrubinemia y aumento de transaminasas, pero la experiencia ha demostrado que no tiene trascendencia clínica.

Otras reacciones adversas posibles son: HIPERTROFIA GINGIVAL, trastornos gastrointestinales, hirsutismo, hipertensión arterial (COHEN et al., 1984), (KAHAN et al., 1987).

En este apartado debemos mencionar el trabajo de Ota y Bradley que estudiaron a 100 pacientes trasplantados de riñón y mantenidos con CSA, comprobaron que la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad eran los efectos secundarios más frecuentes, presentándose en el 53% y en el 80% respectivamente de los pacientes en estudio, del mismo modo pudieron comprobar la aparición de hirsutismo en el 15% e hiperplasia gingival en el 6% (OTA & BRADLEY, 1983) en contra Wisoky encuentra este efecto adverso en 1/3 de los pacientes que toman de forma crónica este fármaco (WYSOCKY et al., 1983).

#### I-8. CLASIFICACION DE LOS AGRANDAMIENTOS GINGIVALES

El aumento en el tamaño de la encía es un signo importante de enfermedad gingival, comúnmente a estas lesiones se les denominaba gingivitis hipertróficas aunque de forma incorrecta, pues ni todos se deben a inflamación, ni todos los agrandamientos son hipertrofias, es por ello que se prefiere hablar de AGRANDAMIENTOS GINGIVALES (A.G) (ROSTOCK et al., 1986); pues indica de forma objetiva la realidad clínica (CARRANZA Y CARRARO, 1978), (MATARASSO y cols., 1989).

Diferentes clasificaciones se han establecido atendiendo bien a factores etiológicos o histopatológicos, así:



## *Introducción*

Glickman (GLICKMAN & SAUNDERS, 1965), clasifica los A.G. en :

- Inflamatorios.
- No inflamatorios.
- Mixtos.

Merrit (MERRIT & PUTNAM, 1983), las divide en :

- Hereditarios.
- Inflamatorios.
- Hormonales.
- Neoplásicos.
- Iatrogénicos.
- Idiopáticos .

Carranza (CARRANZA Y CARRARO, 1978), realiza otra clasificación más completa basada en el substrato histopatológico, que es la que a continuación desarrollaremos:

- A.G. Inflamatorio.
- A.G. Combinado.
- A.G. Condicionado.
- A.G. Neoplásico.
- A.G. Del Desarrollo.
- A.G. Hiperplásico.

- **A.G. INFLAMATORIO:** Este A.G. es el resultado de cambios inflamatorios crónicos o agudos.

-- **A.G. INFLAMATORIO CRONICO:**

Es con mucho el más frecuente de los A.G., el acumulo de irritantes locales (sarro, placa bacteriana, obturaciones desbordantes, aparatos de ortodoncia, prótesis mal adaptadas, hábitos de presionarse la encía con la lengua) y respiración bucal (KLINGSBERG et al., 1962) mantenidos en el tiempo, producen primero una gingivitis y posteriormente un agrandamiento bien de la papila

## *Introducción*

o de la encía marginal de forma localizada o generalizada. (CARRANZA & PERRY, 1988).

La gingivitis o inflamación de la encía es la forma más común de enfermedad gingival y reconoce como factores etiológicos a la placa bacteriana y/o factores de irritación local que favorecen el acumulo de aquella (CARRANZA & PERRY, 1988).

Como estos mismos autores indicaron es necesario diferenciar entre inflamación y otros procesos patológicos al evaluar la patología gingival. El papel de la inflamación en casos individuales de gingivitis varía de la siguiente manera:

a) Inflamación gingival como único cambio patológico, es sin duda el tipo más frecuente de enfermedad gingival.

b) Inflamación secundaria superpuesta a un enfermedad gingival de origen general; p.e. la inflamación suele complicar a la H.G causada por la administración de CsA.

c) La inflamación puede ser el factor causal de los cambios clínicos en pacientes con afectación general, en los que por sí solo no producirían enfermedad gingival detectable clínicamente, la gingivitis del embarazo es un ejemplo de ello.

La epidemiología dental entendida como la ciencia que estudia el patrón y dinámica de las enfermedades dentales en una población humana, ha sido perjudicada a menudo por parámetros subjetivos de diagnóstico, de ahí la necesidad de los INDICES EPIDEMIOLOGICOS (CARRANZA, 1988), que definimos como instrumentos indispensables para cuantificar condiciones clínicas en escalas graduables, lo que facilita la comparación entre poblaciones examinadas bajo las mismas normas y métodos (BASCONES, 1985). Las normas que rigen los buenos índices epidemiológicos señalan que estos deben ser:

- Fáciles de emplear.
- Permitir el examen de un gran número de pacientes en cortos periodos de tiempo.

## *Introducción*

- Definir las condiciones clínicas de forma objetiva.
- Ser reproducibles.
- Ser susceptibles de análisis estadístico.

- Evaluación de la inflamación gingival.

La inflamación gingival puede evaluarse por medio de un índice, en el que el síntoma principal sea el sangrado del surco gingival bajo la acción suave de la sonda periodontal (MÜHLEMANN & SON, 1971). (INDICE DE SANGRADO DEL SURCO,(S.B.I).). Según este mismo autor, el índice de sangrado es el principal signo clínico de gingivitis y precede al enrojecimiento y tumefacción de las unidades gingivales.

La evidencia clínica ha demostrado que la distribución de la placa y los puntos de hemorragia, no siempre se corresponden entre sí. Loe y col. observaron que aunque pueden acumularse cantidades visibles de placa en 48 horas, la encía sana no muestra signos clínicos de inflamación hasta 10-14 días después de haber interrumpido todas las medidas de higiene bucal.

Muhlemann y Son demostraron un significativo aumento de los puntos de hemorragia ya a los 6 días de haber interrumpido todas las medidas de higiene oral. Han sugerido que debido a los periodos de quiescencia entre la formación de placa, la hemorragia y la inflamación clínica, puede encontrarse algo de placa en zonas en donde no existe sangrado, de eso infieren que la placa ha sido retenida en esa zona menos de 6 días, del mismo modo existe una zona libre de placa que muestra hemorragia, estas observaciones pueden sugerir que:

a) existe placa durante más de 6 días y su remoción aunque completa, todavía no ha traído como resultado la cicatrización total del epitelio ulcerado del surco.

b) el paciente eliminó completamente la placa antes de ir al consultorio dental, pero no lo hizo en la semana precedente.

- Evaluación de la higiene oral.

Se conocen múltiples índices para valorar la higiene oral, pero todos ellos se basan en la detección o no de la placa bacteriana (GREENE & VERMILLION, 1960).

Los índices de placa, según Bascones se utilizan para valorar:

- 1- Epidemiología de factores locales.
- 2- Control de higiene.
- 3- Estudios clínicos para valorar los métodos antiplaca utilizados.

(BASCONES, 1985).

La identificación de la placa puede hacerse por:

- a) Visualización directa con espejo y explorador.
- b) Visualización en m.o. recogiendo una muestra y viéndola en gota pendiente.
- c) Reveladores de placa.

El uso de sustancias reveladoras se hace imprescindible con objeto de visualizar el acumulo de placa de la forma más objetiva en toda su extensión (KATZ, 1986).

Entre estas sustancias tenemos (BASCONES, 1985):

- 1- Soluciones de mercurocromo y yodo: no se usan.
- 2- Soluciones alcohólicas de fucsina básica: se usan poco porque manchan lavabos y ropa.
- 3- Colorantes de eritrosina: tiñen menos que la fucsina, pero se eliminan rápidamente.
- 4- Colorantes bitonales: detectan placa antigua y reciente.
- 5- Colorantes fluorescentes: se hacen visibles con luz ultravioleta.

- A.G. INFLAMATORIO AGUDO.

Hace referencia este apartado de la clasificación de Carranza, a dos cuadros clínicos típicamente periodontales cuales son: el absceso gingival y el absceso periodontal.

- A.G. COMBINADO.

No es más que una H.G. a la que secundariamente se suman cambios inflamatorios por el acumulo de irritantes locales, favorecido por el buen lecho que supone el A.G. que aumenta la profundidad del surco gingival.

- A.G. CONDICIONADO.

Con este tipo de A.G., Carranza se refiere aquellos estados sistémicos peculiares en los que los tejidos gingivales exageran su respuesta frente a los irritantes locales, p.e.:

-- En el embarazo, la frecuencia del A.G. marginal suele ser del 10-70-% (HUGOSON, 1970), no es el propio embarazo el que causa el trastorno, sino que el metabolismo alterado de los tejidos acentúa la reacción a los irritantes locales.

-- En la pubertad y coincidiendo con los picos hormonales que esta época conlleva, tanto en hombres como en mujeres suelen presentar un aumento en sus papilas interproximales coincidiendo con focos de irritantes locales (CARRANZA & PERRY, 1988).

-- En el escorbuto se produce un hinchazón altamente sangrante de las encías, que adquiere un aspecto rojo violáceo con aparición de pseudomembranas en superficie (CRANDON, 1940).

-- En la leucemia mieloide aguda, se produce una infiltración por blastos en los tejidos gingivales,

## *Introducción*

que favorece junto con la inflamación el aumento del tamaño de los mismos (LYNCH & SHIP, 1967).

### - A.G. TUMORAL.

Responden a una etiología desconocida y pueden variar desde lesiones benignas (fibromas, papilomas) hasta tumores malignos (carcinomas, sarcomas).

### - A.G. DEL DESARROLLO.

Es un A.G. fisiológico que coincide con la erupción de la dentición definitiva.

### - A.G. HIPERPLASICO.

La hiperplasia gingival no inflamatoria es provocada por factores ajenos a la irritación local, no es frecuente y casi siempre reconoce una etiología iatrogénica:

- Ingesta de fenitoina: (VAN DER KWAST, 1956)
- Ingesta de CsA.: (CALNE et al., 1979)
- Ingesta de primidona: (SMITH et al., 1983), (LYNCH, 1984)
- Ingesta de valproato sódico: (SYRJANEM et al., 1979)
- Tratamiento con antagonistas del calcio: nifedipina (LEDERMAN et al., 1984), oxidipina (NYSKA et al., 1990), diltiacen (COLVARD et al., 1986).

### -- HIPERPLASIA POR HIDANTOINA

La fenitoina es considerada uno de los fármacos básicos en el tratamiento de las crisis epilépticas (MERRIT, 1938), (ZARRANZ, 1985) su utilidad está limitada por los efectos secundarios que produce, entre ellos el más importante por su frecuencia es el sobrecrecimiento gingival que aparece en el 40- 50% de los casos (ANGELOPOULOS, 1975), (VAN DER KWAST,

## *Introducción*

1956), (HASSELL et al., 1976), dos ó tres meses después de iniciarse el tratamiento alcanzando el máximo desarrollo entre los nueve doce meses, varía desde una ligera tumefacción de las encías a una gran hiperplasia que cubre casi completamente los dientes (GLASER, 1982), (CALNE, 1979). La hiperplasia gingival por hidantoinas ha sido estudiada por numerosos investigadores, sin embargo, a pesar de existir alrededor de 1500 publicaciones en la literatura mundial sobre el tema, su etiopatogénia permanece oscura (HASSELL et al., 1984). En nuestro país se han producido algunas interesantes aportaciones sobre este tema (FERNANDEZ, 1966), (MARTOS Y TAMARGO, 1984), (SAMPEDRO y cols., 1985), (PEÑARROCHA y cols., 1986); la susceptibilidad ha desarrollar esta lesión parece genéticamente determinada (HASSELL & GILBERT, 1983) y sobre esta predisposición podría actuar unos factores etiológicos añadidos como:

a) El grado de higiene oral, algunos estudios demuestran una clara relación entre la higiene oral y hiperplasia gingival (VAN DER WALL et al., 1985), (RAS 1963), (PANUSKA et al., 1960), (CIANCIO et al., 1972), (PHILSTROM et al., 1980) mientras que para otros la higiene oral no influiría de modo importante en el grado de hiperplasia (KLAR, 1973), (STEINBERG, 1980) ya que se da la circunstancia de que pacientes con pésima higiene no desarrollan hiperplasia; por el contrario en otros, se observa un acusado engrosamiento a pesar de una excelente higiene oral.

b) La dosis del fármaco (KLAR, 1973) o el tiempo de administración del mismo (KLAR, 1973), (RAS, 1963) que también determinaría la severidad de la lesión, aunque esta opinión no está unánimemente aceptada (PEÑARROCHA y cols., 1989).

Aunque el mecanismo íntimo esta todavía por dilucidar existen varias hipótesis:

- 1- Supresión de la actividad adrenocortical.
- 2- Reacción de hipersensibilidad.
- 3- Irritación local, causada por el medicamento secretado a través de la saliva.
- 4- Estimulación selectiva de clonas de fibroblastos y de su síntesis proteica, (HASSELL et al., 1984).
- 5- Alteración en el metabolismo del calcio con inducción de la colagenasa inactiva, (ANGELOPOULOS, 1975), (HASSELL et al., 1976).

A) CLINICA.

El comienzo es un agrandamiento indoloro, globular, localizado en la encía marginal y la papila interdientaria; conforme avanza la lesión los agrandamientos marginal y papilar se unen formando un cordón macizo que cubre parte de las coronas. Cuando no hay infección sobreañadida, la lesión tiene forma de mora, es firme, con una superficie lobulada y elástica de color rosa pálido, sin tendencia a sangrar (VAN DER WALL et al., 1985), (ESTERBERG & WHITE 1945), (GLICKMAN & SAUNDERS 1965).

Por lo general se presenta de forma generalizada siendo más intensa en las zonas anteriores y no apreciándose en encías edéntulas. Su avance es crónico pero progresivo, llegando a veces a interferir la oclusión, o se hace tan desagradable a la vista que el paciente solicita atención.

A medida que aumentan los índices de inflamación gingival: tono, color, sangrado, se aumenta el grado de hiperplasia, aunque quizás sea más una complicación que un factor de inicio. Interesantes trabajos de Ciencio de 1972 y Philstron de 1980 llegaron a la conclusión que la hiperplasia puede ser minimizada disminuyendo la inflamación de la encía con absoluto control de la placa dental mediante una buena higiene.

Se ha comprobado que en la saliva de estos pacientes hay cantidades de fenitoina proporcionales a la intensidad de la hiperplasia (BABCOCK, 1965), (LITTLE et al., 1975), (ADDY et al., 1982) no obstante al extirpar la parótida en animales de experimentación, no se ha visto que haya afectado al agrandamiento, por lo que no hay consenso en la teoría dosis- intensidad del mismo como observaron otros autores (BUCHTHAL & SUENSMARK, 1960), (CIANCIO et al., 1972), (STEINBERG, 1980), (PHILSTROM et al., 1980)



## **B) ANATOMIA PATOLOGICA.**

El epitelio de revestimiento superficial muestra acantosis y espongiosis focal, y el tejido conjuntivo subyacente contiene abundantes estructuras vasculares, diferenciándose dos áreas, una rica en fibras de colágeno y otra con cambios mixoides, más evidentes en la zona subepitelial. El componente celular linfoide acompañante, corresponde a células plasmáticas y linfocitos, de distribución mayoritaria por las áreas mixoides (HASSELL & COOPE 1980), (PEÑARROCHA y cols., 1989).

## **C) TRATAMIENTO.**

En pacientes con hiperplasia leve o moderada es aconsejable realizar una preparación inicial (detartaje, curetaje, y raspados periódicos ), además de una correcta higiene del paciente mediante cepillados y empleo de seda dental en su domicilio.

En agrandamientos intensos: aparte de las medidas recomendadas en el apartado anterior, se efectuará una gingivectomía, aunque el crecimiento gingival recidiva si el paciente continua con la medicación.

### **- HIPERPLASIA POR ANTAGONISTAS DEL CALCIO.**

El grupo de los antagonistas del calcio (AC), ha tenido un gran impacto en la terapéutica clínica, sobretodo cardiovascular, en los últimos años, estos medicamentos son heterogéneos en su estructura y propiedades farmacológicas, pero tienen un mecanismo común a nivel del transporte del calcio por la membrana celular en varios tejidos (KENNY, 1985).

Además de reducir la concentración intracelular de calcio, tienen una acción selectiva bloqueadora de los canales de interiorización del calcio dependiente a su vez del voltaje que registra el músculo

## *Introducción*

liso vascular en cada momento. Debido a que este segundo mecanismo parece desempeñar un papel preponderante, los fármacos calcioantagonistas se clasifican atendiendo a su afinidad por bloquear los canales del calcio (WOOD, 1989), (GASSER, 1989) en:

a) Alta especificidad, verapamilo, nifedipino y sus derivados, oxidipina, diltiacen e isradipina. Estos compuestos actúan bloqueando específicamente los canales lentos del calcio sin afectar de manera importante los canales rápidos de NA, y producen una inhibición de la despolarización de fibras musculares, sin afectar a los fenómenos bioeléctricos dependientes del magnesio. Además estos compuestos pueden unirse estereoespecíficamente a receptores y proteínas transportadoras de calcio que actúan indirectamente atrapando a este ión intracitoplásmico.

- El nifedipino (NI), tiene una acción preferentemente vascular (coronaria y periférica) pero carece de efecto sobre el sistema de conducción.

- Verapamilo (VE), y diltiacen (DI) producen vasodilatación en menor grado, pero reducen la conducción sinoauricular y auriculoventricular y deprimen en mayor grado la contractilidad y la frecuencia cardíaca.

Estos fármacos se utilizan fundamentalmente a nivel cardiovascular en angina de pecho, arritmias, e hipertensión, también se ha propuesto su utilización en otras situaciones como infarto de miocardio, cirugía cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva etc...

La mayoría de los efectos secundarios y contraindicaciones de estos medicamentos derivan de sus propiedades farmacológicas, siendo especialmente graves las relacionadas con el sistema de conducción (KENNY 1985), se han descrito casos de bloqueo AV, asistolias, y bradicardia en pacientes tratados con VE o DI, especialmente en pacientes con antecedentes de alteraciones de este tipo (KENNY 1985), (LARACHA & CAELIS, 1986), (LAM et al., 1986); tampoco deberían utilizarse en pacientes con alteraciones del seno, bloqueo AV, bradicardia o insuficiencia cardíaca, en estos casos sería preferible utilizar NI . El NI no afecta el sistema de conducción, pero al contrario que el VE, DI puede producir taquicardia reflejas y por efecto vasodilatador cefaleas, enrojecimiento facial, mareos y palpitaciones.

## *Introducción*

b) De baja especificidad: incluye la prenilamina, cinaricina y bapridil entre otros. Todos ellos, al contrario que los del grupo anterior, interfieren tanto con los canales rápidos de Na como con el papel del Mg en la generación de potencial transmembrana.

De los calcioantagonistas actualmente comercializados, tan solo la NI (RAMON et al., 1984), (LUCAS y cols., 1984), DI (COLVARD et al., 1986) y muy recientemente, la oxidipina (NYSKA et al., 1990), han demostrado capacidad para inducir la hiperplasia gingival, no evidenciándose este hecho con el verapamilo (RAMON et al., 1984).

En 1984, Lederman y cols publicaron el primer caso de hiperplasia gingival asociado al tratamiento con NI, después han sido varias las comunicaciones que han hecho mención de esta asociación (LOCK, 1985), (KHURNI, 1987).

### A) CLINICA.

En la exploración bucal se observa un agrandamiento de la encía maxilar y mandibular, especialmente en el área anterior y a nivel de las papilas interdetales, el aspecto es lobulado y no sangran a no ser que exista inflamación asociada.

El estudio anatomopatológico de este tejido hiperplásico muestra un aumento de la trama de colágena y del número de fibroblastos junto con una infiltración moderada de células plasmáticas. Es decir, desde el punto de vista clínico e histológico esta hiperplasia es indistinguible de la hiperplasia gingival secundaria a hidantoinas (LEDERMAN et al., 1984). Con ambos fármacos la hiperplasia es más marcada en la encía vestibular de los dientes anteriores, no se presenta en la encía de las áreas edéntulas, desaparece al suspender el medicamento y recurre al reiniciar su administración (VAN DER WALL et al., 1985). Tanto las hidantoinas como la NI tienen la capacidad de alterar el metabolismo y flujo del Ca a nivel celular, esta disminución de calcio impediría que este inhibiera la acción de la colageno-sintetasa y la consiguiente síntesis de colágeno

(SHAFTIC et al., 1986).

No conocemos el mecanismo de acción real, aunque sí podemos constatar que la situación general del paciente, el nivel de higiene oral del mismo, como la dosis de medicamento que toma se debería de tener en cuenta a la hora de establecer un tratamiento a largo plazo con esta droga, aconsejándose revisiones periódicas de los mismos por parte del estomatólogo incluyendo normas de higiene, raspado y alisado radicular e incluso gingivectomías dependiendo del estado particular del paciente a tratar (GONZALEZ-JARANAY Y MESA, 1991).

#### - HIPERPLASIA POR CICLOSPORINA A.

En relación con las complicaciones orales de la ingesta crónica de CsA, la de mayor relevancia es el agrandamiento gingival documentado en el año 1983 por Ratteitschak et al., aunque mencionada anteriormente por Calne et al. en 1979 y otros autores (NUSSENBLATT et al., 1983). Esta alteración tiene una importante número de sinonimias: hiperplasia (BENNETT & CHRISTIAN, 1985), hiperplasia fibrosa (WY SOCKY et al., 1983), hipertrofia (RYFFEL, 1982), agrandamientos, enlargement y sobrecrecimiento gingival (overgrowth) (BARTOLD, 1987). El término más común por el que es conocido es el de hiperplasia gingival (HG).

Su incidencia es variable según la fuente de información oscilando entre el 3,49% (SANDOZ LABORATORIES 1983), y el 70% (WY SOCKY et al., 1983), (FRISKOPP et al., 1986).

El mecanismo patogénico a través del cual la CSA induce HG es desconocido. En este sentido han sido aportadas diferentes teorías al respecto:

1) Efecto directo del medicamento sobre los fibroblastos de manera análoga a lo que acontece con la fenitoina (WILLERHAUSEN, 1989), (PASCUALIN y cols., 1990).

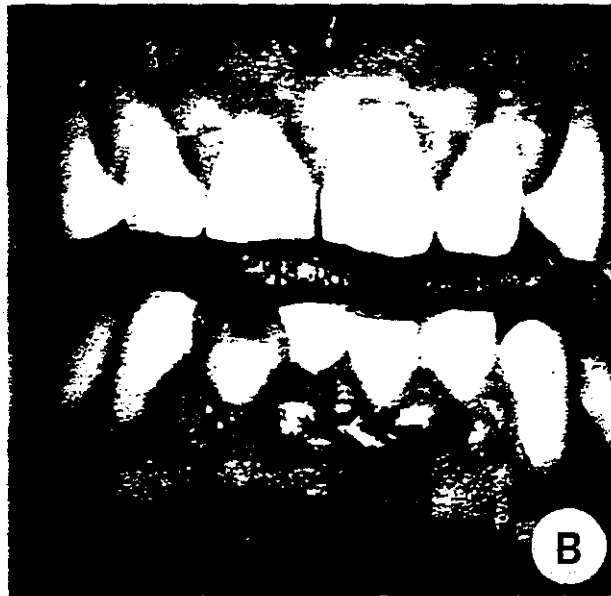
2) Efecto de hipersensibilidad individual al fármaco (WY SOCKY et al., 1983); a su vez la intensidad de la misma relacionaría en cierta medida con la existencia de irritantes gingivales

FIGURA 1. HIPERPLASIA GINGIVAL SECUNDARIA A LA INGESTA DE  
*CICLOSPORINA A.*

*1 A. Hiperplasia gingival leve.*

*1 B. Hiperplasia gingival moderada.*

*1 C. Hiperplasia gingival severa.*



## *Introducción*

(placa y cálculos dentales, restauraciones imperfectas sobreextendidas y/o los efectos de una respiración bucal mantenida, hábitos, correctores de ortodoncia, prótesis mal adaptadas, maloclusiones etc), que provocan un aumento de la respuesta inflamatoria, hipótesis más probable (WYSOCKY et al., 1983), (DALEY & WYSOCKY, 1984b), (DALEY et al., 1986), (ROSTOCK et al. 1986).

3) La reducción de la actividad del sistema inmune propia del fármaco, que a nivel gingival provocaría un aumento de la receptividad de este tejido frente a estímulos crónicos inespecíficos (sarro,placa) (PASCUALIN y cols., 1990) agentes bacterianos e infecciones repetidas (BARTOLD, 1987).

4) Pascualin y colaboradores, citan como otro posible mecanismo patogénico de la CSA en la HG, la interferencia en la síntesis de prostaglandinas y la consecuente alteración de la microcirculación, (PASCUALIN y cols., 1990).

### A) CLINICA

El sobrecrecimiento es más frecuente en jóvenes que en adultos (PASCUALIN y cols., 1990), sin afectar esta circunstancia a la gravedad de la misma, se manifiesta a partir de los tres primeros meses de la administración del fármaco (WYSOCKY et al., 1983), y alcanza su máxima gravedad a los 24 meses (PASCUALIN y cols., 1990), (GONZALEZ-JARANAY Y MESA, 1991) de tratamiento.

Ryffel y colaboradores, observaron en estudios en perros que la hiperplasia era más frecuente e intensa al aumentar la dosis de Csa, aunque este dato no está suficientemente contrastado.

## *Introducción*

En la exploración oral se observa un agrandamiento localizado básicamente en un principio, en la papila interdental para extenderse a continuación a todos los segmentos anteriores de la arcada dentaria .(DALEY & WY SOCKY, 1984b), el agrandamiento gingival es lobulado y móvil, de aspecto eritemato–edematoso sin tendencia a la hemorragia espontánea (ROSTOCK et al., 1986), salvo que exista inflamación asociada.

En los casos progresivamente más graves, la hiperplasia afecta a las papilas, al borde libre y a la encía restante queratinizada en zonas localizadas o de manera difusa, llegando a cubrir la corona clínica del diente y dificultando la oclusión (PASCUALIN y cols., 1990). Más adelante este cuadro clínico progresa apareciendo una inflamación crónica inespecífica mantenida por la acumulación de placa y sarro supra e infragingival.

Por consiguiente el agrandamiento gingival por CsA suele presentarse de manera muy similar al producido por la ingestión de fenitoínas, valproato, primidona, nifedipina etc.

## **B) ANATOMIA PATOLOGICA.**

En este tipo de lesiones lo que existe es una auténtica hiperplasia, por estar aumentado el número de células y no el tamaño de las mismas (hipertrofia).

El epitelio gingival aparece en áreas engrosado, con límite interno festoneado y un gran desarrollo del conectivo subyacente, en el seno del cual se objetiva un denso infiltrado linfoplasmocitario. El engrosamiento epitelial corresponde a una hiperplasia de crestas interpapilares con prolongaciones digitiformes en el conjuntivo subyacente, con acantosis, hiperqueratosis y paraqueratosis. La mayoría de los autores (TRAEGER et al., 1984) coinciden en la existencia de un infiltrado inflamatorio formado por linfocitos y células plamáticas. El nivel normal de la unión epitelial de la encía no suele estar alterado; así pues el aumento en la profundidad de la bolsa traduciría la presencia de pseudobolsas alrededor de la corona clínica del diente.



**C) TRATAMIENTO.**

En lo que respecta a la profilaxis de la hiperplasia, su desarrollo y progresión podría ser paliado usando el protocolo establecido por Daley, (DALEY & WYSOCKY, 1984a), que se centra en una higiene oral extremada. El sobrecrecimiento gingival favorece el desarrollo de focos sépticos a este nivel, lo que conlleva un aumento del riesgo en sujetos inmunodeprimidos como son la mayoría de los pacientes tratados con este fármaco; por tanto su prevención debe de ser una labor prioritaria en ellos.

A parte de las medidas profilácticas reseñadas, en los casos graves y por razones estéticas, de oclusión etc, se hará necesaria la realización de gingivectomías por sectores. Si preveemos que el tratamiento con el fármaco se va a suspender, está indicado esperar al menos seis meses antes de planificar un tratamiento definitivo, ya que la regresión espontánea generalmente tiene lugar en estos casos .

**I-9. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUCCION DE HIPERPLASIA GINGIVAL**

Recientemente Seibel y colaboradores han conseguido inducir sobrecrecimiento gingival en perros de dos años de la raza sabueso "beagle" tras el tratamiento diario con ciclosporina A a dosis de 30 mg/Kg por via oral (SEIBEL et al., 1989).

De los 12 animales empleados, 5 (42%) desarrollaron HG a partir de la tercera semana, puesta de manifiesto por un aumento de tamaño de las papilas interdentarias con progresiva ocultación de la superficie dental descubierta alrededor de la sexta semana.

Macroscópicamente se caracteriza la HG, experimentalmente inducida, por acontecer en el borde labial de la arcada dentaria mandibular anterior no desarrollándose ni en la arcada maxilar ni en la región posterior de ambas. La encía hiperplásica es de forma lobulada, consistencia

## *Introducción*

firme y sangrante al contacto. Microscópicamente el epitelio escamoso muestra paraqueratosis con acantosis y un intrincado dibujo de crestas papilares finas y elongadas que se introducen en el corion mucoso estableciendo puentes de morfología irregular en la zonas más profundas. Aparentemente la proporción de tejido conectivo es mayor en los animales que presentan HG que en los que no responden así como en los controles. El infiltrado inflamatorio presente básicamente está compuesto por células plasmáticas y algunos linfocitos. Todas estas características del modelo experimental son muy similares a las que presentan los enfermos sometidos a tratamiento crónico con CsA que desarrollan HG.

De igual forma, la HG regresa rápidamente y de forma espontanea dos semanas después de suspender la medicación.

Con anterioridad se ha descrito la generación de HG en gatos tras la administración de CsA a la dosis de 20mg/kg/día, como efecto secundario al tratamiento prolongado con la misma, observándose una frecuencia del 10%. (LATIMER et al., 1986).

Un segundo modelo experimental, en esta ocasión en ratas Fischer, ha sido obtenido por Kitamura y colaboradores mediante la administración de una dieta inductora de caries, rica en sucrosa (56%) -dieta nº 2000-, suplementada con CsA (120 mg/Kg y posteriormente 200 mg/Kg). Igualmente se indujo HG en el grupo de ratas que además fue infectado con estreptococcus sobinus 6715 (KITAMURA et al., 1990).

Este modelo difiere escasamente del anterior tanto en sus peculiaridades macro como microscópicas. Cabe destacar que se evidencia HG en la encía de los molares mandibulares y que el infiltrado inflamatorio presente es más evidente en aquellos lotes de animales sobreinfectados con la cepa de streptococcus.

Un tercer modelo experimental, ahora en gatos, ha sido obtenido por Latimer y

colaboradores, administraron a 10 gatos durante 28 días consecutivos, una dosis oral de 20 mg/kg

**I-10. INTRODUCCION GENERAL AL ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES.  
ANALISIS DE IMAGENES DIGITALIZADAS, FUNDAMENTOS BASICOS  
SOBRE DIGITALIZACION Y TRATAMIENTO DE IMAGENES.**

El extraordinario desarrollo que ha experimentado la tecnología informática tanto en lo que respecta al soporte específico de los ordenadores (hardware), como a los programas de trabajo y análisis de la información (software), han conducido a una difusión masiva del ordenador personal como instrumento básico de trabajo y al abaratamiento creciente de sus costes.

Aunque la aproximación conceptual al análisis de imágenes por ordenador es relativamente simple, los fundamentos lógicos e informáticos del proceso ya no lo son tanto.

De forma general, todo sistema de tratamiento de imágenes por ordenador consta de los siguientes elementos:

- Dispositivo de captación de la imagen.
- Procesador digital que la transforma para hacer asequible su manejo por un sistema informático.
- Dispositivo de presentación de la imagen.
- Sistema de almacenamiento y/o de transmisión de imágenes.
- Ordenador que se encarga de ejecutar los programas de análisis y manipular las imágenes hasta obtener los resultados previstos.

**I-10.1. ADQUISICION DE LAS IMAGENES.**

En el campo de la morfología microscópica, la captación de las imágenes se realiza mediante una cámara de televisión, el microdensitómetro o un scanner. Todos estos instrumentos tienen en común la propiedad de medir con una fotocélula o dispositivo similar, la cantidad de luz

## *Introducción*

que porta un haz elemental transmitido por la imagen a muestrear. El resultado punto a punto de la exploración es recogido por el sensor y enviado a la tarjeta digitalizadora (BACUS & GRACE, 1987).

En otras ocasiones, la luz reflejada es recogida por una cámara de televisión funcionando mediante sensores situados en celdillas independientes (sistema CCD) (SMEULDERS & KATE, 1987), (FERRER-ROCA, 1990).

En caso de trabajar con imagen en color real, la observación se realiza a través de un sistema PAL compuesto con separación automática de los colores que funciona mediante la captación independiente de cada una de las bandas cromáticas elementales (roja, verde y azul).

### I-10.2. DIGITALIZACION DE LA IMAGEN.

La imagen digital, se obtiene a través de la cuantificación de la amplitud de una imagen discreta. El número de valores posibles para definir la amplitud depende del número de dits empleados en la codificación.

Esta última circunstancia no es constante para todos los sistemas de análisis ya que depende del tipo de imagen a digitalizar. En el caso de imágenes complejas con amplia gama de grises como es el caso de las histológicas o las estudiadas en morfología, se están utilizando por convención, ocho bits para almacenar en la información relativa a la luminosidad de cada punto del objeto, por lo cual el valor máximo codificado será igual a  $2^8=256$ . Por convención, una intensidad 0 es igual negro mientras que el valor 255 equivale al blanco (SMEULDERS & KATE, 1987). Los restantes valores constituyen la escala de grises (en conjunto 256 niveles o tonos distintos), en que ha de ser convertida la luminosidad de cualquier punto de la imagen. A este proceso de conversión se denomina transformación digital (FERRER-ROCA, 1990).

## *Introducción*

En el caso de la imagen en color real, el proceso se realiza de forma equivalente aunque a partir de las tres imágenes monocromas en que se descompone la imagen multibanda inicial (rojo, verde y azul), lo que equivale a realizar el proceso anteriormente descrito sobre tres imágenes, que una vez procesadas se superponen para recomponer la inicial.

### **I-10.3. PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE LAS IMAGENES.**

La primera intervención que puede realizarse sobre una imagen a través de un sistema de análisis automático, es la aplicación de determinados operadores que contribuyen a mejorar o modificar algunos aspectos de la imagen inicial. Atendiendo al número de elementos de la imagen inicial que intervienen en el cálculo de cada elemento de la imagen final, pueden distinguirse (GONZALEZ & WINTZ, 1987):

- Operadores puntuales.
- Operadores locales.
- Operadores globales.

#### **I-10.3.1. TECNICAS DE ANALISIS DE IMAGEN MEDIANTE OPERADORES PUNTUALES.**

Los operadores puntuales pueden modificar pixel a pixel tanto la luminosidad (amplitud) como sus coordenadas geométricas.

Las modificaciones en la amplitud de la imagen se realizan para cumplir dos objetivos fundamentales: 1) Provocar su realce y mejorar su representación visual, por lo general aumentando el contraste. 2) Corregir alteraciones, fundamentalmente eliminando las zonas con iluminación deficiente.

## *Introducción*

El primer paso para realzar una imagen es realizar el histograma de grises de la imagen inicial. En esta representación gráfica el ordenador muestra el número de píxeles de la imagen asociados a cada uno de los 256 niveles posibles de gris, lo cual es una información sumamente útil sobre la composición digital de la imagen. Comúnmente, en el histograma aparecen picos bien definidos de los tonos de gris que predominan en la imagen, de forma que es posible seleccionar aquellos que corresponden a las estructuras de objeto de análisis.

El subsiguiente aumento del contraste se obtiene al expandir el histograma de la banda seleccionada hasta ocupar de nuevo todo el espectro posible en la imagen final a través de un proceso denominado ecualización.

La eliminación de las sombras y artefactos producidos por una iluminación deficiente del objeto es otra operación relativamente sencilla que está al alcance de los sistemas automáticos de análisis de imagen. Se realiza por un procedimiento análogo al anterior, de forma que primero se realiza una captura de la luminosidad del fondo y, el histograma obtenido, se resta pixel a pixel a la imagen de trabajo a través de un operador puntual (FERRER-ROCA, 1990).

### I-10.3.2. TECNICAS DE ANALISIS DE IMAGEN MEDIANTE OPERADORES LOCALES.

Este tipo de operaciones sobre las imágenes se realizan con dos objetivos fundamentales: 1) Producir un filtrado de las mismas eliminando determinadas frecuencias contaminantes y 2) Provocar un realce específico de los bordes de la imagen con objeto de obtener un resultado final que sea subjetivamente más agradable.

Ambos tipos de operaciones se realizan mediante la aplicación a la imagen inicial de filtros digitales que la suavizan eliminando ruido y corrigiendo errores de transmisión (GONZALEZ & WINTZ, 1987), (PRATT, 1978).

### **I-10.3.3. TECNICAS DE ANALISIS DE IMAGEN MENDIANTE OPERADORES GLOBALES**

Se realizan básicamente a través de la aplicación de transformaciones bidimensionales por las que se establece una relación biunívoca entre dos espacios distintos (p.e., la proyección de una imagen tridimensional en un eje de coordenadas trigonométricas o, viceversa, la reconstrucción tridimensional de un objeto a partir del muestreo de una imagen plana (FREEMAN, 1961). Además con estos operadores conseguimos:

- 1) Extracción de información de la imagen mediante análisis matemático.
- 2) Reducción de la redundancia o solapamiento de bandas superpuestas en imágenes multibanda.
- 3) Eliminación de degradaciones de la imagen (desenfoque, defectos de curvatura..).

### **I-10.4. SEGMENTACION Y CLASIFICACION DE LA IMAGEN.**

El concepto de segmentación de una imagen hace referencia a la selección del componente de la misma que va a ser objeto de análisis. En la práctica, este procedimiento consiste en aplicar a la imagen un umbral de discriminación por el cual todos los píxeles situados dentro de dicho umbral son considerados como parte del objeto y el resto son tratados como ruido. En el fondo, todo se reduce a colocar los píxeles seleccionados en blanco y los rechazados en negro, por lo cual el resultado final es una imagen binaria en dos tonos (ABMAYR et al., 1987).

Aunque los fundamentos de segmentación son equivalentes para las imágenes en blanco y negro y color, la realización práctica del proceso es absolutamente distinta. En principio, la segmentación es mucho más fácil sobre una imagen gris que coloreada. Ello es debido a que, en el primer caso, la selección se realiza sobre 256 tonos de gris, lo cual si bien es más inexacto ( dos colores distintos pueden tener tonalidad de gris no discriminativa) es más sencillo y rápido. Por el contrario la segmentación en color real con 16 millones de posibilidades distintas de cromaticidad, hace más tedioso el proceso.

## I-10.5. PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN BINARIA.

Sobre una imagen segmentada pueden aplicarse, aparte de todos los operadores de imagen antes mencionados, métodos de morfología matemática cuales son (HARRIS et al., 1982) (HARMS et al., 1986):

- 1) Técnicas de erosión-dilatación.
- 2) Esqueletización.

En la erosión de un objeto, se realiza la eliminación de la capa de píxeles situada superficialmente sobre el mismo, de forma equivalente a lo que supondría pelar un cebolla . Mediante esta manipulación, inicialmente se hace desaparecer las irregularidades más sutiles de la superficie de los objetos, por lo que la erosión se considera útil para individualizar objetos que se encuentran en contacto.

La dilatación es la función inversa a la erosión, de forma que mediante ella, se añade al objeto una capa superficial de píxeles agrandando su tamaño, con ello unimos objetos independientes o rellenamos pequeñas oquedades de la imagen primaria.

La esqueletización de una imagen binaria consiste en reducir toda la información contenida en ella a unos ejes principales de referencia a través del adelgazamiento progresivo de la estructura a esqueletizar hasta alcanzar la configuración de una línea de un solo píxel de espesor. De esta forma un esqueleto simple y sin ramificaciones informa de una imagen de morfología sencilla, y lo contrario si tenemos un esqueleto ramificado y arborescente.

## I-10.6. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS ANALITICOS

En lo que respecta a la presentación y análisis de los resultados obtenidos mediante el estudio de imágenes digitalizadas, cualquiera de los modernos sistemas puede utilizarse para:



## ***Introducción***

- 1) Practicar estudios de morfometría clásica sobre las imágenes segmentadas y obtener información sobre la longitud, perímetro, área, número de partículas existentes, orientación y centro de masa de los objetos problema (granulometría) (GIARETTI et al., 1983).
- 2) Establecer criterios sobre la forma y grado de complejidad de la superficie de los objetos, incluyendo operaciones de morfología matemática que proporcionan información sobre sus relaciones, periodicidad, distribución espacial, etc. Dentro de este campo, es posible realizar reconstrucciones volumétricas tridimensionales a partir de cortes seriados de las estructuras a valorar (estereología) (FERRER-ROCA, 1986).
- 3) Realizar estudios sobre la densidad óptica integrada de estructuras histológicas, como es el caso de los núcleos celulares (densitometría), en cuya base se encuentra el futuro desarrollo de sistemas para el diagnóstico citológico automático de las neoplasias malignas (MCCREADY & PAPADIMITRIOV, 1983), (FERRER-ROCA et al., 1988).

Asimismo, mediante densitometría puede realizarse cuantificación de receptores celulares medidos por técnicas de coloración inmunohistoquímica (PRESSMAN, 1976), (SKLAREW & PERTSCHUK, 1987), (FERRER-ROCA et al., 1988) (por ejemplo, receptores estrogénicos en cáncer de mama, antígeno Ki-67 de proliferación celular en neoplasias malignas, receptores de superficie linfocitaria, etc.) siempre y cuando el método utilizado sea estequiométrico respecto al receptor (ó lo que es igual que por cada molécula existente de receptor tan solo se produzca la fijación inmunoquímica de una molécula de cromógeno), como es el caso de la inmunoperoxidasa indirecta con puente único (STERNBERGER & STERNBERGER, 1986).

- 4) Valorar mediante colorimetría directa la tinción estructural y citológica de los tejidos, uno de cuyos ejemplos más clásicos podría ser la cuantificación de cianofilia ó eosinofilia por parte de las células superficiales en los frotis vaginales ó la valoración de tinciones

## *Introducción*

hematológicas en médula ósea (KUNZE ET AL, 1980), (FERRER-ROCA et al., 1988A) (G<sup>a</sup> DEL MORAL Y O'VALLE, 1992).

### I-11. ESTUDIO INMUNOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO DE SUBPOBLACIONES LEUCOCITARIAS.

En 1975, se describe la técnica de producción de anticuerpos monoclonales. Básicamente, la idea surgió sobre los estudios de diversificación clonal que propiciaron, entre otros, Milstein y Köhler (MILSTEIN & KÖHLER, 1975). Se fundamenta en fusionar dos células que aportan cada una de ellas una característica precisa: Una célula tumoral de estirpe linfoide (mieloma), que aporta la capacidad de crecer indefinidamente y, por otro lado una célula productora de anticuerpos, extraída de un animal inmunizado con un determinado antígeno, que aporta la especificidad autógena concreta. De la fusión se obtiene un *Híbridoma*, que tras su selección clonal, es capaz de producir indefinidamente anticuerpos con idénticas características moleculares y alta especificidad. De este modo, gracias a la manipulación de los híbridomas, se logra obtener una fuente de producción de anticuerpos de aplicación en investigación y diagnóstico en el área de Biología molecular, Inmunología y Anatomía Patológica.

En Anatomía patológica y en general en el ámbito de las ciencias biológicas, el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, desde el año 1979 que se describiera el primer antígeno de diferenciación celular, ha supuesto un gran avance en el conocimiento del comportamiento de múltiples moléculas que han facilitado el fenotipaje de las poblaciones leucocitarias y el reconocimiento de la intimidad molecular de las células mediante la utilización de diversos métodos entre las que destacan las técnicas inmunoenzimáticas.

En 1982, se celebra en París el primer "Workshop" internacional sobre marcadores de diferenciación en leucocitos humanos (CD), donde se aportaron 150 Ac. monoclonales. Posteriormente, en el año 1989 se lleva a cabo el IV "Workshop" donde se analizaron 1000 Ac.

## *Introducción*

monoclonales. En la actualidad, el estudio de estos marcadores ha permitido identificar su localización, configuración estructura y distribución e identificar, en alguna medida, su función.

A tenor de lo expuesto y con respecto a las subpoblaciones linfoides que intervienen en los mecanismos de respuesta inmunitarios, que están involucrados o pueden ser modulados por el tratamiento continuado con inmunosupresores, vamos a reseñar los determinantes antigénicos que las identifican, deteniéndonos en los de mayor interés:

### **I-11.1. Grupos de diferenciación de leucocitos humanos (CD) (Cluster of Differentiation).**

Con la finalidad de unificar la terminología de los marcadores de diferenciación leucocitaria se crearon los CD, que definen a distintos grupos de antígenos, en general incluyen tres o más anticuerpos monoclonales cada uno, dirigidos contra la misma molécula, si bien hacia diferente determinante antigénico o epitopo de la misma.

#### **I-11.1.1. Grupo de diferenciación de células T:**

CD3: Reconoce al complejo T3, de enorme importancia desde el punto de vista funcional, correspondiente a un heterodímero compuesto por dos glicoproteínas de 20 y 25 KD unidas por una proteína de 20 KD. Se expresa en todos los linfocitos T (HOOKE et al., 1987) desde el estadio de timocito tanto en las células T normales como neoplásicas.

CD4: Reconoce la molécula T4 de 55 KD, presente en la subpoblación T con función de inducción-cooperación de la respuesta inmune, algunos macrófagos y células de Langherans. Está ligado a los fenómenos de interacción de la respuesta inmune por antígenos del MHC de clase II (ACEVEDO, 1988), (SANCHEZ MADRID y cols., 1989).

CD8: Reconoce la molécula T8 de 34 KD presente en una subpoblación de linfocitos T con

## ***Introducción***

funciones citotóxicas que está implicada en la interacción con antígenos del MHC de clase I y localizados en la corteza y médula tímica así como circulantes. además se expresa en una subpoblación de células NK (ACEVEDO, 1988).

### **I-11.1.2. Grupo de diferenciación de células B:**

CD22: Reconoce un antígeno protéico de 135 KD restringido a los linfocitos B (en nuestro caso el AcMo. utilizado es el L-26 que reconoce a una fracción de 35 KD de la molécula antigénica completa). También se denominado Pan-B porque es expresado a nivel de membrana citoplasmática en células pre B y en células B maduras, desapareciendo, en parte, tras la activación y ausente en las células plasmáticas. sin embargo está presente en el citoplasma de todas las células B inmaduras tanto normales como en sus contrapartidas tumorales.

CD10: Se une específicamente al antígeno CALLA de 100 KD, presente en células B inmaduras, tanto  $\mu\text{c}^+$  y  $\mu\text{c}^-$  y del centrofolicular, algunas células plasmáticas medulares, granulocitos y en la contrapartida tumoral células de mieloma y leucemias y linfomas de origen B.

### **I-11.1.3. Grupo de diferenciación de linaje no específico:**

CD45: Reconoce al antígeno común leucocitario (equivalente a la molécula murina T200). Estos anticuerpos reaccionan con todas las células linfoides y mieloides y no se conoce reactividad con estructuras no hematopoyéticas.

### **I-11.1.4. Grupo de diferenciación de linaje específico:**

CD16: Anticuerpo dirigido contra el receptor de baja afinidad del fragmento Fc $\gamma$ , una molécula de 50-70 KD, presente en neutrófilos, algunos macrófagos; pero fundamentalmente en células Killer y Natural Killer (NK) de las cuales son un excelente marcador. (ACEVEDO, 1988) , (SANCHEZ MADRID y cols., 1989).

## ***Introducción***

CD57: Es una Inmunoglobulina G<sub>1</sub> monoclonal dirigida frente a un polipéptido 12 KD dentro de una estructura protéica de varias cadenas. Especialmente detecta monocitos y macrófagos incluyendo histiocitos tisulares especializados.

CD68: Es un anticuerpo que reconoce una gp de 110 KD, que de acuerdo con el patrón de tinción se encuentra en los gránulos citoplasmáticos y está presente en la mayoría de los monocitos-macrófagos, mastocitos, células epiteloides y multinucleadas (STOCKINGER, 1989)

### **I-11.1.5. Grupo de antígenos de activación:**

CD25: Reconoce al receptor de Interleukina-2 (RIL-2), proteína 55-60 Kd, fuertemente expresado en las células T activadas, algunos linfocitos B y monocitos. Es una molécula que presta gran información sobre el estado de la respuesta inmunitaria.

CD35: Inmunolocaliza el receptor de membrana para la fracción C3b del complemento que es una molécula de 220 KD, ciertamente pleomórfica entre distintos tipos celulares. Este antígeno es demostrable en las células de la serie roja, linfocitos B, monocitos y otras de origen no linfoide (ACEVEDO, 1988), (SANCHEZ MADRID y cols., 1989).

CD71: En los últimos años los marcadores histoquímicos de progresión celular normales y tumorales han sido ampliamente estudiados con fines diagnósticos y pronósticos. Quizás el más difundido es el anticuerpo Ki-67, obtenido por Gerdes y colaboradores (GERDES et al., 1983), (GERDES et al., 1984), que reconoce un antígeno nuclear expresado exclusivamente por las células proliferantes (G1, S, G2, M) y ausente en las células quiescentes (Go)

La inmunotinción con Ki-67 recientes publicaciones demuestran una estrecha relación entre la inmunotinción frente al Ki-67 y otras pruebas que valoran la proliferación celular, como es la incorporación de timidina tritiada o BrdUrd (KAMEL et al., 1989).

El antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal Ki-67 aún no ha sido por

## *Introducción*

completo caracterizado. Se sabe que corresponde a una proteína no histona ensamblada por cadenas poli-peptídicas, de un peso molecular aparente de 345 y 395 Kd, codificado por una secuencia génica hasta el momento desconocida (GERDES et al., 1991). Tampoco se conoce su contribución exacta en la actividad proliferativa. No obstante, se ha observado que la expresión máxima se consigue en la fase G2M de las células en crecimiento exponencial (SASAKI et al., 1987) y queda ampliamente dilucidado, sobre líneas celulares experimentales, que las variaciones de expresión del antígeno son causa y consecuencia de modificaciones en la proliferación celular y no un mero fenómeno asociado (SASAKI et al., 1989). A tenor de los datos que se disponen, ha sido posible distinguir el Ag Ki-67 de otras estructuras asociadas a proliferación como el caso de la ciclina, p53, c-myc y otros oncogenes (GERDES et al., 1991).

La regulación de Ag y DNA son independientes y parece necesaria la expresión de un nivel umbral para mantener la progresión del ciclo celular.

I-12. ESTUDIO CON AcMo DE BIOPSIAS GINGIVALES DE ENFERMOS TRATADOS CON CSA.

## II. OBJETIVOS

## PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

La manifestación oral más importante de la ingesta de ciclosporina A es la aparición en un importante número de pacientes de hiperplasia gingival . Para los enfermos que toman esta medicación se hace necesario el evitar la aparición de esta patología por motivos funcionales, estéticos, psicológicos e higiénicos.

En la actualidad se desconoce el mecanismo de la patogénesis, si bien se saben los factores que intervienen, aunque no ha quedado suficientemente aclarado la importancia que tiene cada uno en la génesis de este efecto adverso.

En el presente trabajo, pretendemos estudiar la hiperplasia gingival secundaria al uso crónico de CsA en sujetos trasplantados renales con la finalidad de:

- 1-. Cuantificación del grado de salud oral de los pacientes, así como la implicación o no de los factores de irritación local (placa bacteriana y cálculo) en el desarrollo de la hiperplasia,
- 2-. Optimizar y adaptar el Análisis digital de imágenes como método de mayor precisión en la evaluación de la hiperplasia.
- 3-. Establecer un índice que valore el grado de hiperplasia gingival de forma objetiva.
- 4-. Dilucidar que papel juega la CsA, determinada en diferentes compartimentos (sérica, e intralesional) y la dosis acumulativa en la aparición del sobrecrecimiento gingival.
- 5-. Tipificar y cuantificar el componente inflamatorio, presente en la submucosa gingival, mediante un panel de anticuerpos monoclonales de las distintas poblaciones y subpoblaciones celulares.
- 6-. Analizar que parámetros clínicos, histológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos están más en relación con las lesiones producidas por CsA, de tal forma que su mejor



conocimiento pudiera prevenirlas.

7-. Establecer una ley experimental que nos permita predecir el grado de HG, a partir de los parámetros bioquímicos, clínicos de salud oral, histológicos e inmunohistoquímicos estudiados en la presente memoria.

**III. PACIENTES  
MATERIAL Y  
METODOS**

**II. PACIENTES MATERIAL Y METODOS**

**II-1. PACIENTES.**

Se han estudiado 30 enfermos trasplantados de riñón, y sometidos a ingesta prolongada de CsA como parte de su tratamiento médico, en la Sección de Periodoncia de la Facultad de Odontología. Todos los pacientes fueron remitidos por el Servicio de Nefrología de la ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves de Granada y el mismo Servicio del Hospital Carlos Haya de Málaga.

Nomb.	Sexo	Edad	Fech. Trasp.	Dosis CsA	Ac.	H.G.CL.	Segui.
S.L.Q	H	47	12.09.89	105600		No	Gr
C.P.C	M	24	09.10.89	47600		Si	Gr
J.T.O	H	62	07.08.87	183820		No	Gr
M.D.M	H	35	22.09.87	297600		Si	Gr
M.D.F	H	20	01.12.89	112100		No	Gr
J.C.F	H	32	27.02.87	ND		Si	Ma
T.J.L	M	40	05.11.89	191700		Si	Gr
P.G.R	M	61	16.04.86	ND		Si	Ma
J.M.G	H	22	10.04.85	ND		Si	Ma
C.F.T	M	45	17.06.86	ND		Si	Ma
E.F.Q	H	54	08.05.87	180500		No	Gr
M.M.G	M	34	05.08.89	146200		No	Gr
M.R.R	M	25	06.10.87	197300		Si	Ma
E.R.R	M	31	15.11.86	ND		Si	Ma
M.R.L	M	33	29.05.90	130200		No	Gr
F.O.A	H	29	10.05.86	469050		Si	Gr
J.C.H	H	32	05.08.89	131500		No	Gr
S.C.D	H	24	30.09.89	222600		Si	Gr
R.C.R	M	24	21.02.89	132600		No	Gr
R.A.L	H	52	18.11.80	183580		Si	Gr
G.M.M	H	37	06.06.86	ND		Si	Ma
V.G.F	M	28	07.12.86	ND		Si	Ma
M.F.M	H	37	21.04.85	ND		Si	Ma
F.P.M	H	51	25.04.88	331800		Si	Gr
L.L-Q.	H	39	13.03.87	ND		Si	Ma
E.V.G	M	38	19.04.85	ND		Si	Ma
T.C.M	H	53	15.08.85	ND		Si	Ma
J.R.F	M	48	22.08.86	ND		Si	Ma
V.B.O	M	59	10.11.86	ND		No	Ma
R.B.C	M	15	No	ND		No	Gr

\* Pacientes gingivectomizados.

## ***Pacientes, Material y Métodos***

Asimismo se ha estudiado un grupo control constituido por diez sujetos sanos con edades comprendidas entre 21-54 años, sin patología oral, elegidos al azar.

### **II-2. MATERIAL Y METODOS.**

#### **II-2.1. PROTOCOLO CLINICO**

A todos los pacientes se les realizó un estudio protocolizado, consistente en:

- **Datos de filiación personal** incluyendo: NOMBRE, EDAD, SEXO.  
Fecha de la realización del trasplante.  
Centro donde se realizó.  
Lugar de seguimiento.
- **Dosis de CsA diaria** (postrasplante y de mantenimiento).
- **Dosis de CsA acumulativa** (dosis total ingerida, expresada en miligramos)
- **Dosis y medicación adyuvante** (otros inmunosupresores, Calcioantagonistas, anticonvulsivantes).
- **Datos de las biopsias renales** en aquellos pacientes en que se realizó.
- **Bioquímica de funcionamiento hepático** (GOT, GPT, BILIRRUBINA DIRECTA E INDIRECTA).
- **Bioquímica de funcionamiento renal** (CREATININA SERICA, ACLARAMIENTO DE CREATININA Y FENA).

#### **II-2.2. PROTOCOLO ODONTOLOGICO.**

**Datos de SALUD ORAL**, basados en índices epidemiológicos de higiene bucal (INDICE DE PLACA, INDICE GINGIVAL).

##### **II-2.2.1. INDICE DE PLACA**

- **Material Empleado.**

## ***Pacientes, Material y Métodos***

1. Reveladores de placa bitonales en comprimidos (ORAL B).
2. Espejo de exploración odontológica, nº5 (S.E. PLUS).
3. Vaso de 100 c.c. para agua.

### **- Descripción de la técnica.**

Hemos seguido el Índice Periodontal de SILNESS Y LOE (1964), que es un índice de placa que valora conjuntamente la higiene y grosor de placa mediante la demostración de restos de material orgánico depositados sobre las superficies libres dentarias.

### **- Modo de operar.**

1. Suministrar al paciente un comprimido del revelador que disuelve en la boca por completo, efectuando enjuagues con la saliva producida y procurando que esta pase por los dientes, durante 1 minuto.

2. A continuación, tras enjuagarse con agua una o dos veces, inspeccionar directamente la boca del paciente.

3. Comenzar la exploración en el sector 1 de la boca (nomenclatura internacional), empezando en el sector de molares y terminando en el de incisivos, para continuar con los sectores 2,3,4 sucesivamente.

4. Dividir cada pieza dentaria en cuatro sectores (mesial, distal, vestibular, lingual) que se tiñen y valoran independientemente, para calcular el índice en cada diente, se suman el número de caras o sectores con placa y se divide por el número total de sectores de cada diente.

### **- Interpretación de los resultados.**

Las caras dentarias con acúmulo de placa aparecerán teñidas de color ROJO si la placa tiene menos de 48h., de AZUL si tiene más de 48h.

Obtención del Índice de placa: La suma de todos los índices de cada diente dividido por el número de dientes explorados y multiplicado por 100, nos permitirá obtener el índice de placa de ese paciente expresado en tanto por ciento, según la relación siguiente:

$$\text{Índice de placa} = \frac{\text{Suma de índices de cada diente}}{\text{Número de dientes}} \times 100$$

Se toman como valores normales un índice de placa < 20%.

#### II-2.2.2. INDICE GINGIVAL.

- **Material empleado.**

1. Sonda periodontal de la O.M.S.
2. Espejo de exploración nº5. (S.E. PLUS).

- **Descripción de la técnica.**

Hemos seguido el índice de sangrado del surco propuesto por MUHLEMANN Y SON (1971), basado en el hecho de que el sangrado del surco gingival es el principal signo clínico de gingivitis y precede al enrojecimiento y tumefacción de las unidades gingivales.

- **Modo de operar.**

1. Retraer la mejilla de un cuadrante de la arcada dentaria.
2. Colocar la punta de la sonda periodontal en la entrada del surco gingival, un milímetro o menos.

### ***Pacientes, Material y Métodos***

3. Comenzar en la cara distal del último molar.
4. Llevar la sonda en un movimiento continuo hacia la cara interproximal del diente, empezando en la cara distal del 8 y terminando en la mesial del 1, primero superior y después inferior.
5. Observar el número de surcos que sangran en el cuadrante sondado, transcurridos 30 segundos.

**- Interpretación de resultados:**

El índice de sangrado se obtiene de la relación:

$$\text{IS} = \frac{\text{Número de piezas que sangran}}{\text{Número de piezas sondadas}} \times 100$$

Se toman como valores normales un índice de sangrado de 0.

#### **II-2.2.3. SESION DE PROFILAXIS.**

**- Material empleado.**

1. Aparato de Ultrasonidos mod. Cavitron 3000 (DENTISPLY).
2. Contraangulo azul (mod. 68G., KAVO).
3. Baberos Kleenex (KIMBERLY-CLARK), 39 x 50 cm.
4. Espejo de exploración, nº5 (S.E. PLUS).
5. Copas de goma para contraangulo n-835 (HAWE-NEOS-DENTAL).
6. Eyectores de saliva.
7. Guantes de latex.
8. Mascarillas (3M).

**- Descripción de la técnica.**

1. Pasar el aparato de ultrasonidos por todas las caras dentarias, siguiendo un orden desde

molares hasta incisivos.

2. Introducir la punta del aparato en el fondo del surco con objeto de remover el cálculo subgingival.

3. Pasar la copa de profilaxis montada en contraángulo por las mismas superficies para pulirlas .

#### II-2.2.4. GINGIVECTOMIA.

En aquellos pacientes que por necesidades estéticas y funcionales así lo requirieron, les realizamos una gingivectomía por sectores según la técnica descrita por GOLDMAN en 1951.

Seguimos los siguientes pasos:

**- Material empleado.**

1. Bisturí tipo Kirkland nº15 o nº16.
2. Bisturí tipo Orban nº 1 ó 2.
3. Dos carpules de anestésico local (Scandinibsa 2% forte).
4. Jeringa Uniyet (HOECHST).
5. Agujas cortas 0.30 x 25mm (DENTAL NEEDLE).
6. Sonda periodontal Michigan O.
7. Cemento quirúrgico COE-PACK.
8. Juego de curetas GRACEY (1-14).
9. Guantes de latex.
10. Mascarillas (3M).

**- Descripción de la técnica.**

1. Anestesiarse la zona a cortar, técnica infiltrativa.
2. Incisión primaria, siguiendo una línea de puntos sangrantes que antes hemos determinado con la propia sonda periodontal, con un bisturí tipo Kirkland nº15 o nº16, el corte es a bisel externo



y con una inclinación de 45 grados.

3. incisión secundaria con bisturí tipo Orban nº1 ó 2, al mismo nivel que aquella, llegar hasta el diente y a nivel de la papila atravesarla hasta lingual desde vestibular.

4. Eliminar el tejido resecaado y practicar una gingivoplastia bien con bisturí o con tijeras.

5. Raspar y alisar la zona tratada.

6. Colocar un cemento quirúrgico (COE-PACK) durante una semana, tras la cual se retira.

7. La curación de la gingivectomia es por segunda intención, no precisando sutura.

**- Interpretación de los resultados.**

Con esta técnica quirúrgica se excinde la pared blanda de la bolsa periodontal verdadera o falsa (hiperplasia gingival).

**II-2.3.PROTOCOLO HISTOLOGICO.**

A los pacientes se les practicó:

A- Biopsia de papila gingival.

A- Biopsia de papila gingival:

**- Material empleado.**

1. Carpul de anestesia local, Scandinibsa 2% forte, (cloridrato de Mepivacaina con Epinefrina al 1:100.000).

2. Jeringa Uniyect, (HOECHST).

3. Aguja corta 0.30 x 25mm (DENTAL NEEDLE).

4. Hoja de bisturí del número 15 con su mango.

5. Pinzas rectas en punta 773A (K. MARTIN).

6. Gasas estériles 20 x 20.

7. Guantes de latex.

8. Mascarillas (3M)

- Descripción de la técnica.

1. Anestesiar la papila seleccionada.
2. Cortar con el bisturí la papila por su base, ayudándonos con las pinzas para despegarla.
3. Dividir las muestras obtenidas en dos fragmentos, uno envuelto en una gasa humedecida con suero fisiológico, el otro introducido en una solución fijadora B-5.
4. La muestra en fresco fueron posteriormente remitidos al Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina para su correcta congelación y procesamiento histológico.

**II-2.3.1. ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO.**

El material biopsico se ha estudiado mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión y técnicas Inmunohistoquímicas para la determinación de las diferentes subpoblaciones leucocitarias y marcadores de activación celular, presente a nivel de la submucosa gingival.

Los Anticuerpos Monoclonales así como su especificidad se recogen en la Tabla II.

El estudio Inmunohistoquímico se practicó sobre secciones en congelación para preservar los determinantes antigénicos presentes en la membrana celular.

**II-2.3.1.1. TECNICAS CONVENCIONALES DE MICROSCOPIA OPTICA.**

El material biopsiado nos es remitido en fresco envuelto en una gasa humedecida en suero fisiológico, siendo procesado del siguiente modo:

### *Pacientes, Material y Métodos*

1. Observar con una lupa esteroscópica NIKON a 40x para orientar la pieza.
2. Fijar la muestra en B-5 durante 2-4 horas.

Solución stock B-5: cloruro mercuríco (Merck 4419) 12 g, acetato sódico (Merck 6267) 2.5 g, agua destilada 200 ml.

Solución de trabajo: solución stock B-5 20 ml, formol al 35-37% (formalina Merck) 2 ml.

3. Inclusión en parafina.
4. Cortes de 2-3 micras con un microtomo LEITZ 1512.
5. Montar en porta objetos albuminados.
6. Secar durante 16 horas a 37°C.
7. Almacenar a temperatura ambiente hasta su utilización. Se han llevado a cabo las técnicas de coloración rutinaria de Hematoxilina-Eosina, PAS y Tricrómico de Masson.

#### II-2.3.1.2. TECNICA DE CONGELACION Y OBTENCION DE SECCIONES CRIOSTATICAS.

1. Colocar el material seleccionado en una pletina con OCT (10.24% alcohol de polivinilo, 4.26% polietilenglicol, 85,50% excipientes) a temperatura ambiente.
2. Congelar por inmersión en Isopentano (Merck 6056) a -50° C.
3. Cortar mediante criostato SLEE MAINZ a -20°C secciones de 4 micras.
4. Montar los cortes en portaobjetos albuminados.
5. Secar los portaobjetos con ventilador durante 2 horas.
6. Fijación en acetona durante 5 minutos.
7. Almacenar a -20°C hasta la realización de la técnica.

#### II-2.3.1.3. TECNICAS IMMUNOHISTOQUIMICAS.

## ***Pacientes, Material y Métodos***

Se han estudiado la expresión de antígenos diferenciación linfocitaria sobre biopsias de mucosa gingival procedentes de enfermos trasplantados sometidos a ingesta crónica de CsA, empleando el complejo Avidina-Biotina en las secciones en congelación, aunque en algunos casos se prefirió emplear la técnica de Inmunofosfatasa Alcalina sobre cortes en congelación.

### **- COMPLEJO AVIDINA-BIOTINA (IPX-ABC).**

#### **- Reactivos empleados.**

1. Tris Buffer salino (TBS) 0.05 M. a pH 7.4: Se disuelve 60.57 g. de tris 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol en 500 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.6 con aproximadamente 385 ml de ClH 1 N y agua destilada hasta llegar a un litro de solución stock. La solución stock se diluye 1/10 con una solución que contiene 9 g. de ClNa por litro de agua destilada.
2. Inmunoglobulina bloqueante: Suero de conejo normal no inmune, a una dilución 1/10 (Dako X.902).
3. Antisuero primario: Se empleó inmunoglobulina de ratón adquirida comercialmente frente a los distintos antígenos con sus correspondientes diluciones (Tabla I).
4. Antisuero secundario de conejo antiratón biotinizado E.354.
5. Complejo DACOPATTS AB-HRP, número de referencia K.355
6. Solución de revelado: 3.3 Diaminobencidina tetrahidroclorhídrica (DAB) 5 mg, TBS 10ml.
7. Hematoxilina de Mayer.
8. Medio de montaje: Eukitt.

#### **- Descripción de la técnica.**

1. Sobre secciones incluidas en parafina, desparafinar en 2 baños de xileno de 10 minutos cada uno, seguido de un baño de xileno para limpieza y 2 baños de Alcohol absoluto para retirar el exceso de xileno.
2. Inhibir la actividad de la peroxidasa endógena por agua destilada al 1% en metanol durante

## *Pacientes, Material y Métodos*

30 minutos.

3. Deszenkerizar (Iugol 15 minutos, posterior lavado con agua destilada, tiosulfato de sodio al 2% y lavado con agua destilada).

4. Hidratar progresivamente con 2 baños de alcohol absoluto, 1 baño con alcohol de 95%, 1 de 80%, 1 de 70%, 1 de 50% y dos baños con agua destilada.

5. Lavar con TBS durante 5 minutos y secar los portaobjetos alrededor de los círculos concéntricos anteriormente marcados con lápiz de diamante, para impedir la difusión de los anticuerpos.

6. Incubar con suero de conejo normal dilución 1/10 en atmósfera húmeda en el interior de una cámara de incubación durante 20. minutos.

7. Retirar el exceso de suero, sin lavar, y secar cuidadosamente el porta alrededor del círculo.

8. Incubar con el antisuero primario (Inmunoglobulina de ratón adquirida frente a los diferentes Antígenos), durante 16 horas a 4º centígrados.

9. Incubar con Anticuerpo secundario de conejo antiratón biotinizado, a una dilución de 1/100, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

10. Lavar con TBS (3 lavados en tres minutos). Secar los portaobjetos alrededor del círculo.

11. Complejo DAKOPATTS AB-COMPLEX HRP.

12. Revelar: Aplicación de la solución DAB durante un tiempo hasta observar bajo control microscópico la coloración deseada o inicio de tinción de fondo (aproximadamente 10 minutos).

13. Lavar con TBS durante 10 minutos.

14. Contrastar las preparaciones con Hematoxilina de Mayer y se montar en Eukitt según el método habitual.

En los casos que se realizó la técnica con secciones de material fresco congelado se sustituyen los 4 primeros puntos por los siguientes:

1. Las secciones criostáticas de 4 micras de espesor son secadas con ventilador durante una o dos horas y posteriormente son fijadas en acetona a 4º centígrados durante 5 minutos.

2. Nuevo secado con ventilador durante media hora y refijadas 30 minutos en cloroformo.

PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADO

ACMO (CLONA)	CD	ESPECIFICIDAD	DILUCION	CASA
ANTICICLOSPORINA	---	CICLOSPORINA	1/10	SANDOZ
ANTI-ALC (POLIAS Y EB1)	CD44	AL. LEUCOCITARIO COMUN	1/50	DAKO
ANTI-LEU4 (SK7)	CD3	LINFOCITOS T TOTALES	1/10	BECTON- DICKINSON
ANTI-LEU 3A-SB (SK 3 - SK 4)	CD4	LINFOCITOS T INDUCTOR/COOP.	1/10	BECTON- DICKINSON
ANTI-LEU 4B (SK 1)	CD8	LINFOCITOS T INDUCTOR/CIOTOX.	1/10	BECTON- DICKINSON
ANTI-LEU 5 (LEB)	CD82	LINFOCITOS B	1/50	DAKO
ANTIMACROFAGOS (EMB 1)	CD68	MACROFAGOS	1/10	DAKO
ANTI-LEU7 (HNC-1)	CD57	CELS. NATURAL KILLER	1/10	BECTON- DICKINSON
ANTI-LEU10 (GO 22)	CD16	CELS. NATURAL KILLER	1/10	BECTON- DICKINSON
RECEPTOR IL-2 (ACT-1)	CD25	RECEPTOR IL-2	1/10	BECTON- DICKINSON
RECEPTOR CS/BI	CD35	RECEPTOR CS/BI	1/10	DAKO

## ***Pacientes, Material y Métodos***

### **- Interpretación de los resultados.**

Los lugares en los que se produce inmunotinción se visualiza como un depósito de color pardo.

### **- INMUNOFOSFATASA ALCALINA (APAAP).**

#### **- Reactivos empleados.**

1. Solución Buffer: Tris Buffer salino (TBS) 0.05 M a pH 7.4.

2. Antisuero primario: inmunoglobulinas de ratón, adquiridas comercialmente frente a los distintos antígenos, con sus correspondientes diluciones.

3. Kit universal K. 670 (Dako):

- Antisuero secundario: inmunoglobulina de conejo antiratón.

- Complejo inmune fosfatasa alcalina: antifosfatasa alcalina (Dako).

- Sustrato cromogénico: Se obtiene disolviendo en un vaso de precipitado de cristal, 2 mg de Naftol ASMX fosfato "Free acid" (Sigma N4875) en 0.2 ml de N-Dimetilformamide (Merck 2937), añadiéndole 9.8 ml de tampón tris buffer 0.1 M, pH 8.2.

Se disuelve 2.4 mg de levamisole (Sigma L9756) y 10 mg de Fast Red TR salt (Sigma F1500) en el buffer Naftol-Tris inmediatamente antes de usarlo. La solución se filtra directamente sobre los portas.

4. Hematoxilina de Mayer.

5. Medio de montaje: AQUATEX 8562.

#### **- Descripción de la técnica.**

1. Secciones criostáticas de 4 micras de espesor son secadas con ventilador durante 1 ó 2 horas y posteriormente son fijadas en acetona a 4º centígrados durante cinco minutos.

2. Nuevo secado con ventilador durante media hora y refijadas 30 minutos en cloroformo.

3. Dos lavados con TBS de tres minutos cada uno y secado de los portas alrededor de los círculos concéntricos marcados con un lápiz de diamante, para impedir la difusión de los anticuerpos.

4. Incubación con el Ac primario durante 16 Horas en cámara húmeda 4º centígrados y con las

diluciones correspondientes.

5. Tres lavados con TBS de tres minutos cada uno, secando posteriormente los portas alrededor de los círculos.

6. Incubación con el Ac secundario: Inmunoglobulina de conejo antiratón, durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

7. Tres lavados con TBS de tres minutos cada uno y secado de los portas alrededor de los círculos.

8. Complejo FAAFA (Dako) durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

9. Tres lavados de tres minutos cada uno y secado de los portas.

10. Sustrato cromogénico: FAST RED TR salt (Dako), hasta observar bajo control microscópico la contratinción deseada, o inicio de la tinción de fondo.

11. Lavado en agua durante 5 minutos.

12. Contratinción con hematoxilina de Mayer.

13. Lavado en agua (2 minutos) y a continuación agua destilada.

14. Las preparaciones aún húmedas se montan con medio acuoso, AQUATEX (Merck 8562).

**- Interpretación de los resultados.**

Las células positivas aparecen rodeadas de un anillo de color rojo brillante. La intensidad de la tinción depende del antígeno que se estudia y del anticuerpo monoclonal empleado. El precipitado rojo es estable durante periodos prolongados.

**- Métodos de cuantificación.**

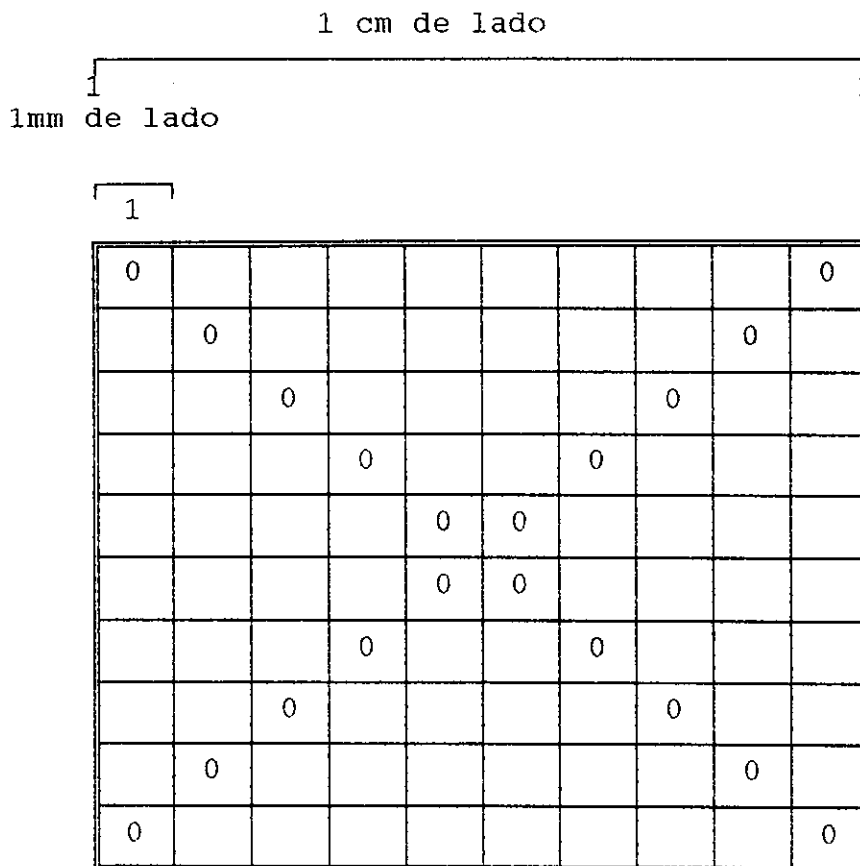
Se ha llevado a cabo un análisis cualitativo de los parámetros histopatológicos en las biopsias de las papilas dentales de los pacientes trasplantados y del grupo control, valorando las técnicas de Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Masson y PAS y un análisis cuantitativo, en un total de 10 campos de gran aumento (400x), escogidos aleatoriamente de la papila dental, evaluando las células inmunotñidas para los distintos anticuerpos empleados.



### *Pacientes, Material y Métodos*

Los estudios cuantitativos del inmunofenotipo celular se han realizado siempre en ausencia de cualquier dato clínico. Sólo se valoran las células con núcleos claramente identificables, realizándose su conteo exclusivamente en el corion, excluyendo: la inmunotinción intraepitelial e intravascular.

La cuantificación de la celularidad inflamatoria del intersticio, se realizó mediante un dispositivo EYEPIECE OLYMPUS de 1 cm de lado dividido en 100 cuadrículas de 1 mm<sup>2</sup> de superficie adaptada al ocular del microscopio Olympus BH2, tal y como se describe en el esquema adjunto, observándose con un objetivo de 40 aumentos.



Se escogen al azar 10 campos, y se extrapolan los resultados. El área de cada cuadrícula es de 1mm<sup>2</sup>, a través de la cual observamos la superficie de la preparación aumentada 40 veces, debiendo aplicar un factor de corrección para conocer la superficie real que estamos observando. Esto se consigue del siguiente modo:

### *Pacientes, Material y Métodos*

- Lado de una cuadrícula en el ocular es 1 mm. El área de la cuadrícula será  $1 \text{ mm}^2$ .
- Lado de la cuadrícula en la preparación  $1/40=0.025 \text{ mm}$ . La superficie de cada cuadrícula es  $0.025 \times 0.025 = 0.00062 \text{ mm}^2$ , por consiguiente el área total contabilizada en 100 cuadrículas es  $0.062 \text{ mm}^2$ .

Por lo tanto, en cada caso se cuentan 10 cuadrículas elegidas al azar en 10 campos, y se ha dividido por el factor de corrección 0.062.

Para evitar sesgos, el recuento celular se realiza secuencialmente y de forma contigua, excluyendo epitelio y vasos de gran tamaño.

#### **II-2.3.1.4. TECNICA DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.**

##### **- Obtención de las muestras.**

Las muestras gingivales remitidas en fresco, envueltas en gasa humedecida con suero fisiológico, son seccionadas y una porción de la misma, es procesada para su estudio mediante microscopía electrónica.

##### **- Fijación.**

Son empleados dos tipos de fijadores, glutaraldehído y tetróxido de ósmio amortiguados en solución búffer de fosfatos (Según MILLONIG), a pH 7,4; a continuación son reseñados los componentes y preparación de estas soluciones:

La solución de búffer según Millonig (MILLONIG, 1961) esta formada por:

- sol. a) Fosfato monosódico... .. 2,26%
- sol. b) Hidróxido sódico. ... .. 2,52%
- sol. c) Glucosa.. ... .. 5,40%
- sol. d) Cloruro de calcio. .. .. 1,00%

Para su preparación se realizan dos mezclas sucesivas; en la primera se utilizaron:

## *Pacientes, Material y Métodos*

sol. a)... .. 41,5 ml

sol. b)... .. 8,5 ml

Una vez ajustado el pH a 7,3 tomamos 45 ml de esta mezcla y le añadimos:

sol. c)... .. 5,00 ml

sol. d)... .. 0,25 ml

La solución fijadora de glutaraldehído al 2,5% se prepara con la siguiente mezcla:

sol. búffer de fosfatos... .. 90,00 ml

Glutaraldehído 25% ... .. 10,00 ml

La solución fijadora de tetróxido de ósmio al 1% se prepara también con búffer en las

proporciones siguientes:

sol. búffer de fosfatos... .. 50,00 ml

Tetróxido de Osmio... .. 0,5 g

Se realiza un refijación en la solución de tetróxido de Osmio a 4°C durante 30 minutos.

### **- Deshidratación.**

Después de tres lavados rápidos en agua destilada, se procedió a la deshidratación de las muestras de la forma siguiente:

#### **- A 4°C**

Acetona a 70% con acetato de

Uranilo al 1% .. .. mínimo 2 horas.

Acetona 100% ... .. dos pases de 15 minutos.

#### **- A temperatura ambiente**

Oxido de Propileno... .. dos pases de 15 minutos.

### **- Inclusión.**

Como medio de inclusión se emplea la epoxirresina propuesta por SPURR (Spurr, 1969), que

esta compuesta por:

- Dióxido de vinilciclohexano ... .. 10 g
- Anhídrido noneilsuccínico.. ... .. 26 g
- Eter diglicídico del propilenglicol.. ... 7 g
- Dimetilaminoetano.. ... .. 0,4 g

Como paso previo a la inclusión las muestras se depositan en una mezcla a partes iguales v/v de óxido de propileno y resina epoxi, durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se pasan a otra mezcla de propileno y resina en proporción 1:2 y por último, las muestras se sumergen en un baño de resina pura donde se dejan infiltrar durante toda una noche.

La inclusión se lleva a cabo en contenedores cilíndricos de plástico introducidos en una estufa a 60°C durante 18 horas para conseguir la polimerización de los bloques.

**- Cortes Ultrafinos.**

Los cortes son efectuados con un ultramicrotomo LKB III utilizando cuchillas de vidrio de 45°. De esta manera son obtenidas preparaciones del orden de 500 Amstromg de espesor, que son recogidas sobre rejillas de cobre electrolítico de 300 mallas sin recubrimiento de soporte.

**- Impregnación y contraste de los cortes.**

La impregnación de los cortes, que comenzó en parte por el tetróxido de Osmio utilizado como fijador, se completa tiñéndolos con solución de acetato de Uranilo-Magnesio al 7,5%, manteniendo las preparaciones en contacto directo con ella durante 30 minutos. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada y secadas cuidadosamente con papel de filtro.

Para aumentar el contraste de las preparaciones teñidas se procede a su impregnación con una sal de metal pesado. Para ello se emplea la solución de Reynolds (REYNOLDS, 1963) que contiene los siguientes componentes:

- Nitrato de Plomo. ... .. 1,33 g
- Citrato de Sodio. ... .. 1,76 g
- Agua (desionizada)... .. 30 ml

Es preparado mezclando dichos componentes en un matraz mediante agitación durante un minuto, para dejarla en reposo cinco minutos y volver a repetir el ciclo durante treinta minutos. Después son añadidos 8 ml de hidróxido sódico 1 N y finalmente es completado con agua desionizada hasta alcanzar los 50 ml de solución.

Para contrastar las rejillas, se procedió de igual forma que para la tinción con acetato de Uranilo-Magnesio, sustituyendo este componente por unas gotas de la solución de Reynolds durante 5 minutos, finalmente son lavadas con agua destilada y secadas con papel de filtro.

**- Observación.**

Para el estudio ultraestructural fue utilizado un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-B a 60 Kv.

Para el registro fotográfico fueron utilizadas placas KODAK Electrón Image de 6,5x9 cm.

**II-2.4. FOTOGRAFIA EN BLANCO Y NEGRO DE LOS SECTORES ANTERIOR Y MEDIO ANTO SUPERIOR COMO INFERIOR DE LA ARCADA DENTARIA.**

**- Material empleado.**

1. Cámara fotográfica NIKON, modelo F-3.
2. Teleobjetivo micro Nikkor de 105mm, a distancia cte. de 0,47.
3. Flach anular marca SUNPAK, 6 x 8R.
4. Tripode MANFROTTO, mod 075.
5. Películas KODAK color de 200 ASA y en blanco y negro ILFORD de 100 ASA.
6. Las fotos obtenidas fueron de 8,9 x 14 cm, en papel grado 3, politemizado ILFORD.

- **Descripción de la técnica.**

1. Para la realización de la fotografía, el paciente permanece sentado en un taburete de clínica dental completamente pegado a la pared con su occipital en la pared, lo que asegura que distancia es constante.

2. En el momento de la fotografía, se mantiene la boca abierta del paciente con la ayuda de un abrebocas.

- **Controles**

Diez alumnos de 4º Curso de Odontología a los que se les realizó, en las mismas condiciones que referimos para los pacientes, fotografía del sector anterior de ambas arcadas dentarias.

## II-2.5. ANALISIS DIGITAL DE IMAGEN

- **Material empleado:**

1. Imagen Real en Sorte Fotográfico B/N 13x9 cm. del sector anterior de ambas arcadas.
2. Sistema de Captación de imagen: Scanner (Sharp J300)
3. Sistema de almacenamiento informático: Discos de 3"1/5 de 2 Mb.
4. Soporte físico del sistema informático:
  - Ordenador COMPAQ (DESKPRO 386/25e) con Microprocesador 80386, disco duro de 80 Mb. y magnetoóptico incorporado de 650 Mb de capacidad de memoria.
  - 2 Monitores color de alta resolución VGA (COMPAQ) y EGA (IDEK Liyama).
  - Impresora PINWRITER P30 (NEC)
  - Ratón (microsof) de dos canales.
5. Soporte Lógico:
  - Programa informático de análisis de imagen VISILOG versión 3.60 (Noesis).

- **Procedimiento técnico.**

1. Captar la imagen real mediante lectura con Scanner.
- 2./2 Transformar en imagen digital de 19 bytes de cabecera y formato de 512x512 pixels.

### *Pacientes, Material y Métodos*

3. Almacenar en discos de 3"½ de 2Mb con una extensión por imagen de 256000 b. de memoria.
4. Almacenar en el subdirectorio del programa informático de análisis de imagen.
5. Inicializar el sistema a formato de imagen de 512x512 pixels.
6. Recuperar la imagen captada (imagen digitalizada) y visualizar con el programa de análisis de imagen VISILOG, mediante la función *IMPORTACION*.
7. Restaurar y transformar la iluminación (niveles de grises) de la imagen digital mediante la función *ECUALIZACION*.
8. Umbralizar la imagen digital transformandola en imagen binaria mediante la función *UMBRALIZAR*.
9. Discriminar las áreas de interes mediante la función *AREA ESPECIFICA*. Con la ayuda del ratón.
10. Medir las distintas áreas seleccionadas, mediante la función *AREA*.
11. Obtención de resultados en unidades arbitrarias (píxeles cuadrados).
12. Exportación de resultados al programa informático de estadística SIGMA II.

#### II-2.6. METODOS ESTADISTICOS.

Para realizar el estudio estadístico se han analizado las siguientes variables:

- Datos de filiación:
  - . Nombre del paciente.
  - . Edad.
  - . Sexo.
  - . Lugar de realización del trasplante.
  - . Fecha de realización del trasplante en meses.
- Variables clínicas e índices orales de higiene oral.
  - . Índice de placa, medido en %.
  - . Índice gingival, medido en %.

### *Pacientes, Material y Métodos*

- . Hiperplasia gingival clínica, clasificada en leve, moderada e intensa.
- . Hiperplasia gingival, medida por análisis digital de imagen.
- . Area dental descubierta de los incisivos superiores e inferiores, medido en pixeles cuadrados.
- . Area gingival de arcadas dentaria anteriores, medido en pixeles cuadrados. --. Area papilar, comprendida entre los cuatro incisivos de ambas arcadas medidas en pixeles cuadrados.
- . Índice de hiperplasia gingival, obtenido de la relación de las variables : Area gingival/Area dental.
- . Valoración de expresión de antígenos de diferenciación (CD) mediante anticuerpos monoclonales.
- . Número total de **leucocitos** en corion mucoso (CD45) por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival.
- . Número total de **linfocitos T** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival, medido en congelación por (CD3).
- . Número de **linfocitos T Cooperadores** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival (CD4).
- . Número de **linfocitos Citotóxicos** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival (CD8).
- . Número de **linfocitos B** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival (CD22).
- . Número de **linfocitos B** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan el antígeno CALLA (CD10).
- . Número de células que expresan el receptor C3br en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de papila gingival (CD35).
- . Número de células que expresan el receptor para la interleuquina 2 (IL-2) en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de papila gingival (CD25).
- . Número de **macrófagos** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival (CD68).
- . Número de células **Natural Killer** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan el antígeno (CD57).
- . Número de células **Natural Killer** en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan el antígeno (CD16).
- . Número de células en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan antígenos de histocompatibilidad clase I (HLAI).



### *Pacientes, Material y Métodos*

- . Número de células en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan antígenos de histocompatibilidad clase II (HLA-DR).
- . Número de células en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que expresan antígeno nuclear Ki-67, de proliferación celular (CD71).
- . Número de células en corion mucoso por  $\text{mm}^2$  de superficie de papila gingival que acumulan Csa medido mediante anticuerpo monoclonal antiCsa.
- . Tratamiento instaurado: sintomático, esteroides, esteroides e inmunosupresores, ciclosporina A o ausencia de terapia.
- . Dosis sérica de CsA en el momento de realizar la valoración de parámetros clínicos y morfométricos.
- . Dosis acumulativa de CsA (dosis de CsA total recibida expresada en mg).

El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante los programas SIGMA y SPSS PC +, realizándose los siguientes test:

- 1-. Test de distribución normal de Kolmogorov-Smirnov para cada variable en los distintos grupos diagnósticos.
- 2-. Test de comparación múltiple de medias estadísticas (t de Student).
- 3-. Análisis de la varianza para 1 factor (ANOVA1), (test de Scheffé).
- 4-. Coeficiente de correlación simple (r de Pearson) y regresión múltiple, considerando exclusivamente las relaciones con  $r > 0.60$  y  $p < 0.05$ .
- 5-. Pruebas no paramétricas, en ausencia de normalidad:
  - a). Test de Mann-Whitney para la búsqueda de homogeneidad de dos medias en muestras independientes.
  - b). Test Kruskal-Wallis para comparación de medias de más de dos muestras independientes.

#### IV. RESULTADOS

## **IV. RESULTADOS.**

### **IV-1. DESCRIPCION GENERAL DE LA SERIE.**

#### **IV-1.1. RESULTADOS CLINICOS GENERALES**

Se han estudiado 30 pacientes trasplantados renales sometidos a tratamiento crónico con CsA. en el momento de iniciar el estudio, los pacientes tenían edades comprendidas entre los 24 y los 61 años, siendo la media de edad  $39.62 \pm 2.14$  años. En la gráfica 1 se representa la distribución de los enfermos por intervalos de edad.

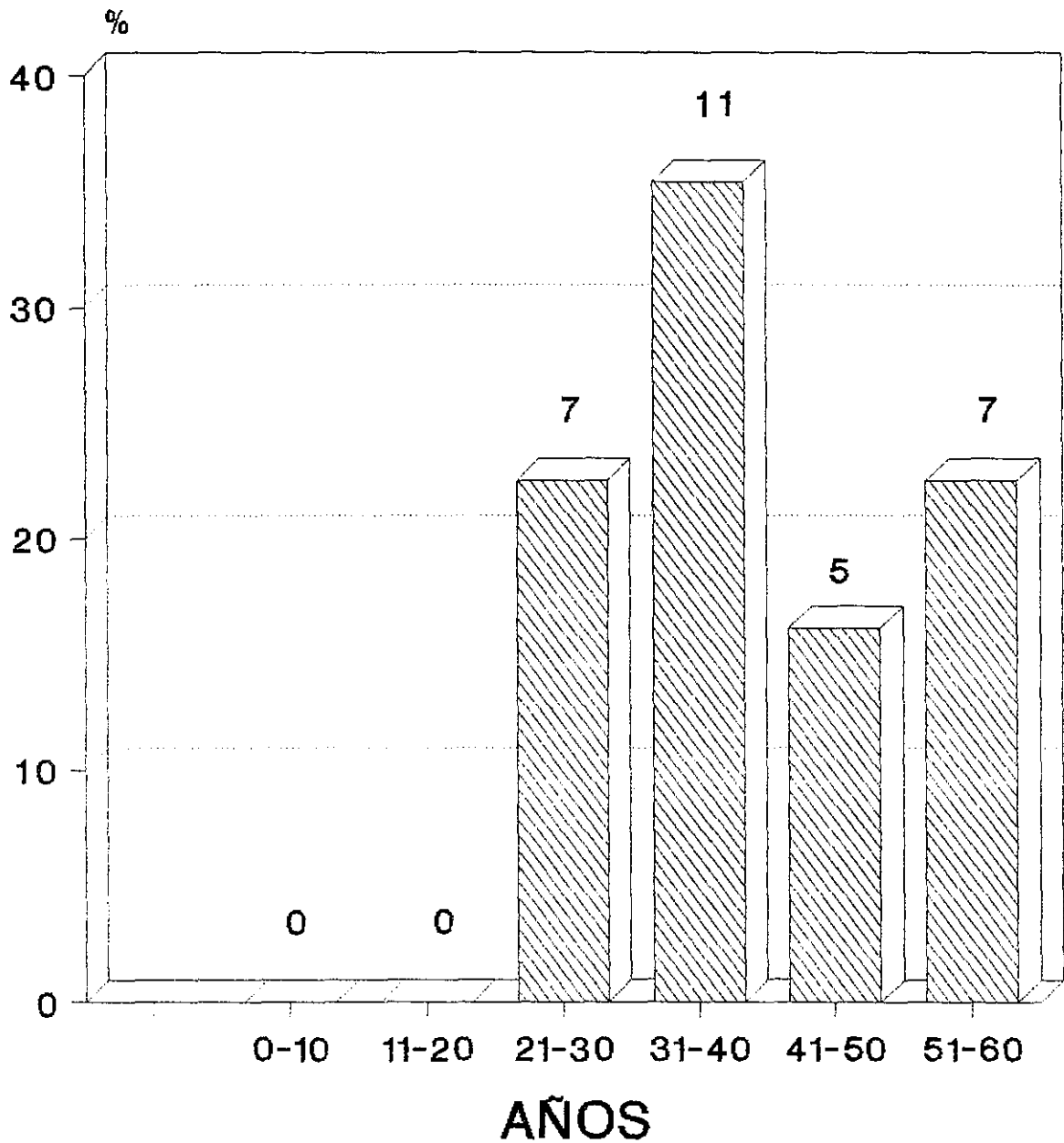
La distribución por sexos se recogen en la gráfica 2B, en ella se observa una proporción semejante de mujeres y hombres.

Los enfermos estudiados, constituyen aproximadamente un 1/5 del total de enfermos trasplantados de las provincias de Granada y Málaga. Su lugar de seguimiento corresponde en un 50% a cada provincia.

La fecha de trasplante osciló entre los 13 meses y los 84, con una media de  $43.55 \pm 3.99$  meses.

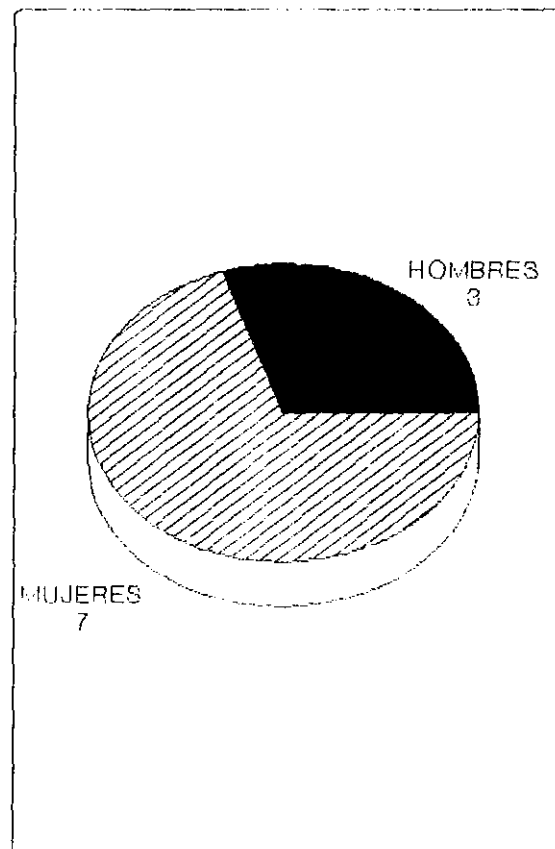
Los enfermos trasplantados antes de 1987 que han seguido un protocolo inmunosupresor con azatioprina fueron excluidos de este estudio. A partir de este año han seguido un protocolo de inducción constituido por CsA, globulina antilinfocítica (GAL) y prednisona que se administró de la siguiente forma: El día de la intervención CsA a 8 mg/kg/2 dosis, GAL a 10 mg/kg/1 dosis y prednisona a dosis de 1 mg/kg de peso. A continuación se inició un tratamiento (hasta completar 6 dosis de GAL) de tal forma que los días 1-3-5-7-9 se suministró CsA a dosis

**ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES  
TRATADOS CON CsA  
DISTRIBUCION POR INTERVALOS DE EDAD**



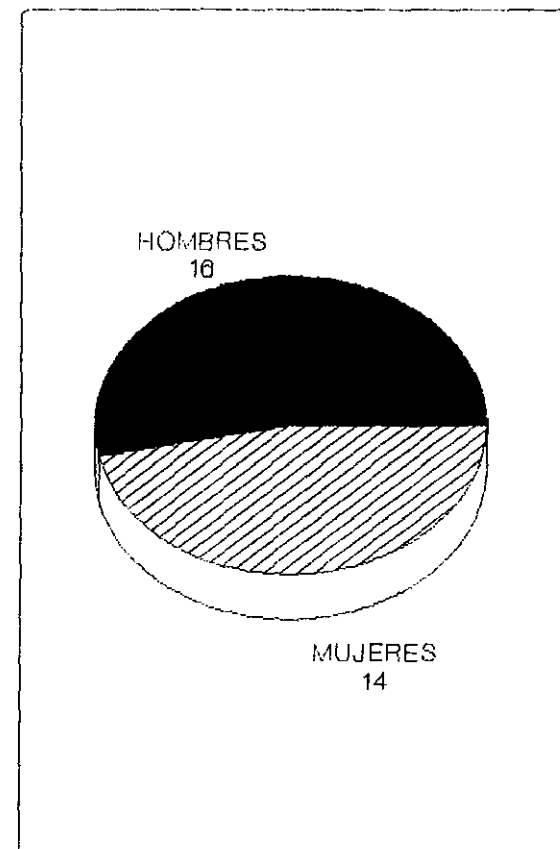
**GRAFICA 1**

**GRUPO CONTROL  
DISTRIBUCION POR SEXO**



**GRAFICA 2A**

**GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES  
TRATADOS CON CsA  
DISTRIBUCION POR SEXO**



**GRAFICA 2B**

## RESULTADOS

de 8 mg/kg de peso/día/2 dosis y prednisona 0.25 mg/kg de peso y los días 2-4-6-8-10 se administró GAL 10 mg/kg/día, CsA 8 mg/kg/día (salvo los pacientes trasplantados en Málaga que recibieron una dosis de inducción de 15 mg/kg/día) y prednisona 0.25 mg/kg/día. Después de estas secuencias se administró CsA para mantener niveles séricos de 80-200 ng/ml y prednisona a 0.25 mg/kg/día para ir disminuyendo progresivamente hasta el sexto mes post-trasplante el paciente quedaba con 5 mg/día de prednisona, manteniéndose con este regimen para siempre. El tratamiento recibido por estos pacientes en la crisis de rechazo fue de tres tipos: tratamiento con esteroides masivos intravenosos a dosis de 500 mg durante tres días consecutivos; los pacientes que no respondieron al tratamiento con esteroides masivos recibieron Ac-monoclonal OKT3 por corticorresistencia, a razón de bolus de 5 mg hasta un total de 5 días consecutivos; los pacientes recibieron directamente Ac-monoclonal OKT3 a dosis de 5 mg/día durante 6 días consecutivos.

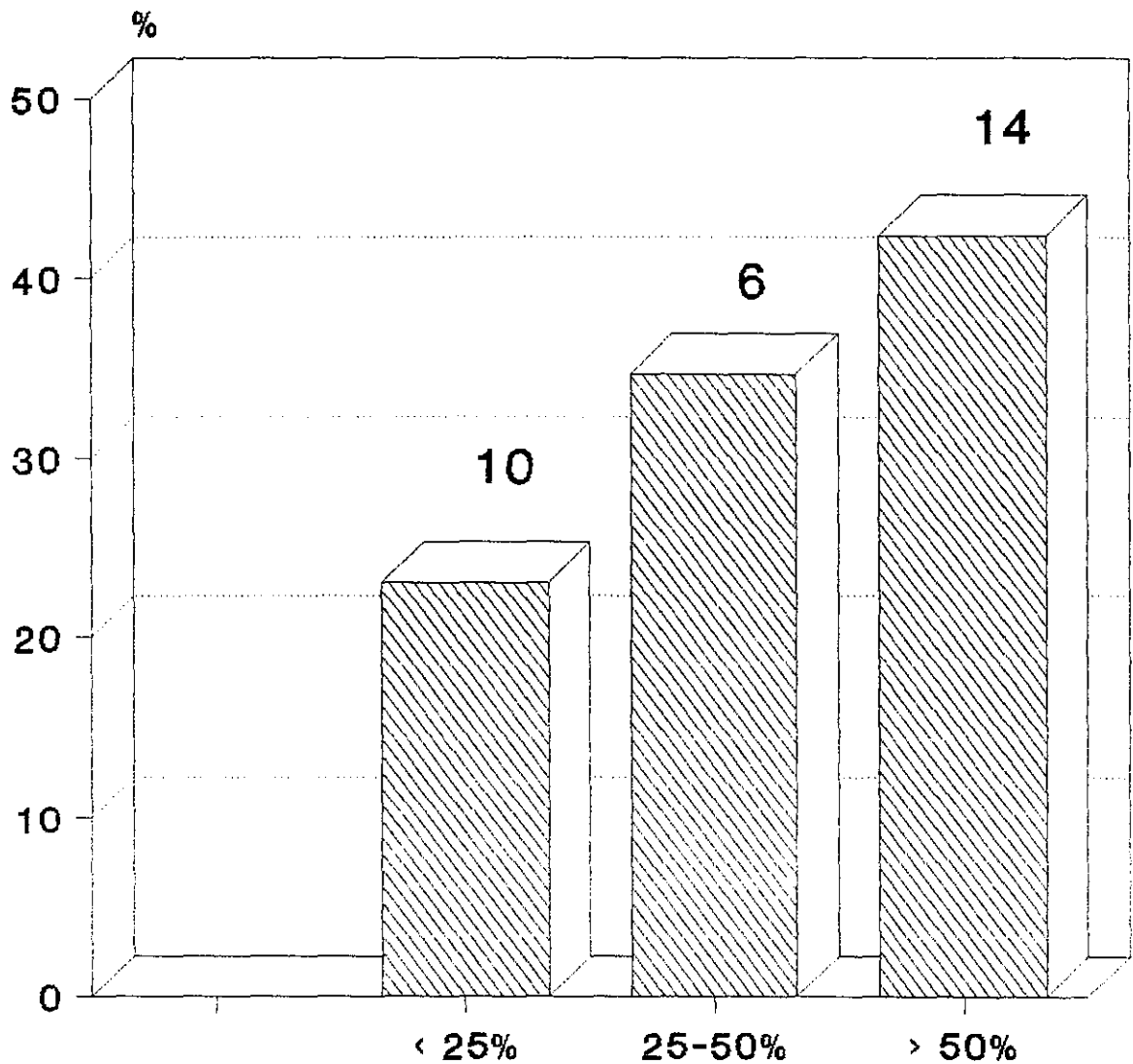
La función renal del injerto valorada por los niveles de creatinina en sangre, reveló un valor medio de  $1.79 \pm 0.28$  mg/dl, entre un rango de 0.6 y 4.8 mg/dl.

La función hepática fue monitorizada mediante el estudio de transaminasas GOT y GPT. los valores medios de las determinaciones realizadas en el grupo de pacientes fueron  $34.3 \pm 19.7$  y  $40.4 \pm 33.5$  respectivamente.

Los resultados obtenidos tras la valoración de los índices de salud oral fueron los siguientes: El índice de placa osciló entre un 10% y un 100% en el limite superior, con un valor medio de  $51.76 \pm 5.37$  (GRAFICA 3A). El índice gingival de sangrado osciló entre 0% (correspondiente a una paciente edéntula) y un 100% con un valor medio de  $54.57 \pm 5.68\%$  (GRAFICA 3B). Estos datos ponen de manifiesto la pobre higiene oral de este grupo de enfermos.

La valoración clínica de la hiperplasia gingival, siguiendo los criterios de Pascualin. 11 enfermos presentaban una hiperplasia leve (36.66%), 9 una hiperplasia moderada (30%), 6 un agrandamiento intenso (20%) y 4, (13.33%) no presentaban sobrecrecimiento gingival. En todo caso,

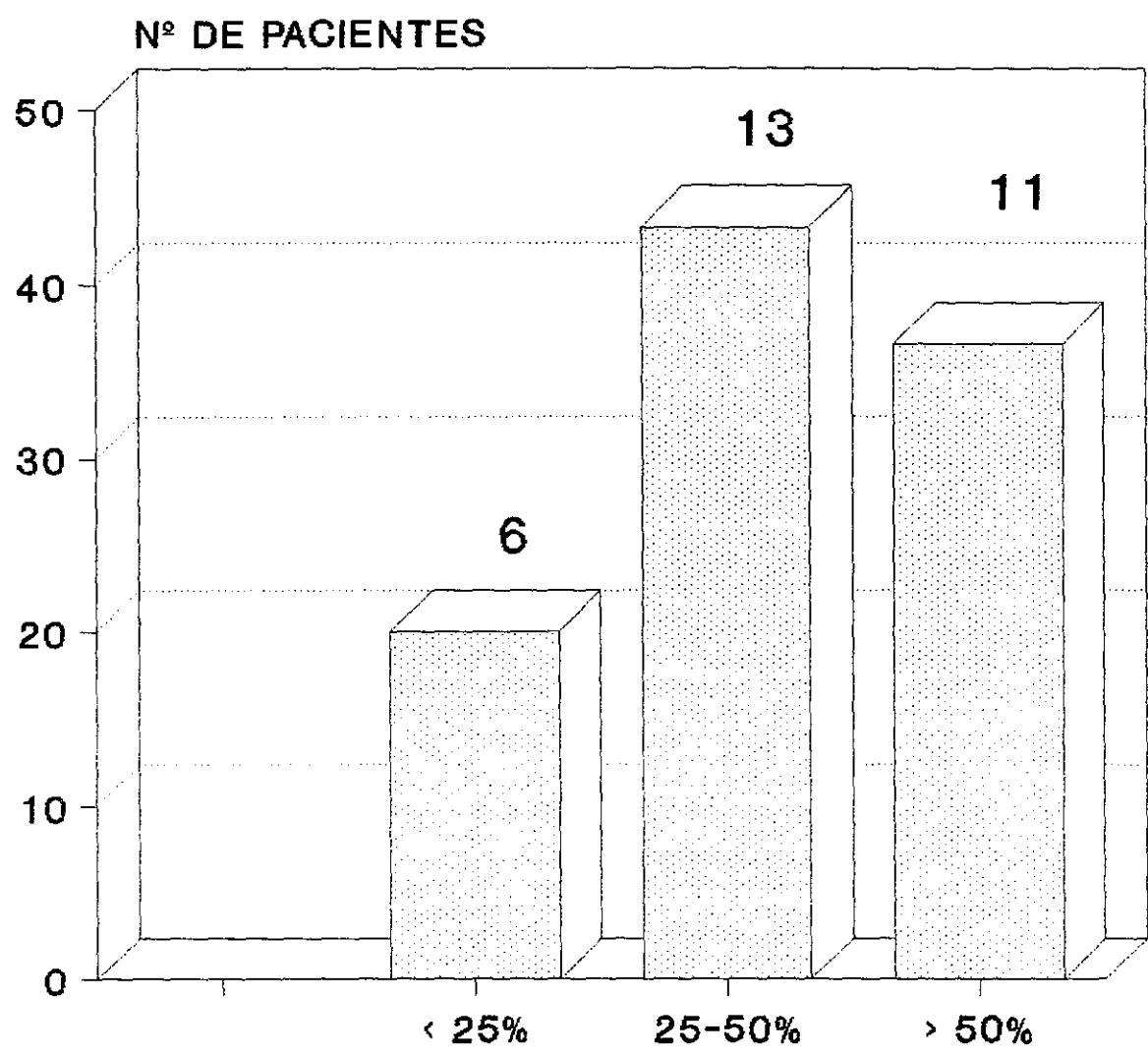
**DISTRIBUCION DEL GRUPO DE PACIENTES  
TRASPLANTADOS RENALES TRATADOS CON CsA  
SEGUN EL INDICE DE PLACA**



 **INDICE DE PLACA**

**GRAFICA 3A**

**DISTRIBUCION DEL GRUPO DE PACIENTES  
TRASPLANTADOS RENALES TRATADOS CON CsA  
SEGUN INDICE DE SANGRADO**



 **INDICE GINGIVAL**

**GRAFICA 3B**



## **Resultados**

el porcentaje de hiperplasia gingival (86,67%) agupadas las HG leves, moderadas e intensas obtenido en nuestra serie, no corresponde a la incidencia real de hiperplasia gingival dentro de la población de enfermos de ambas provincias estudiadas (GRAFICA 4).

La cuantificada de CsA se obtuvo sólo en los pacientes cuyo seguimiento fue en Granada (n=15) y se evaluó mediante la determinación de:

- **Ciclosporina Sérica:** Con una cifra media de  $142.86 \pm 12.195$  ng/ml, con una cifra inferior de 78 ng y superior de 246 ng/ml.

- **Ciclosporina Acumulada:** Medido en mg totales, con una cifra media de  $220215.66 \pm 34916.68$  mg, el mínimo fue de 47600 mg, y el máximo de 535405 mg.

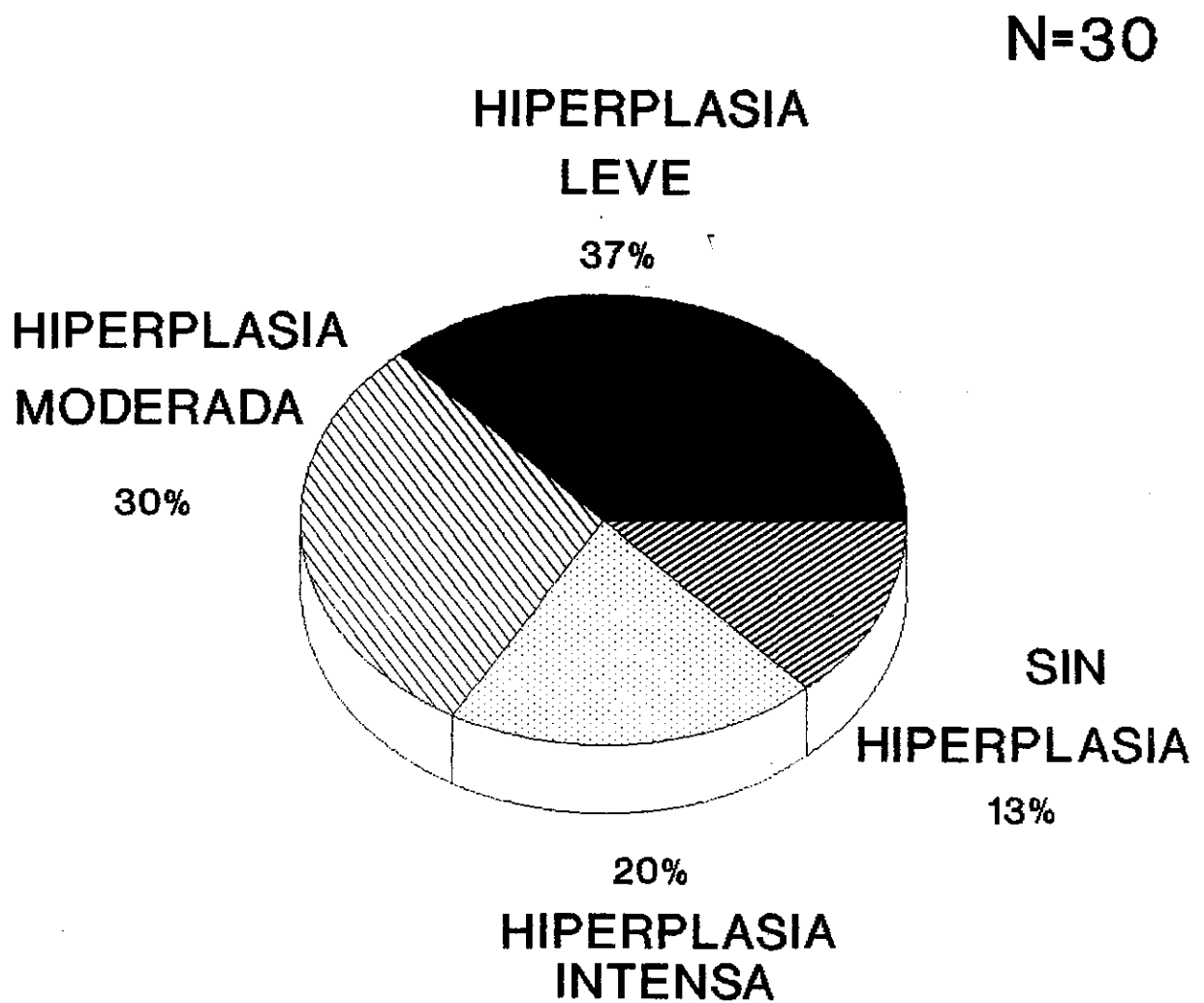
- **Ciclosporina "in situ":** Fue determinada en 9 de los pacientes al no disponer en los demás casos de secciones histológicas suficientes para testificar. Refleja el número de células/mm<sup>2</sup> que presentan en su interior depósito de CsA. El número medio de células por mm<sup>2</sup> fue de  $335.10 \pm 33.227$  con un recuento mínimo de 177.41 y un máximo de 532.25 células/mm<sup>2</sup>.

### **IV-1.2. RESULTADOS GENERALES DE MORFOMETRIA**

Del estudio morfométrico realizado sobre fotografías del sector anterior de la boca mediante análisis digital de imagen se obtuvieron los siguientes resultados: (TABLA...)  
(GRAFICA 5).

El AREA GINGIVAL evaluada presentó un tamaño medio de  $38343.48 \pm 1885.79$  pixeles cuadrados, con un tamaño mínimo de 23418, y un máximo de 63600 en las hiperplasias más severas.

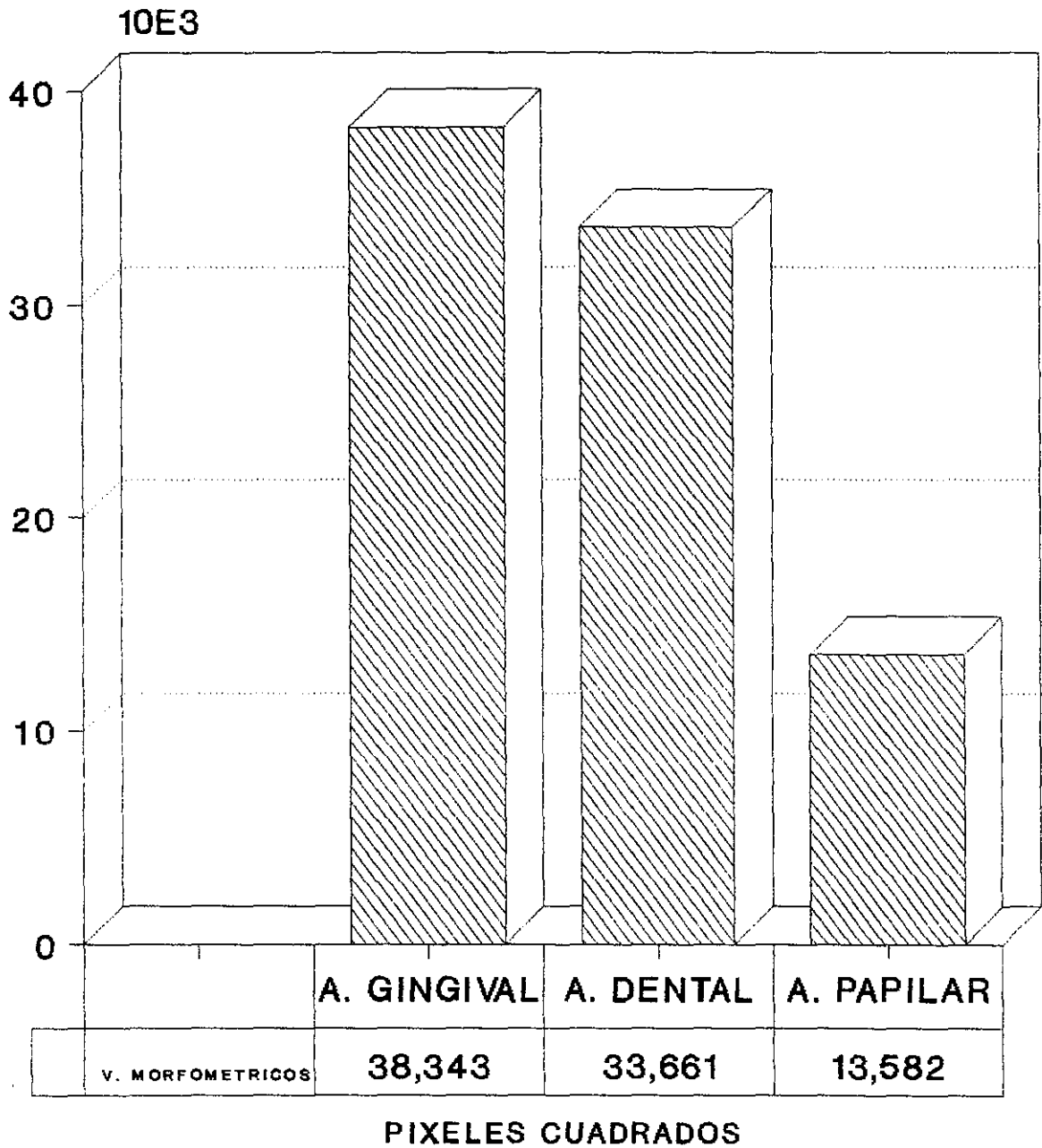
**GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES  
TRATADOS CON CsA  
FRECUENCIA DE LA HIPERPLASIA GINGIVAL**



SEGUN GRADACION CLINICA DE PASCUALIN

**GRAFICA 4**

**GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS  
RENALES TRATADOS CON CsA  
INDICES MORFOMETRICOS**



**GRAFICA 5**

## Resultados

EL AREA DENTAL del total de incisivos de cada paciente presentó un tamaño medio de  $33660.40 \pm 2346.74$  pixeles cuadrados, con una cifra mínima de 10443 pixeles cuadrados y una máxima de 49499 pixeles cuadrados en los pacientes que no desarrollaron HG.

EL AREA PAPILAR determinada, presentó un tamaño medio de  $13582.48 \pm 1074.91$  pixeles cuadrados, con un valor mínimo de 6381 y un máximo de 25193 pixeles cuadrados.

EL INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL (IHG = A.GINGIVAL/A.DENTAL), presentó una media de  $1.33 \pm 0.134$ , oscilando entre el 0.6999 pixeles cuadrados como cifra inferior y 3.36 como límite superior.

TABLA III . VALORES MORFOMETRICOS DEL GRUPO DE ENFERMOS TRATADOS CON CsA.

Nomb.	A.GINGIVAL	A.DENTAL	A.PAPILAR	IHG
S.L.Q	26600	26800	7050	0.99
C.P.C	28967	25852	14566	1.12
J.T.O	-----	-----	-----	-----
M.D.M	44075	23121	18669	1.9
M.D.F	-----	-----	-----	-----
J.C.F	-----	-----	-----	-----
T.J.L	50864	46456	12563	1.09
P.G.R	40240	19920	9857	2.0
J.M.G	35098	10443	19530	3.36
C.F.T	49252	39411	9849	1.24
E.F.Q	38940	42604	6381	0.91
M.M.G	40617	41294	8695	0.98
M.R.R	31782	13284	23804	2.39
E.R.R	63600	38116	20900	1.66
M.R.L	34781	48562	10154	0.71
F.O.A	39964	12284	24478	3.25
J.C.H	35598	32271	7214	1.10
S.C.D	35848	23523	16578	1.52
R.C.R	34781	48562	10854	0.71
R.A.L	30745	31141	17075	0.98
G.M.M	44758	49499	15908	0.90
V.G.F	41049	45103	9808	0.9
M.F.M	32774	31431	11470	1.04
F.P.M	56460	47950	25193	1.17
L.L-Q.	32555	32553	15846	1.00
E.V.G	-----	-----	-----	-----
T.C.M	32382	46308	7837	0.69
J.R.F	28714	25262	11721	1.13
V.B.O	23418	23500	8200	0.99
R.B.C	-----	-----	-----	-----

-- Pacientes gingivectomizados y/o edéntulos.

FIGURA 2. AREAS MORFOMETRICAS SELECCIONADAS EN UN SUJETO CONTROL.

*2 A. Area papilar.*

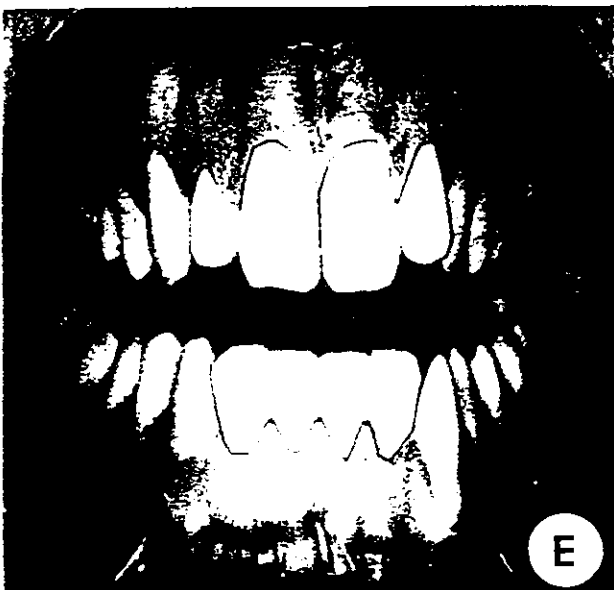
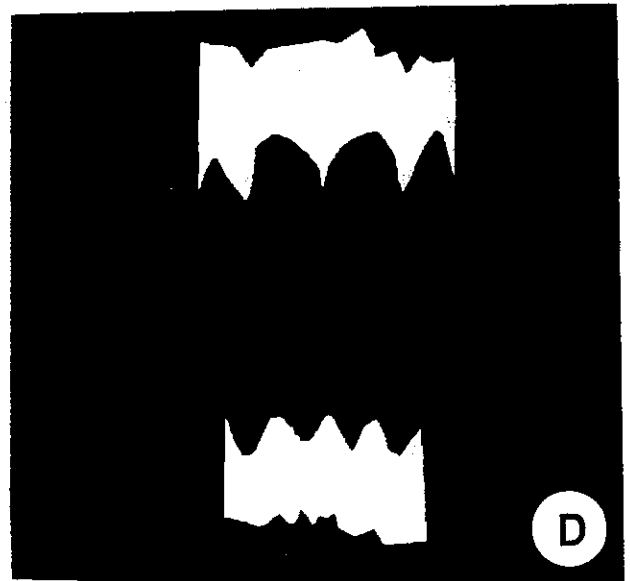
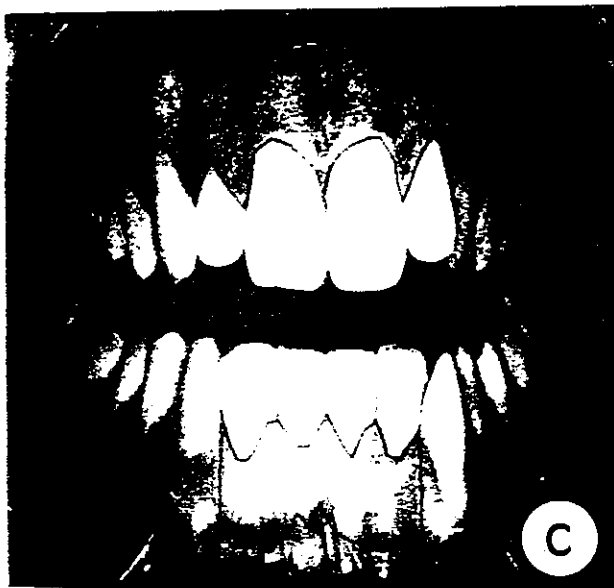
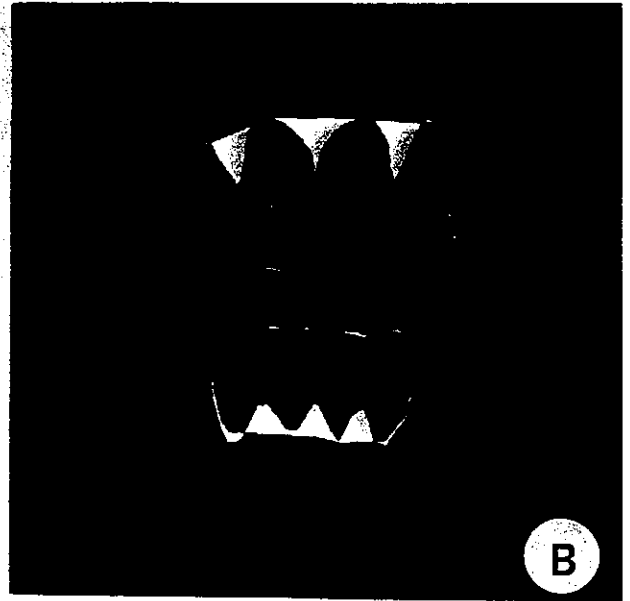
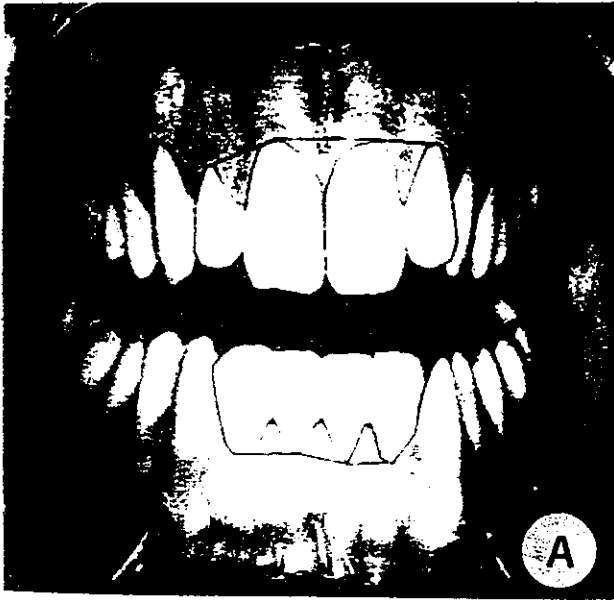
*2 B. Area resultante después del proceso de segmentación.*

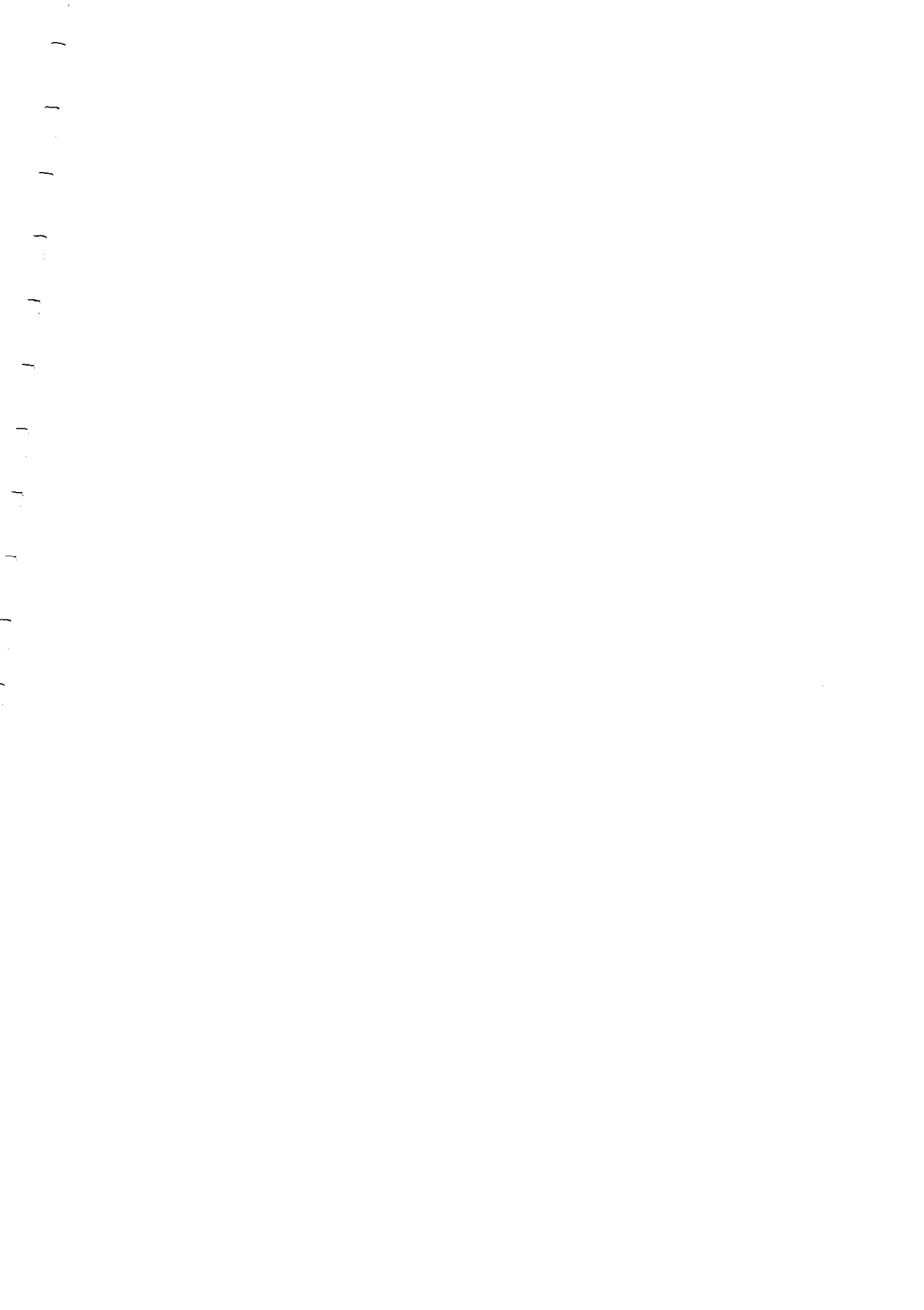
*2 C. Area gingival.*

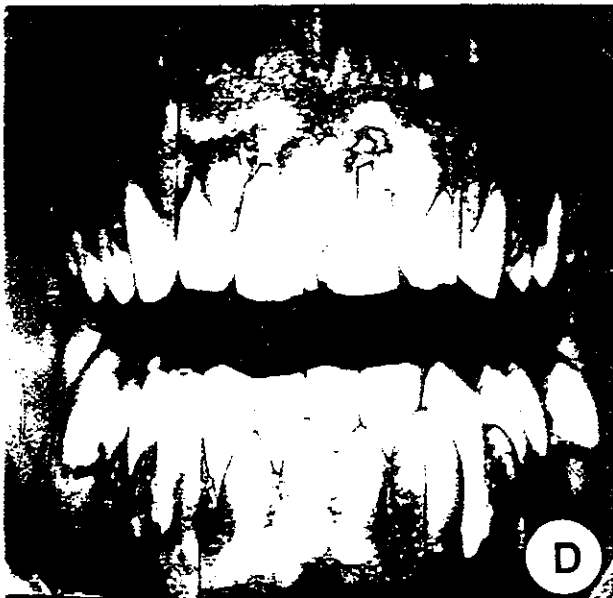
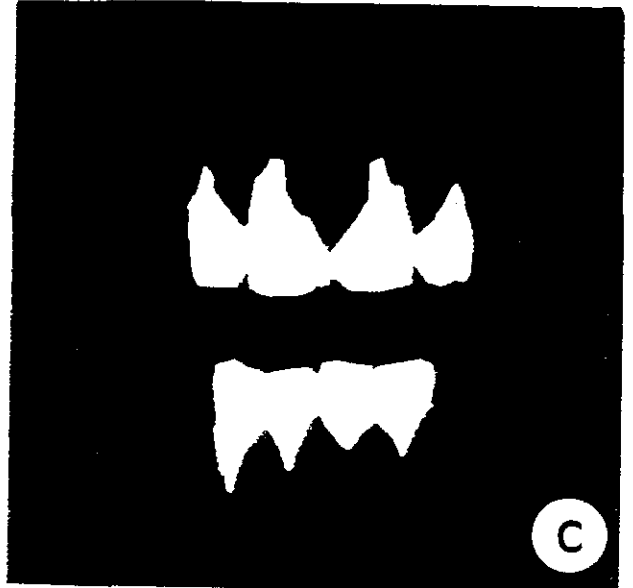
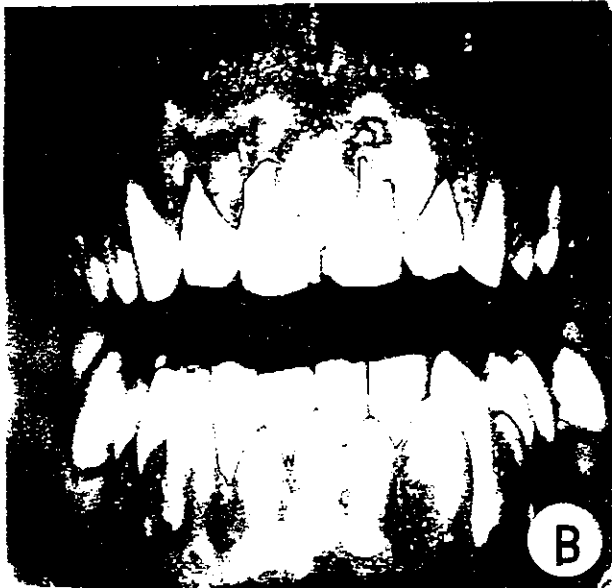
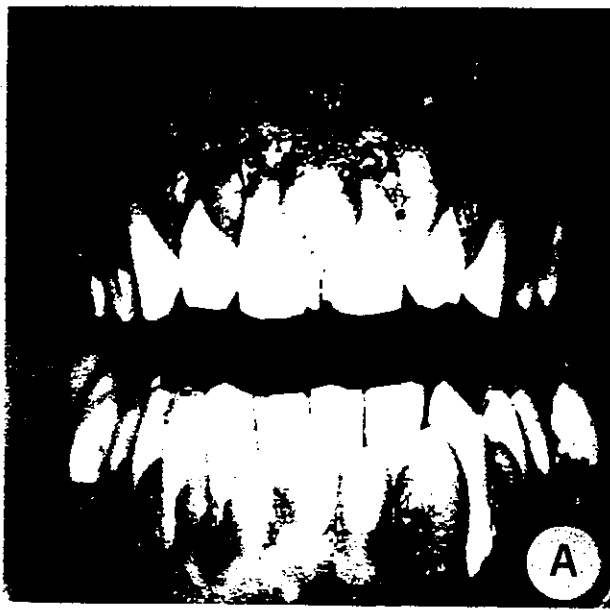
*2 D. Area resultante después del proceso de segmentación.*

*2 E. Area dental.*

*2 F. Area resultante después del proceso de segmentación.*









#### IV-1.3. RESULTADOS HISTOLOGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

Con microscopia óptica y aplicando técnicas convencionales se han evidenciado tres componentes correspondientes al epitelio, a la respuesta inflamatoria y a la reacción fibrosa.

El epitelio aparece engrosado y de aspecto hiperplásico con fenómenos de exocitosis y espongirosis.

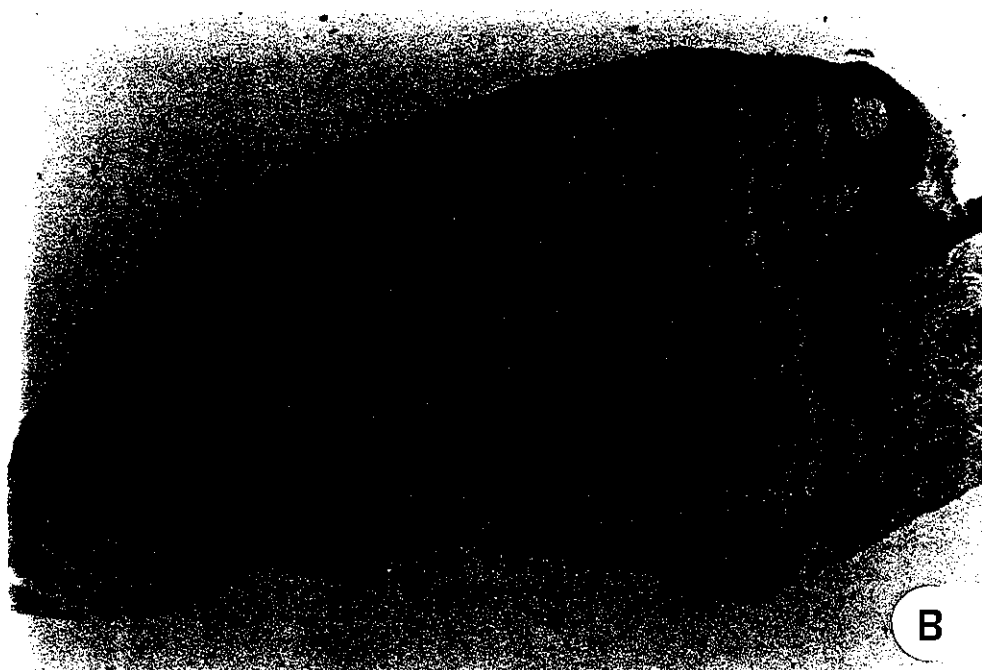
La respuesta inflamatoria, que adopta por lo general una disposición en acúmulos irregulares, está constituida por linfocitos y células plasmáticas maduras con elementos de hábito monocitoide.

La reacción fibrosa presenta dos zonas: una acelular, correspondiente a colágena y otra con células fusiformes exhibiendo características fibroblásticas.

Con microscopia electrónica hemos estudiado sistematizadamente los siguientes componentes:

a) Epitelio de revestimiento gingival. El componente epitelial presentaba grado variable de cambios subcelulares que consistían en ensanchamiento de los espacios intercelulares con pérdida de los desmosomas en la lesiones avanzadas. En el área intercelular era frecuente encontrar estructuras membranosas electrón-densas, material de textura granular y elementos celulares. Dichos elementos correspondían a linfocitos, no observándose células de Langherhans.

A nivel intracelular se demostró ensanchamiento del citoplasma con edema y glucógeno intracitoplásmico. En ocasiones se demostraron gruesos gránulos electrón-densos. El núcleo exhibía finas condensaciones de heterocromatina.







## **Resultados**

b) En el área en que predomina el componente inflamatorio se advertían abundantes células plasmáticas con mayor o menor desarrollo de retículo endoplásmico, indicativo de actividad funcional variable. También existía una alta población de linfocitos, algunos con incremento del citoplasma, mostrando mayor cantidad de retículo endoplásmico rugoso, así como elementos histiocitarios con evidentes lisosomas.

Entre la celularidad inflamatoria se encontraban restos celulares y fibrina.

c) El componente tisular con mayor riqueza de celularidad fibroblástica y colágeno presentaba una disposición desorganizada de las fibras en haces de diferentes direcciones.

Los fibroblastos, localizados en las áreas más fibrosas, tenían citoplasma estrellado con moderado desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias, los cuales alternaban con otros de citoplasma más amplio, con numerosos retículo endoplásmico rugoso y material filamentoso preferentemente en vecindad al núcleo. Este presentaba con frecuencia poros nucleares y gruesa lámina fibrosa en relación con el material filamentoso citoplásmico. Los fibroblastos ubicados en la vecindad del componente inflamatorio exhibían gruesa cromatina y un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso con tendencia a dilatarse.

### **IV-1.4. RESULTADOS GENERALES DE INMUNOHISTOQUIMICA**

Con el panel de anticuerpos monoclonales diseñado (TABLA II) para el estudio de las subpoblaciones linfoides, monocitaria-macrofágica así como la expresión de determinados receptores de membrana involucrados en los fenómenos de respuesta celular y actividad proliferativa valorados a nivel del corión mucoso de la encía, resultaron los siguientes valores medios: La población total leucocitaria (CD45) fue de 1411.5 células/mm<sup>2</sup> (419.3-3758.1), siendo la población de linfocitos T (CD3) 1295.2 células/mm<sup>2</sup> (80.64-3677.41), de los cuales corresponden a la

## **Resultados**

subpoblación de linfocitos cooperadores/inductores (CD4) 954.1 células/mm<sup>2</sup> (338.7-2532.25) y a la subpoblación de linfocitos citotóxicos (CD8) 581.1 células/mm<sup>2</sup>. De la relación de estos dos últimos se extrajo un cociente CD4/CD8, que para nuestra población sujeta a estudio fue de 1.88.

Por otro lado la población linfoide B total, medida mediante el anticuerpo monoclonal CD22, arrojó una media de 444.4 células/mm<sup>2</sup>. con un intervalo comprendido entre 161-1274.

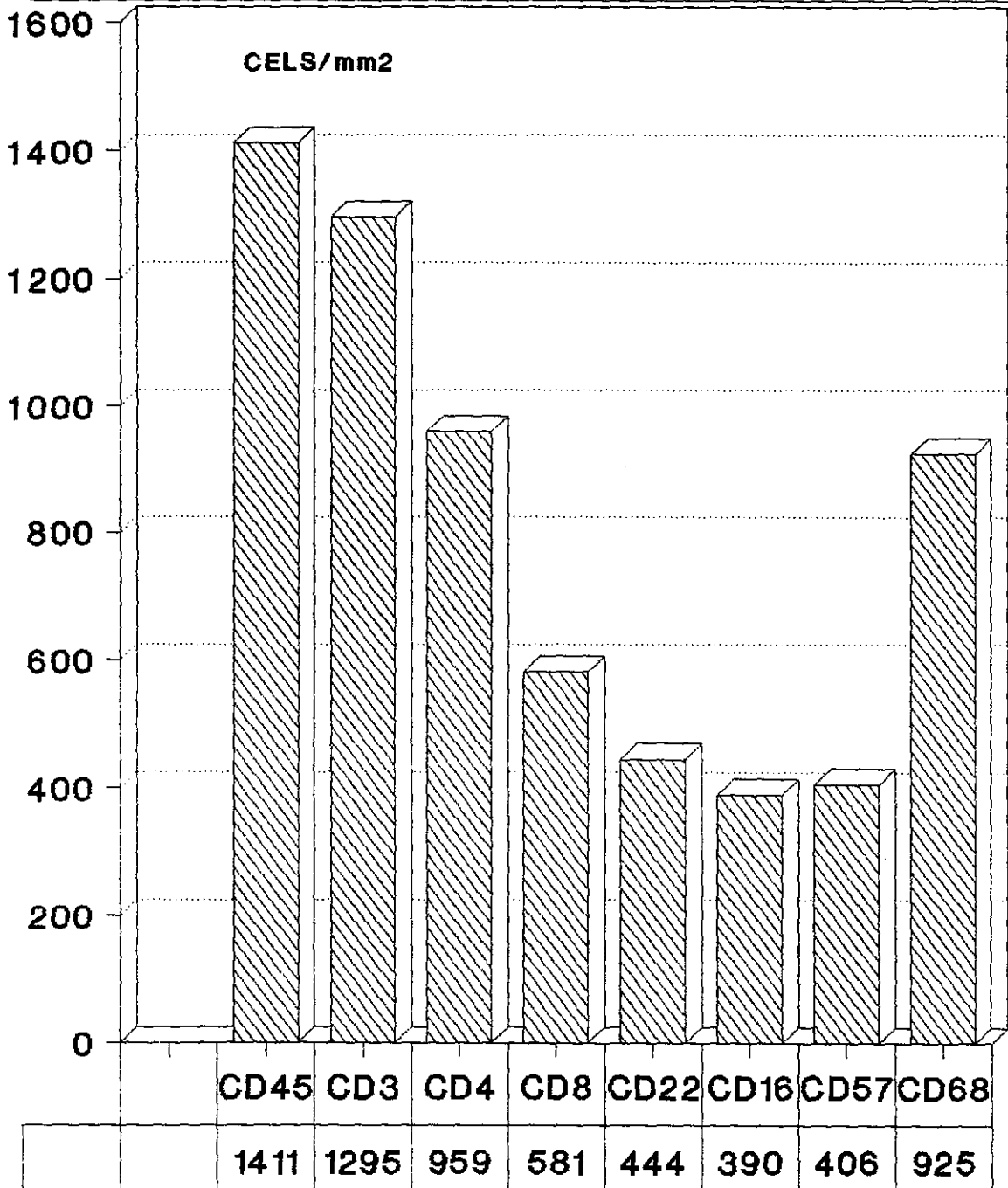
Otras subpoblaciones evaluadas fueron la macrofágica (CD68) (925.9 con un intervalo entre 290.3-2774.1) y las células NK (Natural Killer- CD16) presentes con un valor medio de 390.0 células/mm<sup>2</sup> y un rango de 119.3-1403.2 y evaluadas mediante CD57 406.1. (145.1-983.8) (GRAFICA 6A).

La población linfoide y monocítica presente en la submucosa gingival de las muestras estudiadas demostró los siguientes valores medios en la expresión de distintos receptores y moléculas de histocompatibilidad: Una media de 476.7 células/mm<sup>2</sup> (129.0-1516.1) presentaban receptor para interleuquina-2 (CD25) y 536.2 células mm<sup>2</sup> (193.5-2145.1) mostraron receptor para la fracción C3b del Complemento.

La expresión media de antígenos de histocompatibilidad tipo I -HLAI- fue puesta de manifiesto en 785.1 células/mm<sup>2</sup> (80.6-2629) y la expresión de antígenos de histocompatibilidad tipo II -HLADR- estuvo presente en 695.2 células mm<sup>2</sup> (193.5-1951.6).

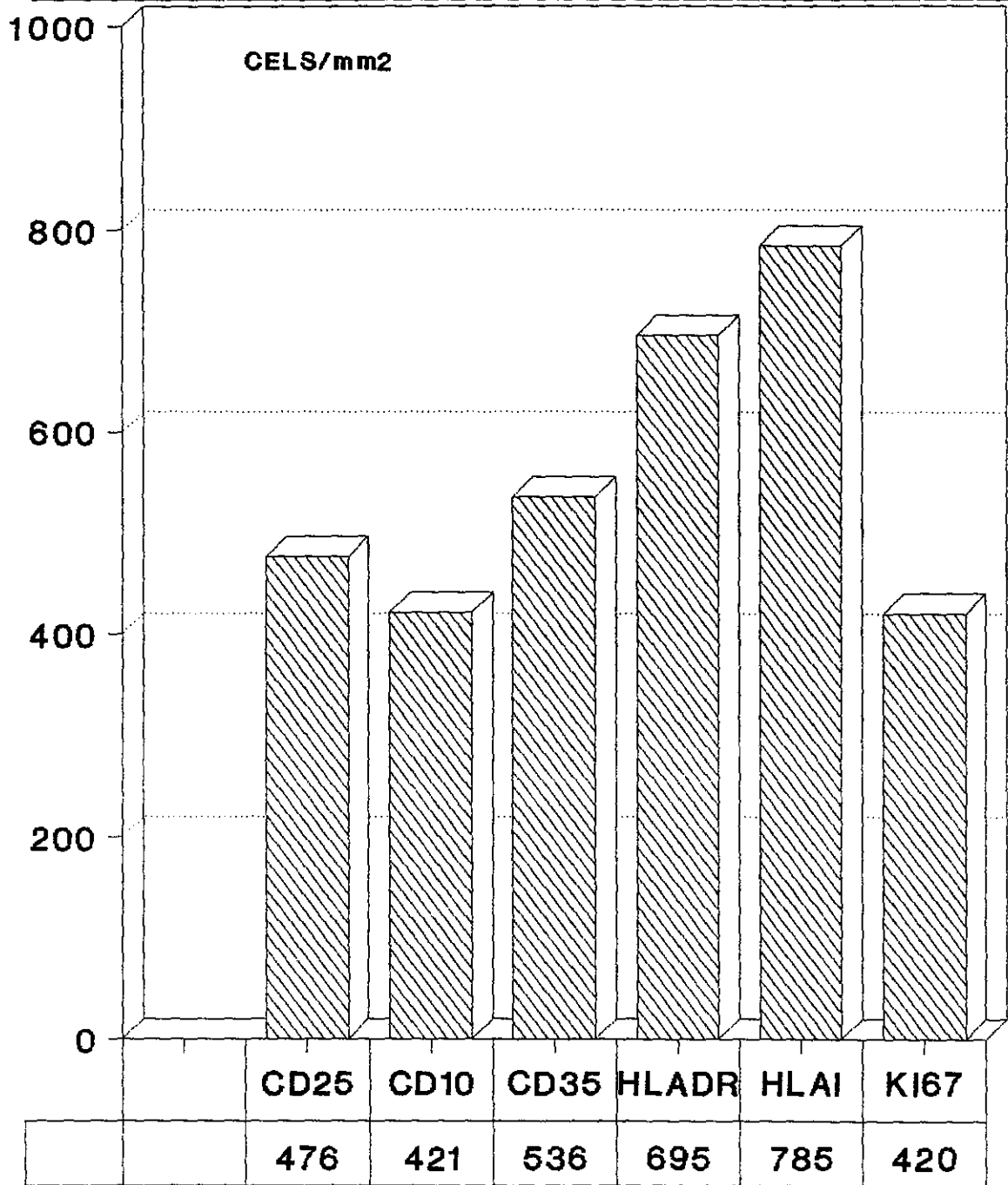
La proliferación de las distintas poblaciones celulares estudiadas determinada mediante el AcMo Ki-67 (CD71), demostró una media de 420 células en ciclo/mm<sup>2</sup> (177.4-822.5) (GRAFICA 6B).

**CUANTIFICACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
GRUPO DE PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES  
TRATADOS CON CICLOSPORINA A**



**GRAFICA 6A**

**CUANTIFICACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA  
GRUPO DE PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES  
TRATADOS CON CICLOSPORINA A**



**GRAFICA 6B**



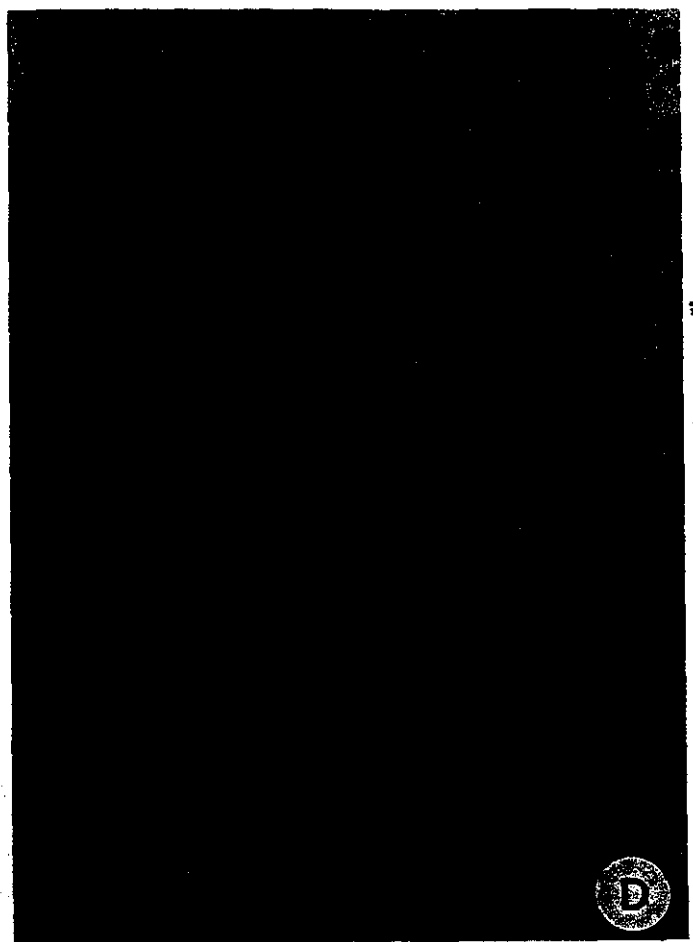
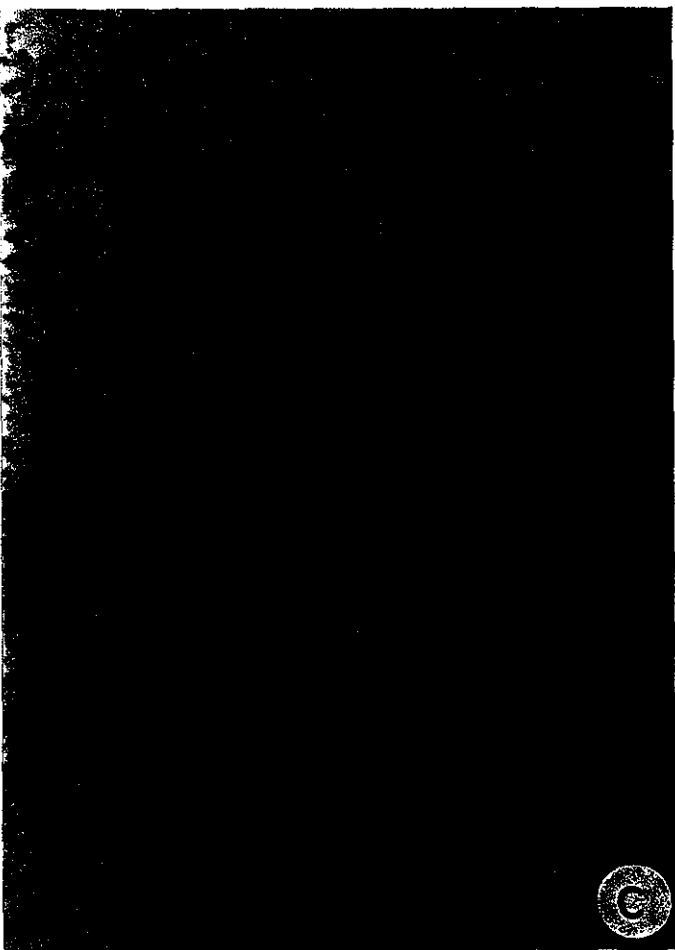
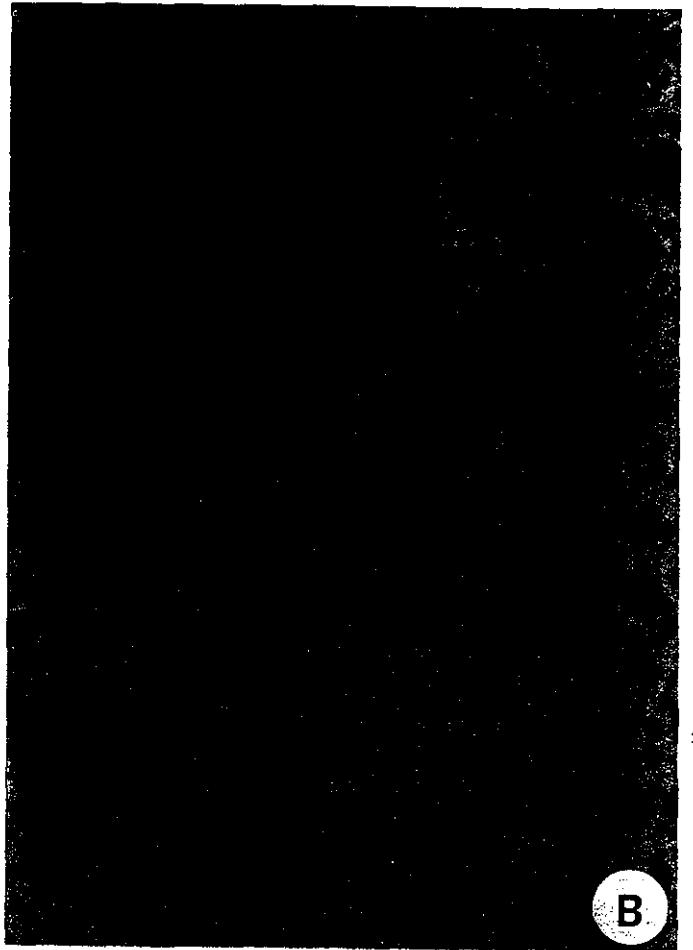
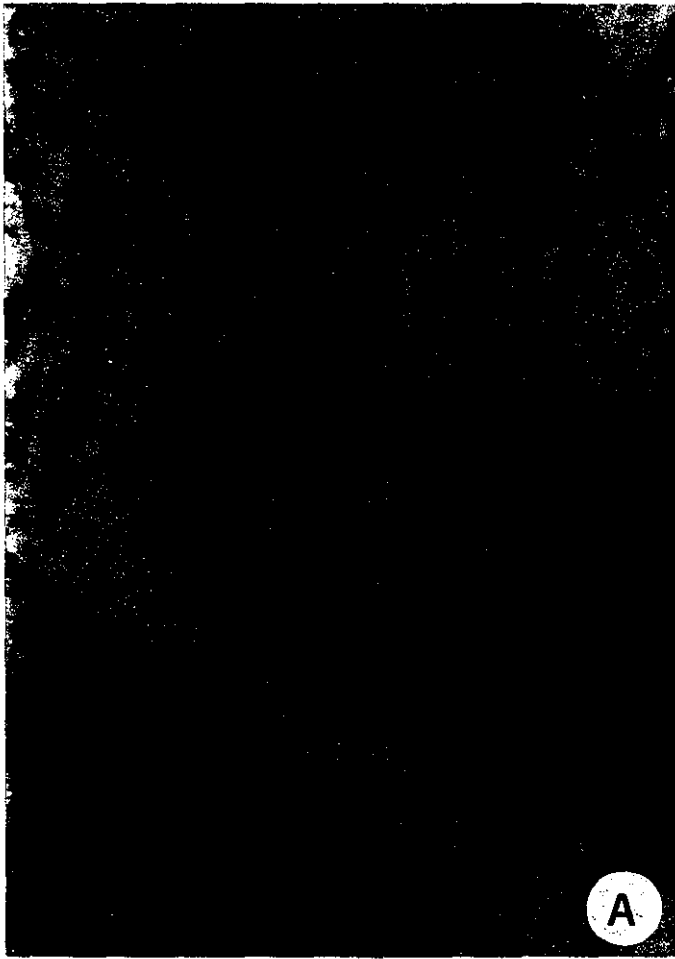
**FIGURA 7. VALORACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
PRESENTE EN LA SUBMUCOSA GINGIVAL.  
(Inmunofosfatasa Alcalina x200).**

*7A. Expresión de CD45 (antígeno leucocitario común) en una hiperplasia gingival severa.*

*7B. Expresión de CD3 (linfocitos T totales) del mismo caso.*

*7C. Expresión de CD4 linfocitos (inductores / cooperadores).*

*7D. Expresión de CD8 (linfocitos T citotóxicos)*

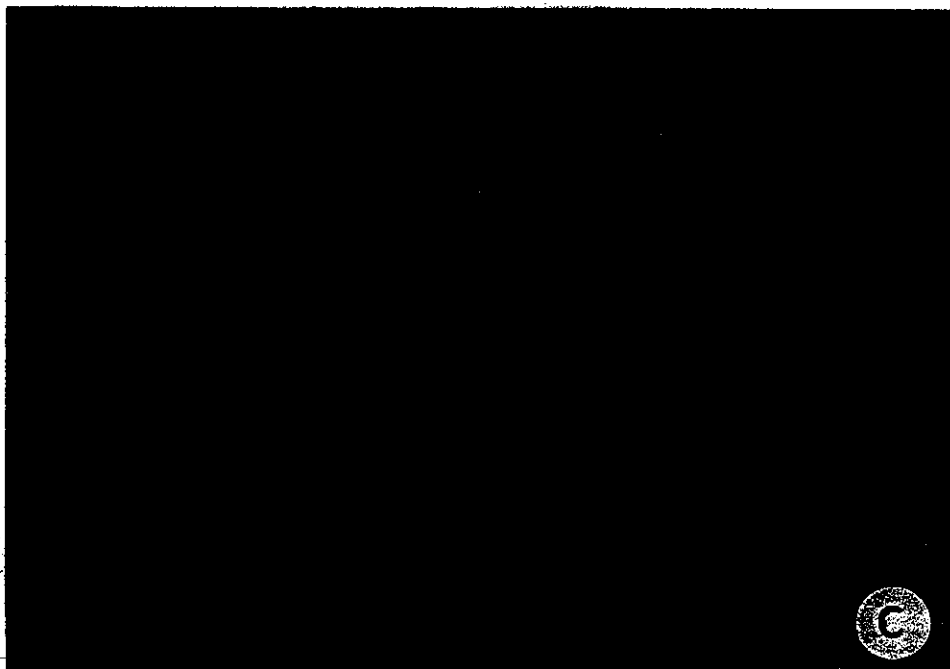
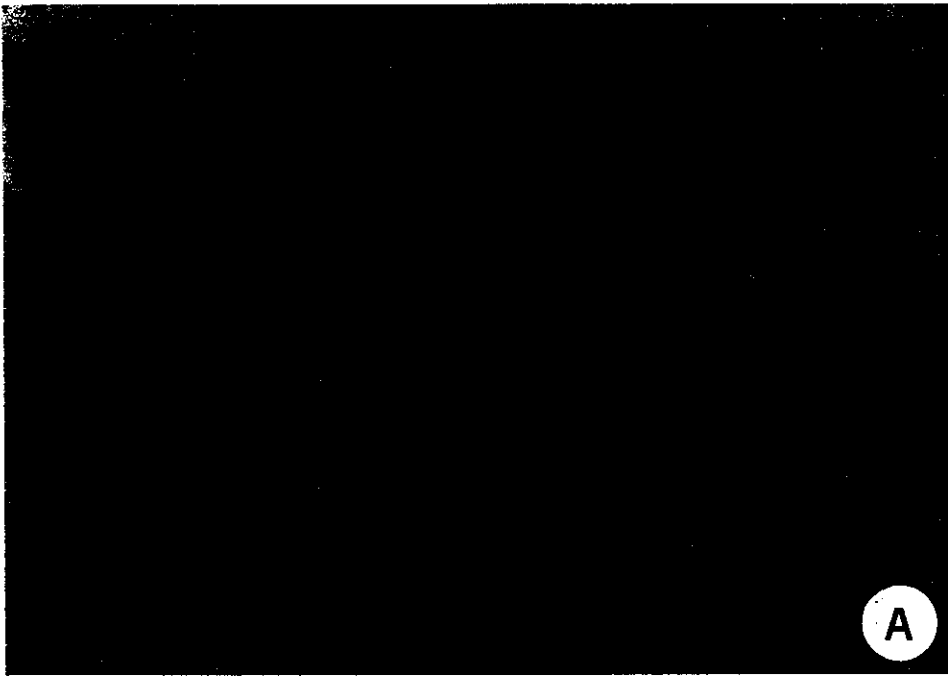


**FIGURA 8. VALORACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
PRESENTE EN LA SUBMUCOSA GINGIVAL.  
(Inmunofosfatasa Alcalina x200).**

**8A. Minima expresión en el infiltrado inflamatorio submucoso para linfocitos B (CD22). Nótese la escasa proporción de los mismos.**

**8B. Infiltrado inflamatorio macrofágico (CD68).**

**8C. Infiltrado inflamatorio por células Natural Killer (CD57).**



## IV-2. DESCRIPCION DEL GRUPO CONTROL.

### IV-2.1. RESULTADOS CLINICOS GENERALES

Como grupo control se han estudiado 10 individuos sin ningún tipo de patología, ni sometidos a tratamiento alguno. Las edades estaban comprendidas entre los 20 y 52 años, siendo la edad media de  $31.4 \pm 6.56$  años.

La distribución por sexos se recoge en la gráfica 2B, en la que se observa un ligero predominio de mujeres sobre hombres.

La función renal de los mismos medida mediante la cifra de creatinina sérica, se encontró dentro de la normalidad, con una cifra inferior de 0.7 mg/dl, y superior de 1.1, la cifra media era de  $0.92 \pm 0.07$  mg/dl.

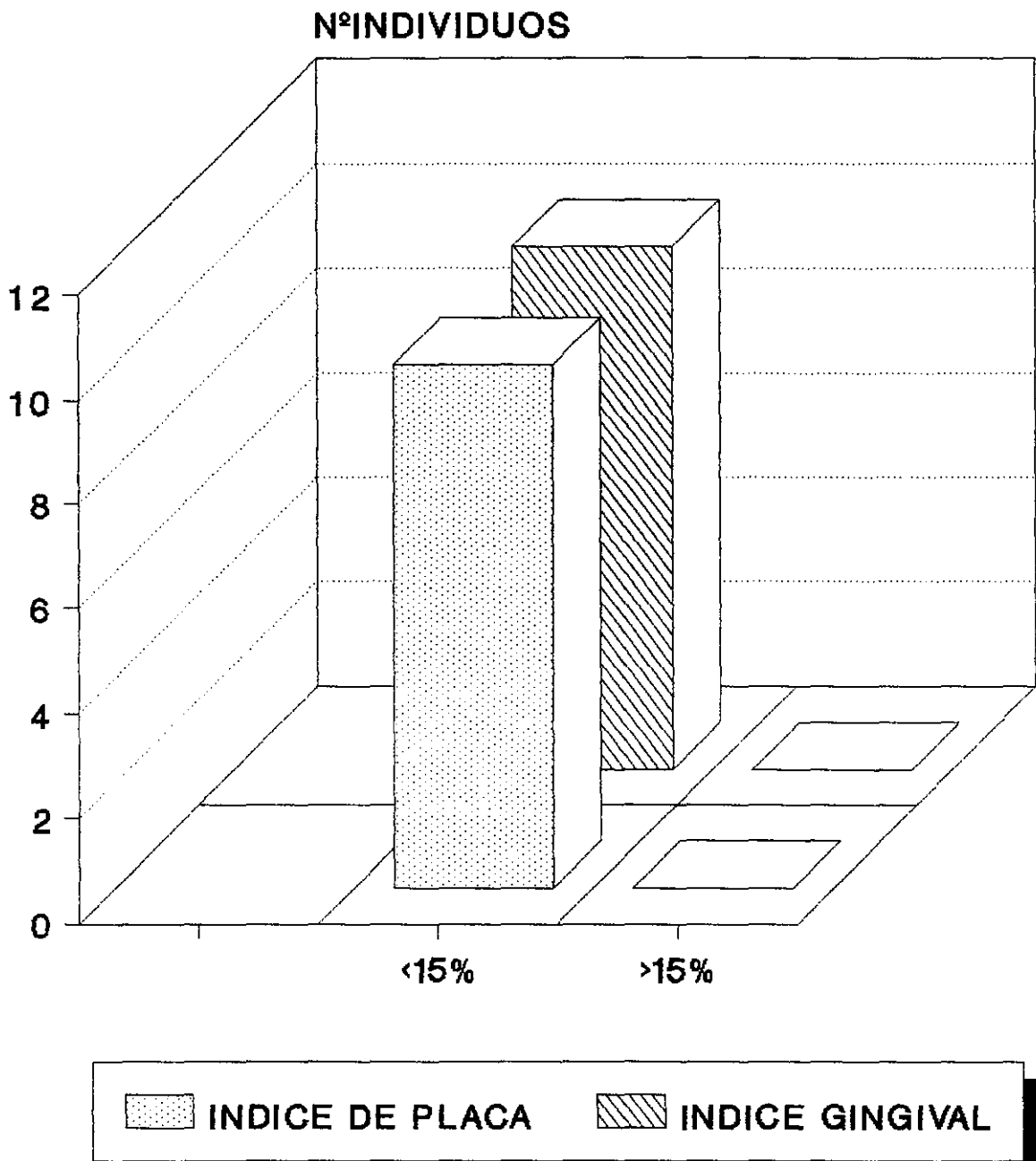
Como índices de salud oral se exploraron los mismos que al grupo de enfermos, el índice de placa osciló entre un 7% y un 25%, con una media de  $13.6 \pm 3.31\%$ . El índice de sangrado fue 0% como cifra inferior y de 8% como límite superior con un  $2.4\% \pm 1.6$  de índice medio (GRAFICA 7).

Clínicamente, y siguiendo los criterios de Pascualin, no se apreció agrandamiento gingival alguno (ver apartado de material y métodos).

### IV-2.2. RESULTADOS GENERALES DE MORFOMETRIA MEDIANTE ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES.

A partir de las fotografías realizadas en condiciones constantes de distancia y técnica

# INDICES ORALES DEL GRUPO CONTROL



GRAFICA 7

## **Resultados**

de ejecución, como ocurría en el grupo de enfermos trasplantados renales, para estimación por análisis de imagen, el IHG que osciló entre 0.646 y 0.898 pixeles cuadrados, con una media de  $0.782 \pm 0.04$  pixeles cuadrados. El "área dental" fue de 29754 pixeles cuadrados como límite inferior y 39392 pixeles cuadrados como cifra superior, con una medida morfométrica media de  $34672 \pm 1765.03$  pixeles cuadrados. El "área gingival" fue de  $26966.6 \pm 1520.88$  pixeles cuadrados, con un límite inferior de 23498 pixeles y el superior de 32219 pixeles (GRAFICA 8).

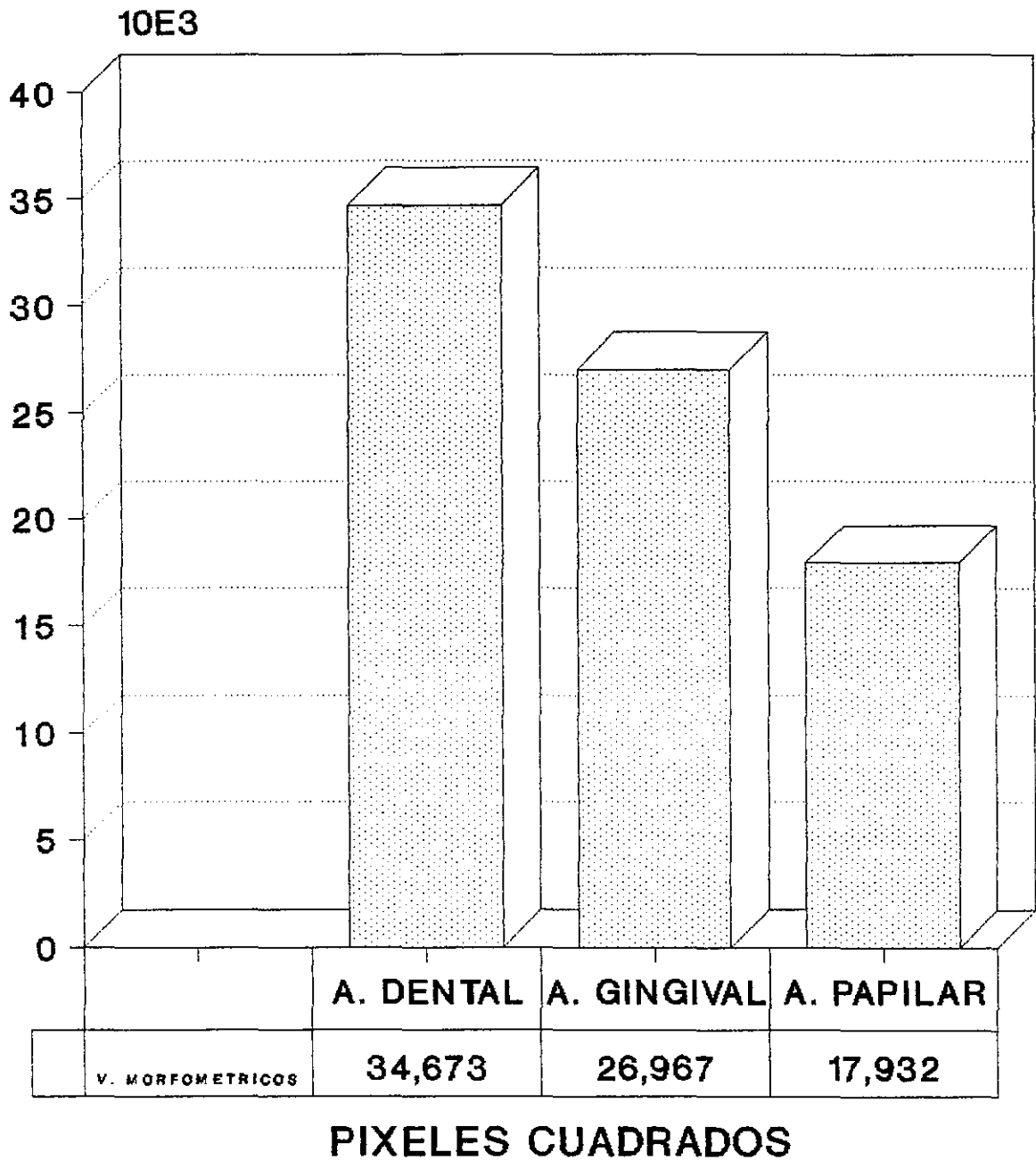
### **IV-2.3. RESULTADOS GENERALES DE INMUNOHISTOQUIMICA**

Del estudio del panel de anticuerpos monoclonales empleados para la determinación de fenómenos de actividad proliferativa y respuesta celular a nivel del corion mucoso de la encía, resultaron los siguientes valores medios: La población total de leucocitos (CD45) fue de 426.8 células/mm<sup>2</sup> (387.09-483.87), siendo la población total de linfocitos T (CD3) 414.5 células/mm<sup>2</sup> (400-435.4), de los cuales corresponden a la subpoblación de linfocitos cooperadores/inductores (CD4) 550.8 células/mm<sup>2</sup> (510-580.64) y a la subpoblación de linfocitos citotóxicos (CD8) 408.6 células/mm<sup>2</sup> (387-435). El cociente CD4/CD8 en nuestra población control fue de 1.3.

La población de linfocitos B totales medida mediante el anticuerpo monoclonal CD22, se contabilizó una media de 433.6 células/mm<sup>2</sup> con un intervalo comprendido entre 430-435. También se evaluó la población de macrófagos (CD68) (448.7 con intervalo entre 419.3-483.8) y las células K y NK (CD16) (CD57) presentes con un valor medio de 357 células/mm<sup>2</sup> y un rango de 274.1-451.6 y  $432.3 \pm 101.2$  células/mm<sup>2</sup> ( $322.5 \pm 564.5$ ) respectivamente (GRAFICA 9).

La población celular presente en la submucosa gingival de las muestras estudiadas demostró los siguientes valores medios en la expresión de distintos receptores y moléculas de histocompatibilidad: Una media de 559 células/mm<sup>2</sup> (483.8-654.1) presentaban receptor para interleuquina-2; 653.4 células/mm<sup>2</sup> (483.8-838.7) mostraron receptor para la fracción C3b del Complemento. No se determinó la expresión de antígenos de histocompatibilidad de tipo I y de

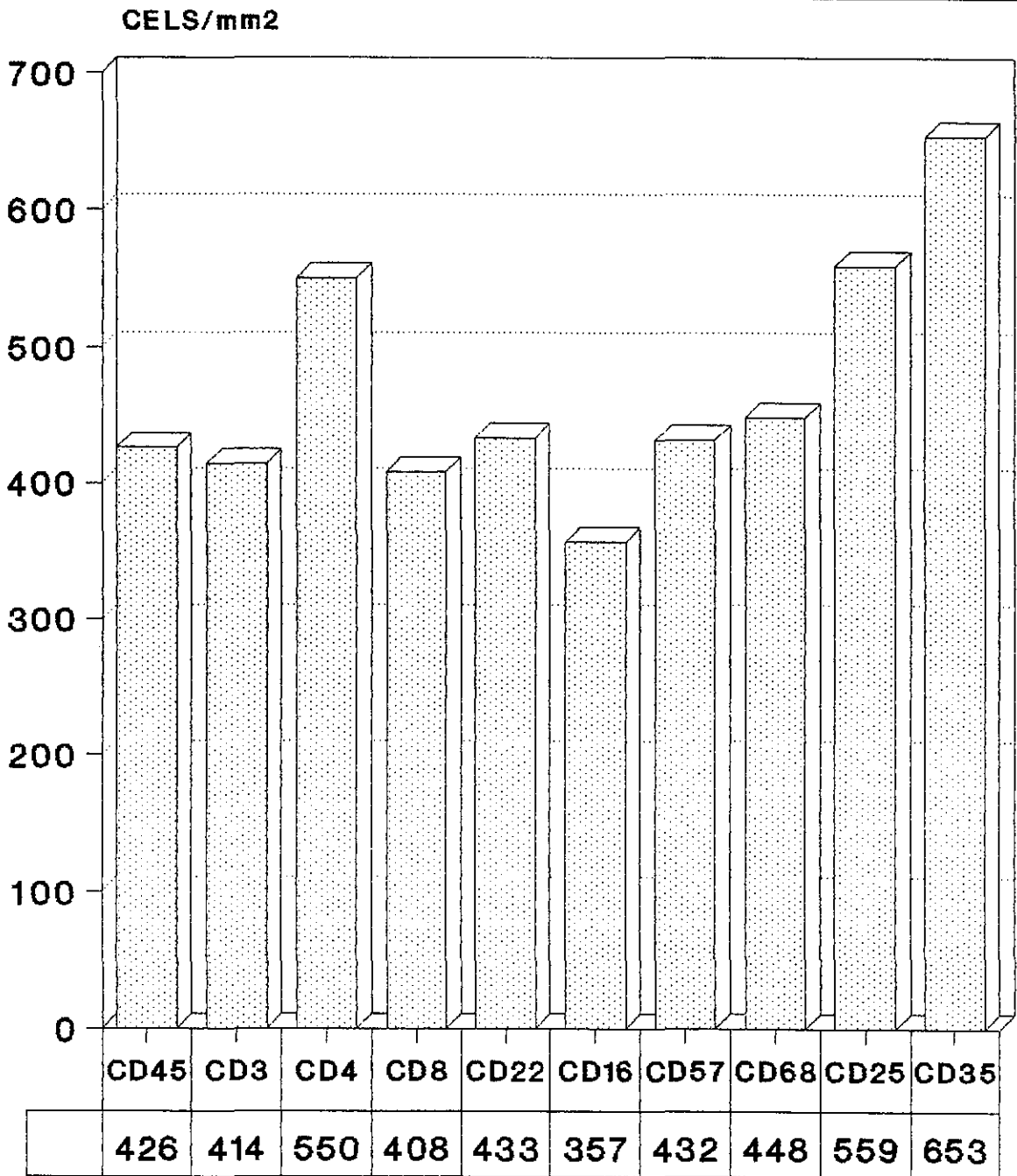
# GRUPO CONTROL INDICES MORFOMETRICOS



**GRAFICA 8**



# INFILTRADO INFLAMATORIO EN EL CORION MUCOSO DEL GRUPO CONTROL



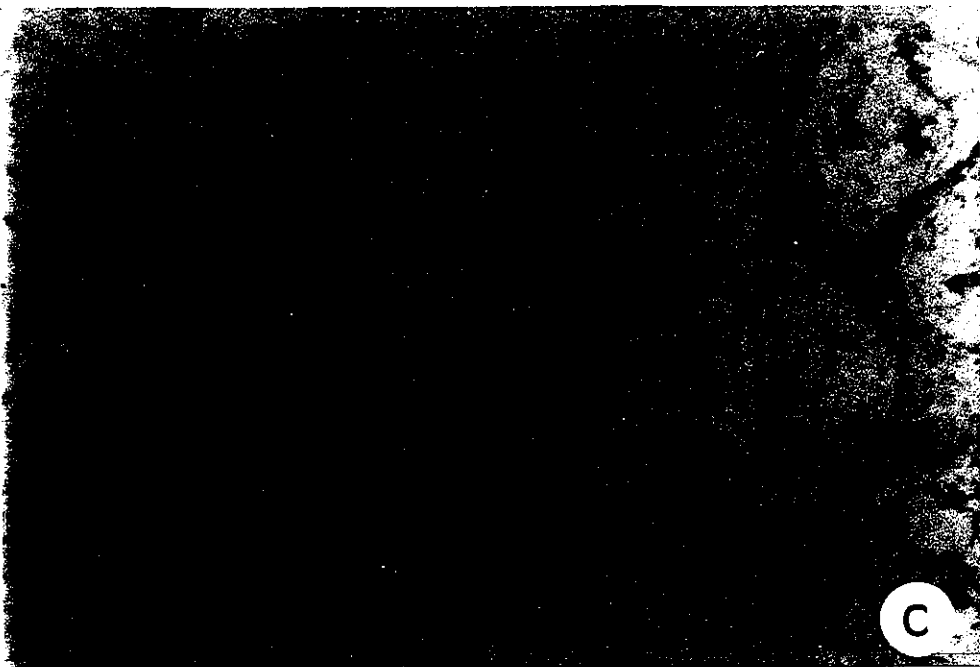
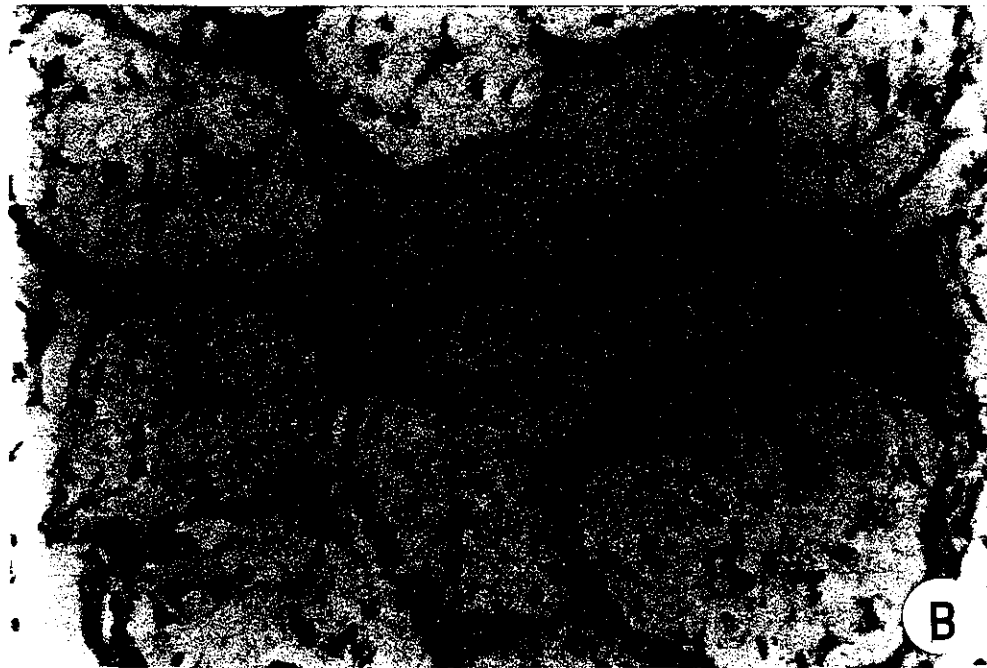
**GRAFICA 9**

*FIGURA 9. VALORACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
PRESENTE EN LA SUBMUCOSA GINGIVAL DE UN CONTROL.  
(Inmunofosfatasa Alcalina x20).*

*9A. Infiltrado inflamatorio (CD45) en una biopsia gingival control. Nótese el escaso número de células inmunotñidas de color rojo.*

*9B. Infiltrado inflamatorio (CD4) linfocitos T cooperadores/inductores.*

*9C. Infiltrado inflamatorio CD8) linfocitos T citotóxicos.*

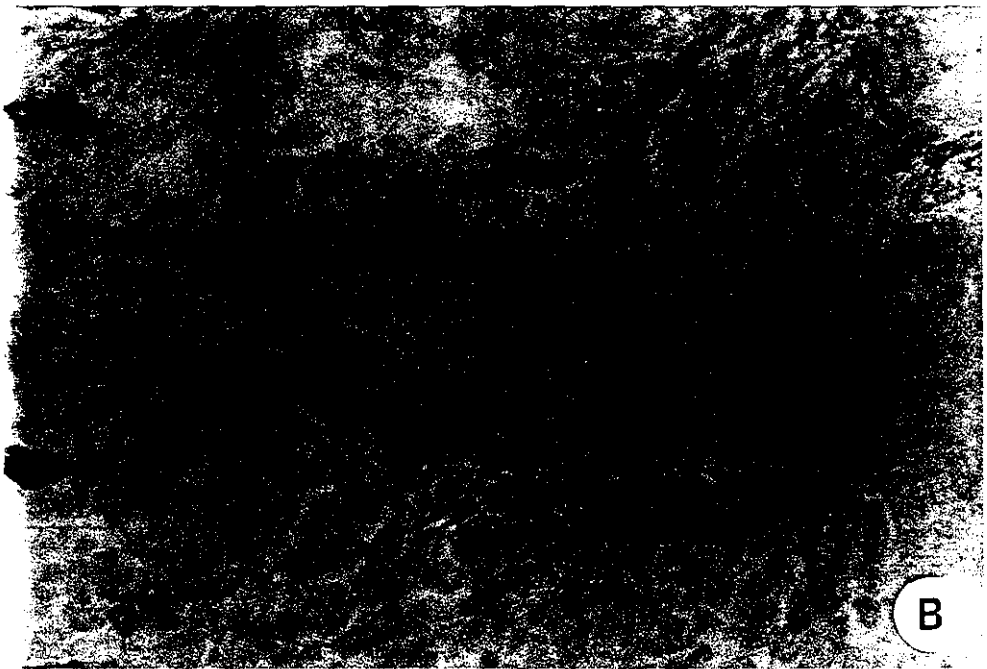
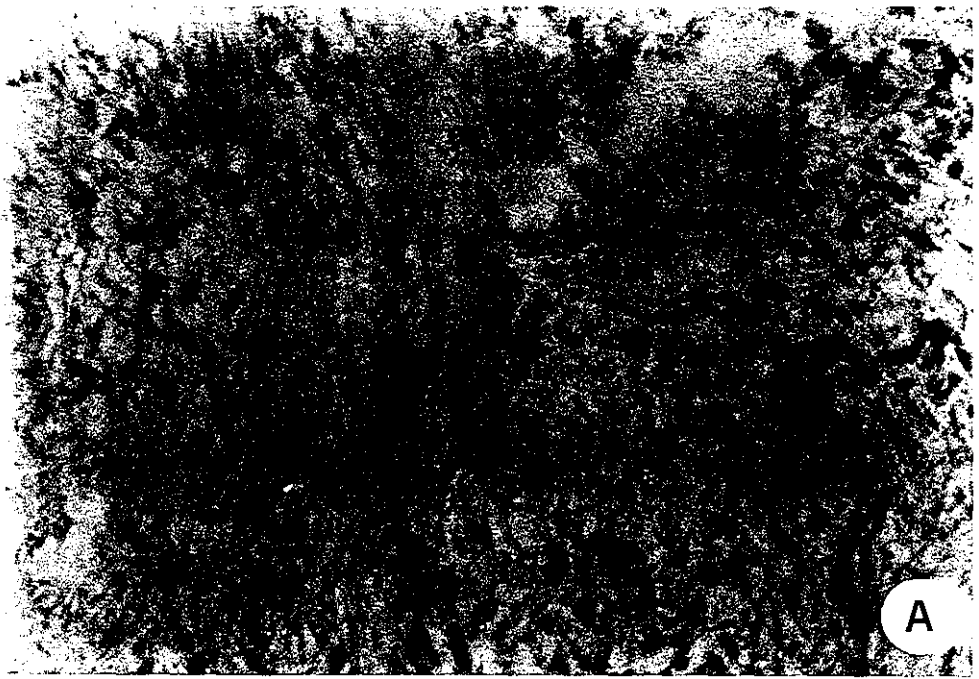


*FIGURA 10 VALORACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
PRESENTE EN LA SUBMUCOSA GINGIVAL DE UN CONTROL.  
(Inmunofosfatasa Alcalina x200).*

*10 A. Infiltrado inflamatorio (CD22) linfocitos B. Escasa presencia de células B inmunoteñidas.*

*10 B. Infiltrado inflamatorio macrofágico (CD68), las células inmunoteñidas se observan formando acúmulos de pequeño tamaño.*

*10 C. Infiltrado inflamatorio por células Natural Killer en la submucosa gingival.*



proliferación Ki-67.

#### **IV-3. RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE GRUPO DE PACIENTES TRASPLANTADOS Y GRUPO CONTROL.**

Respecto a la edad no se obtuvieron diferencias significativas entre las medias de ambas series.

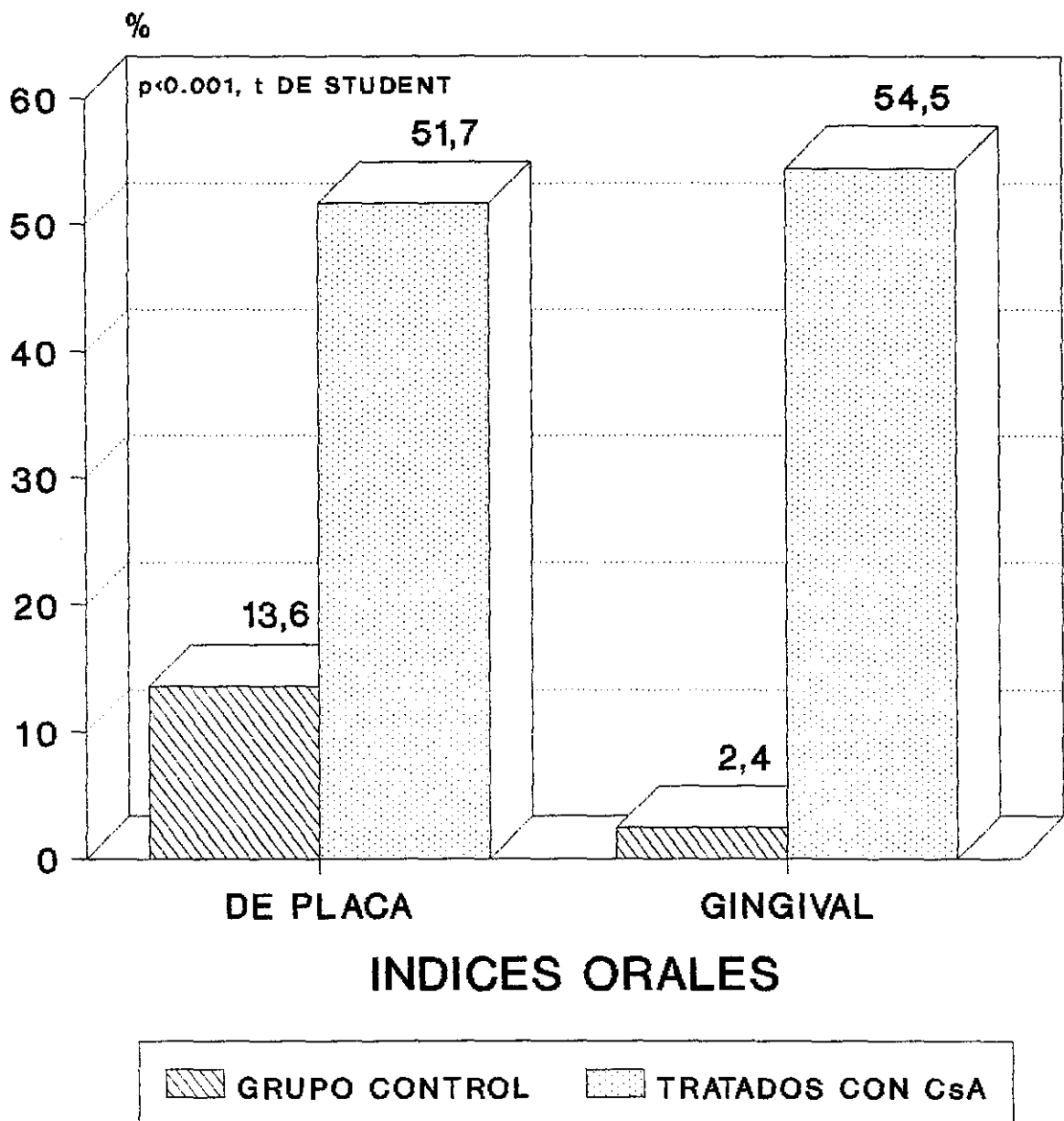
La función renal medida mediante los valores séricos de creatinina sí mostraron diferencias estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ , t de Student) entre ambos grupos. Es de destacar, como se expone más adelante, que los niveles de creatinina en los enfermos trasplantados se encuentran ligeramente por encima de los valores normales.

De igual forma, el estudio de la función hepática entre los distintos sujetos de cada grupo, reveló que sólo existían diferencias entre las cifras de GPT, con una valores medios de 40.4 mg (límite superior de la normalida) en el grupo problema, y 15.5 mg en el grupo control con una  $p < 0.05$  para la t de Student. No siendo significativa, por el contrario, los valores de GOT entre ambas series estudiadas.

##### **IV-3.1 ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ENTRE LOS INDICES DE SALUD ORAL DE AMBOS GRUPOS.**

Los índices de salud oral evaluados (índice de placa e índice de sangrado) mostraron importantes diferencias con significación estadística ( $p < 0.001$ , t de Student), constatando con ello la precaria y desigual situación del estado de salud oral de los enfermos sometidos a tratamiento crónico con inmunosupresores frente al grupo control (GRAFICA 10).

**COMPARACION ENTRE LOS INDICES ORALES DEL GRUPO CONTROL Y DE ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES.**



GRAFICA 10

#### **IV-3.2. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ENTRE LOS INDICES MORFOMETRICOS DE AMBOS GRUPOS.**

El estudio comparativo de los valores morfométricos de las diferentes superficies evaluadas demostró los siguientes resultados: Para las áreas dentales y papilares, comparados grupo de enfermos y control, no existen diferencias significativas. Por el contrario, sí se observan, cuando el estudio morfométrico se refiere al área gingival ( $p < 0.001$ , t de Student) (GRAFICA 11).

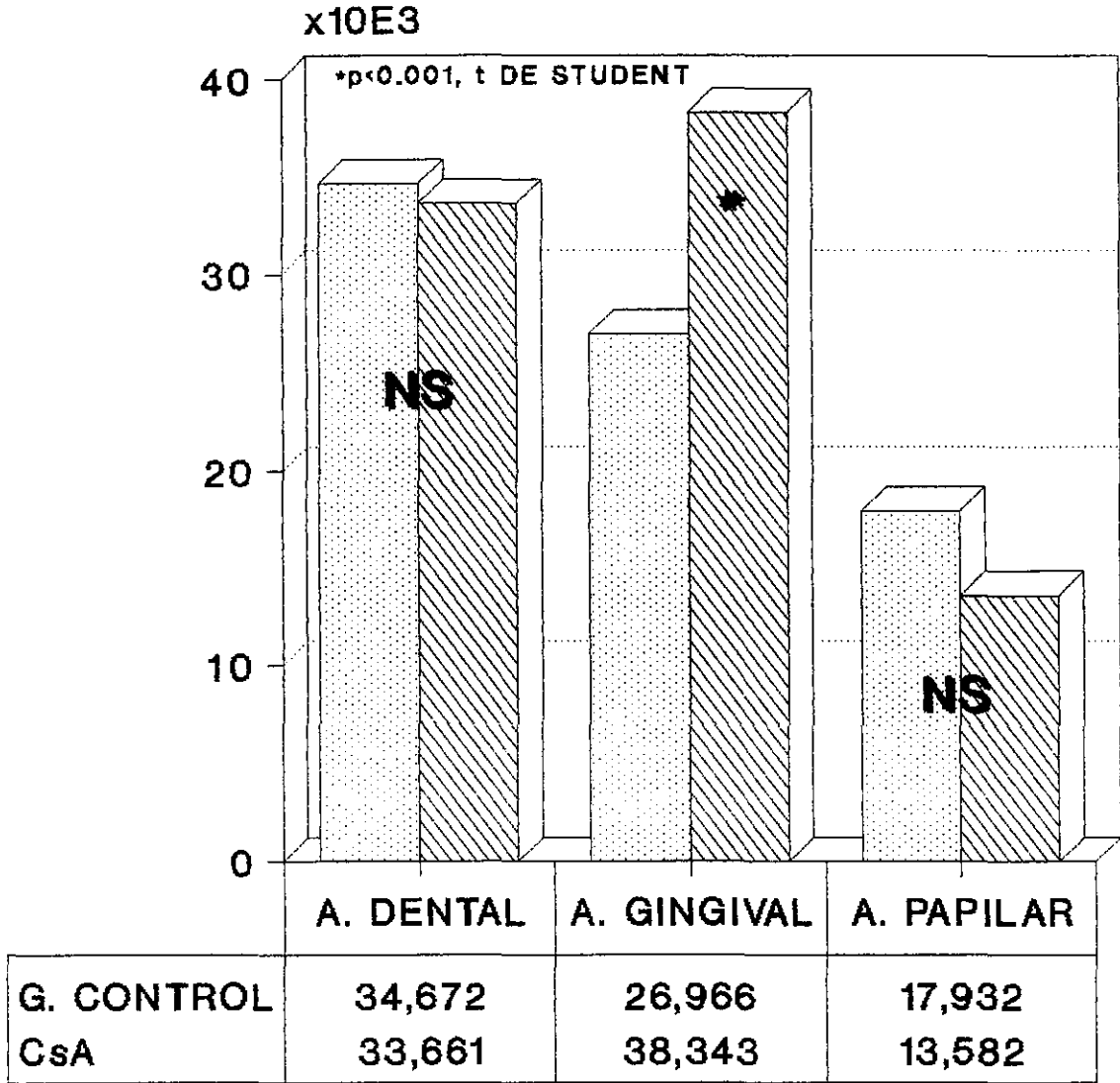
Es importante destacar que con la relación creada (IHG: AREA GINGIVAL/AREA DENTAL) para eliminar los posibles errores en la medición, al igual que sucede con el parámetro morfométrico anterior, se consigue una alta significación estadística ( $p < 0.001$ , t de Student), al comparar ambas series (GRAFICA 12).

#### **IV-3.3. INTERPRETACION DE RESULTADOS ESTADISTICOS OBTENIDOS AL COMPARAR LOS INFILTRADOS INFLAMATORIOS DE LAS BIOPSIAS DEL GRUPO DE ENFERMOS FRENTE A LOS SUJETOS CONTROL.**

La cuantificación del infiltrado inflamatorio por  $\text{mm}^2$  a nivel del corion mucoso de las biopsias gingivales ha permitido corroborar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el número total de células inflamatorias, determinadas por el AcMo CD45 ( $p < 0.001$ , t de Student), que reconoce el antígeno leucocitario común, de las muestras pertenecientes a los pacientes y a los sujetos sanos (GRAFICA 13). Profundizando en el estudio fenotípico de los infiltrados inflamatorios las encontramos al evaluar las poblaciones de linfocitos T totales (CD3) importantes diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ , t de Student), y entre las subpoblaciones de linfocitos T inductores/ cooperadores (CD4) ( $p < 0.001$ , t de Student), al igual que de linfocitos T citotóxicos (CD8) ( $p < 0.01$ , t de Student). Comparados los cocientes CD4/CD8 de los dos grupos se observaron diferencias, con un cociente mayor para el grupo de enfermos (1.82



**COMPARACION ENTRE LOS INDICES MORFOMETRICOS DEL GRUPO CONTROL Y DEL GRUPO DE ENF. TRASPLANTADOS**

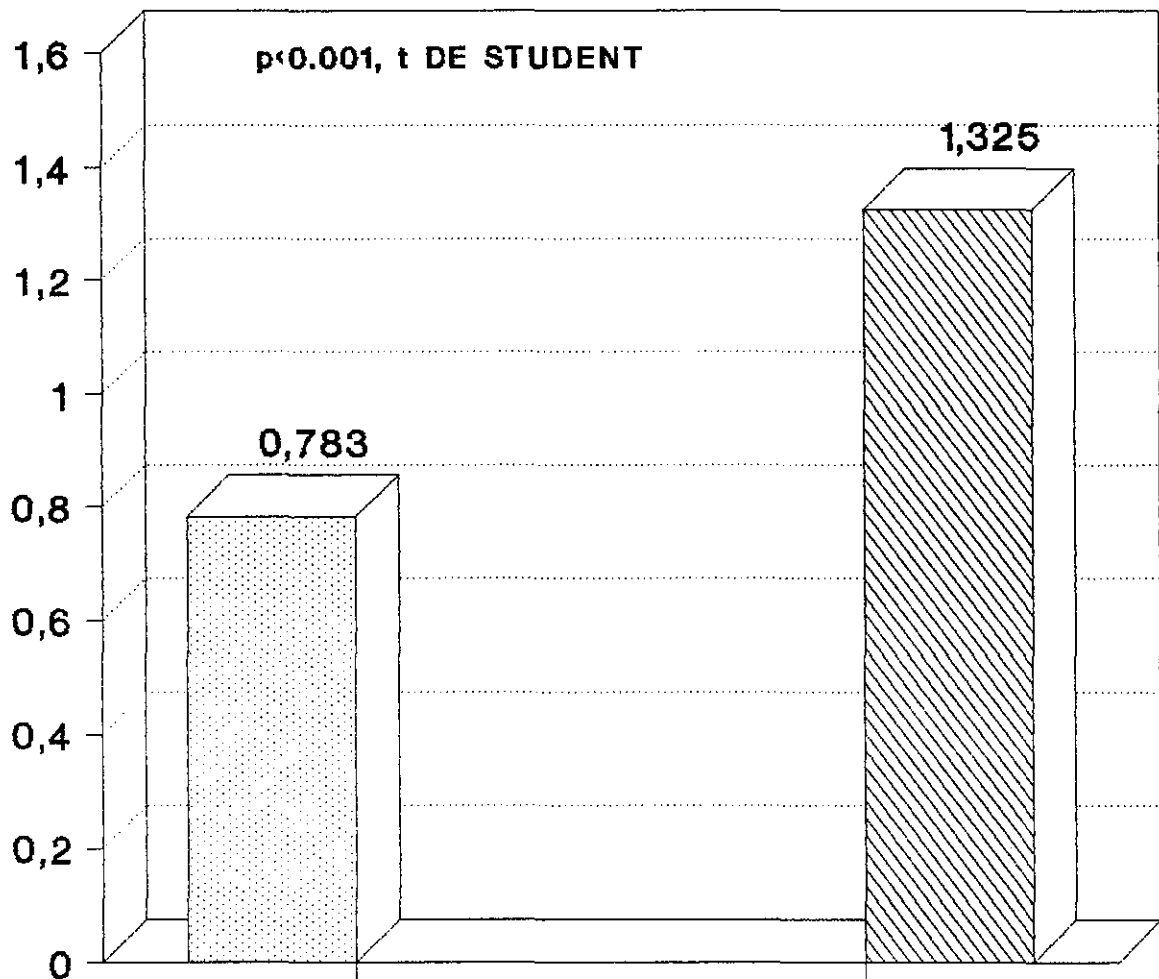


**INDICES MORFOMETRICOS**



**GRAFICA 11**

**COMPARACION ENTRE EL INDICE DE  
HIPERPLASIA GINGIVAL DEL GRUPO CONTROL  
RENTE AL GRUPO DE ENF. TRASPLANTADOS**



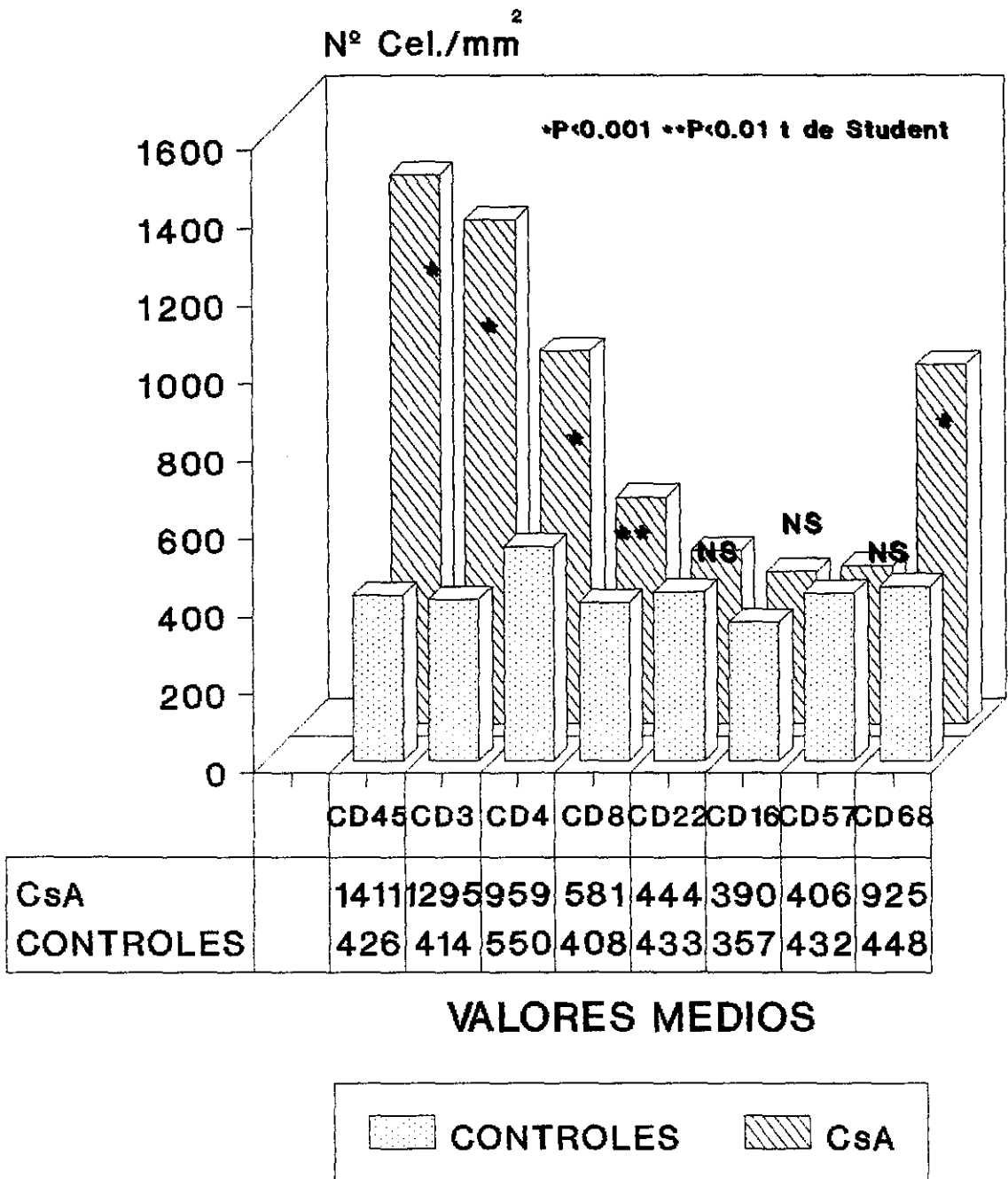
**HIPERPLASIA GINGIVAL**

**INDICE MORFOMETRICO**

**GRUPO CONTROL      GRUPO ENFERMOS**

**GRAFICA 12**

**COMPARACION DEL INFILTRADO INFLAMATORIO  
PRESENTE EN EL CORION MUCOSO GINGIVAL  
DE LOS GRUPOS CONTROL Y TRATADO CON CsA**



GRAFICA 13

## **Resultados**

$\pm 0.16$  versus  $1.35 \pm 0.05$ ) ( $p < 0.05$  para, t de Student). Por otro lado, la población de macrófagos (MAC 387 -CD68-) presente en la submucosa, también ha resultado ser muy diferente en sendos grupos ( $p < 0.001$ , t de Student).

Por el contrario, no demostramos diferencias con sustentación estadística entre las poblaciones celulares inmunoteñidas con los AcMo CD16 y CD57 (población de células K y NK - Natural Killer-), la población linfoide B total (CD22). Igualmente, no evidenciamos diferencias en la expresión del receptor de baja afinidad de IL-2, ni del receptor para la fracción C'3b del Complemento (C3br).

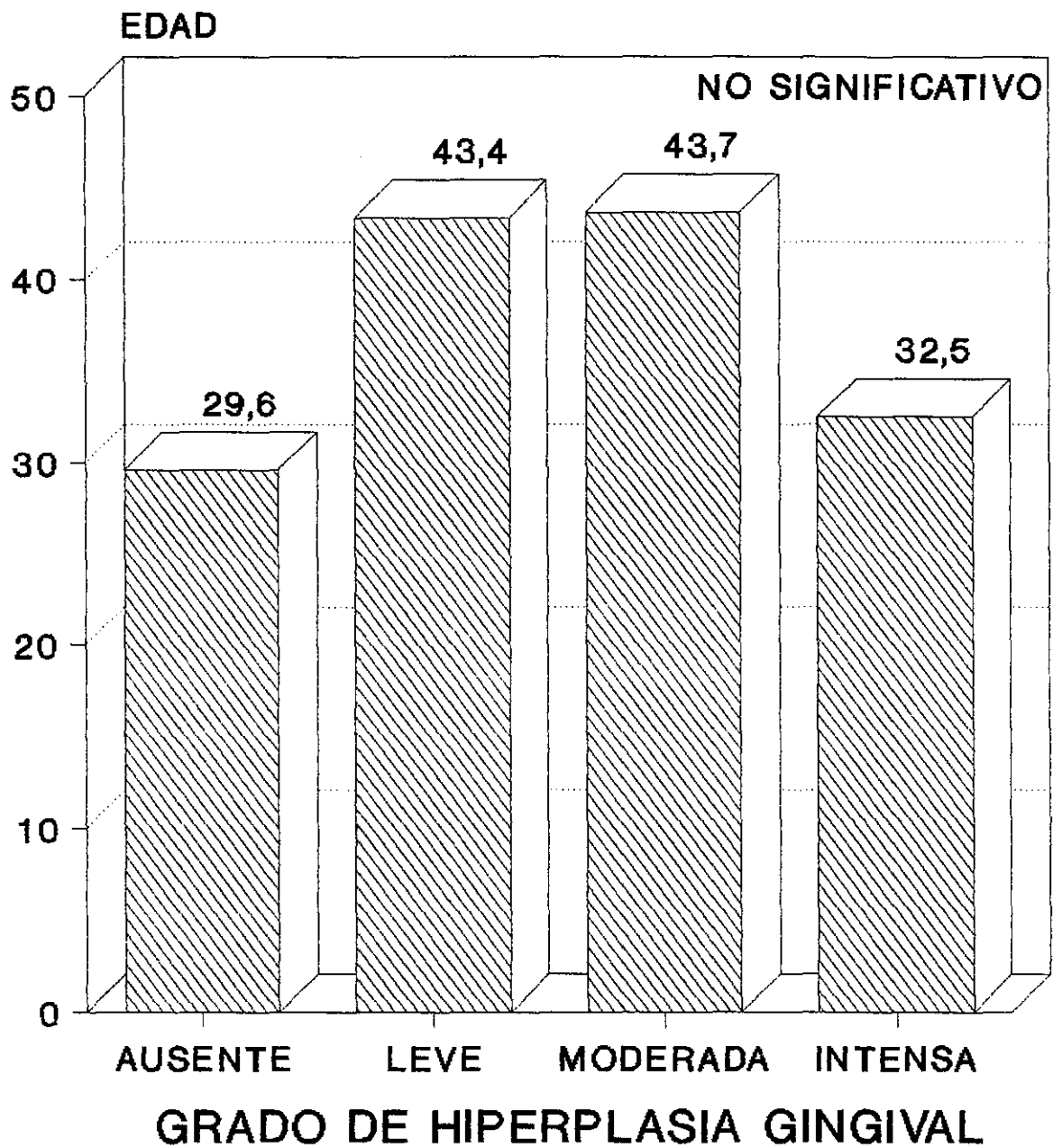
Los demás anticuerpos testificados no han podido ser comparados al no tener un número de muestras suficientes.

#### **IV-4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA VALORACION DEL GRADO DE AGRANDAMIENTO GINGIVAL COMPARADO CON LOS PARAMETROS CLINICOS EN EL GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS.**

Una vez comparados los parámetros clínicos con el grado de hiperplasia gingival, los resultados fueron los siguientes: El grado de crecimiento gingival no guarda relación con la edad, siendo similares en los casos de hiperplasia leve y moderada, mientras que las hiperplasias intensas, en nuestra serie de enfermos, se observa en sujetos con una media de edad menor (GRAFICA 14).

El sexo tampoco es un factor que influye en el desarrollo de hiperplasia ni en la intensidad de la misma al menos en nuestra serie (TABLA IV).

**COMPARACION ENTRE EL GRADO DE  
HIPERPLASIA GINGIVAL Y LA EDAD  
EN EL GRUPO DE ENF. TRASPLANTADOS**



GRAFICA 14

TABLA IV. GRADO DE HIPERPLASIA SEGUN SEXO

GRADO DE HIPERPLASIA	HOMBRES	MUJERES	NIVEL DE SIGN. TEST CHI <sup>2</sup>
AUSENTE Y LEVE	6	6	NO SIGNIFICATIVO
MODERADA E INTENSA	8	5	NO SIGNIFICATIVO
TOTAL <sup>†</sup>	14	11	

\* Se excluyen los pacientes gingivectomizados (n=5).

El lugar de procedencia o seguimiento, donde se siguen diferentes protocolos de dosificación de CsA tampoco ha manifestado influencia en los resultados (TABLA I).

TABLA V. GRADO DE HIPERPLASIA Y LUGAR DE SEGUIMIENTO.

GRADO DE HIPERPLASIA	GRANADA	MALAGA	NIVEL DE SIGN. TEST CHI <sup>2</sup>
AUSENTE Y LEVE	8	4	NO SIGNIFICATIVO
MODERADA E INTENSA	8	5	NO SIGNIFICATIVO
TOTAL <sup>†</sup>	16	9	25

\* Se excluyen los pacientes gingivectomizados (n=5).

Si bien no es posible demostrar globalmente diferencias estadísticamente

## *Resultados*

significativas entre el tiempo transcurrido de la colocación del injerto y el grado de hiperplasia gingival desarrollado, destaca una ligera tendencia a que los pacientes que no tienen hiperplasia gingival o es de grado leve (27 y 37.5 meses respectivamente), llevan menos tiempo trasplantados que aquellos que manifiestan hiperplasia gingival moderada o intensa (40.8 y 49.8 meses respectivamente).

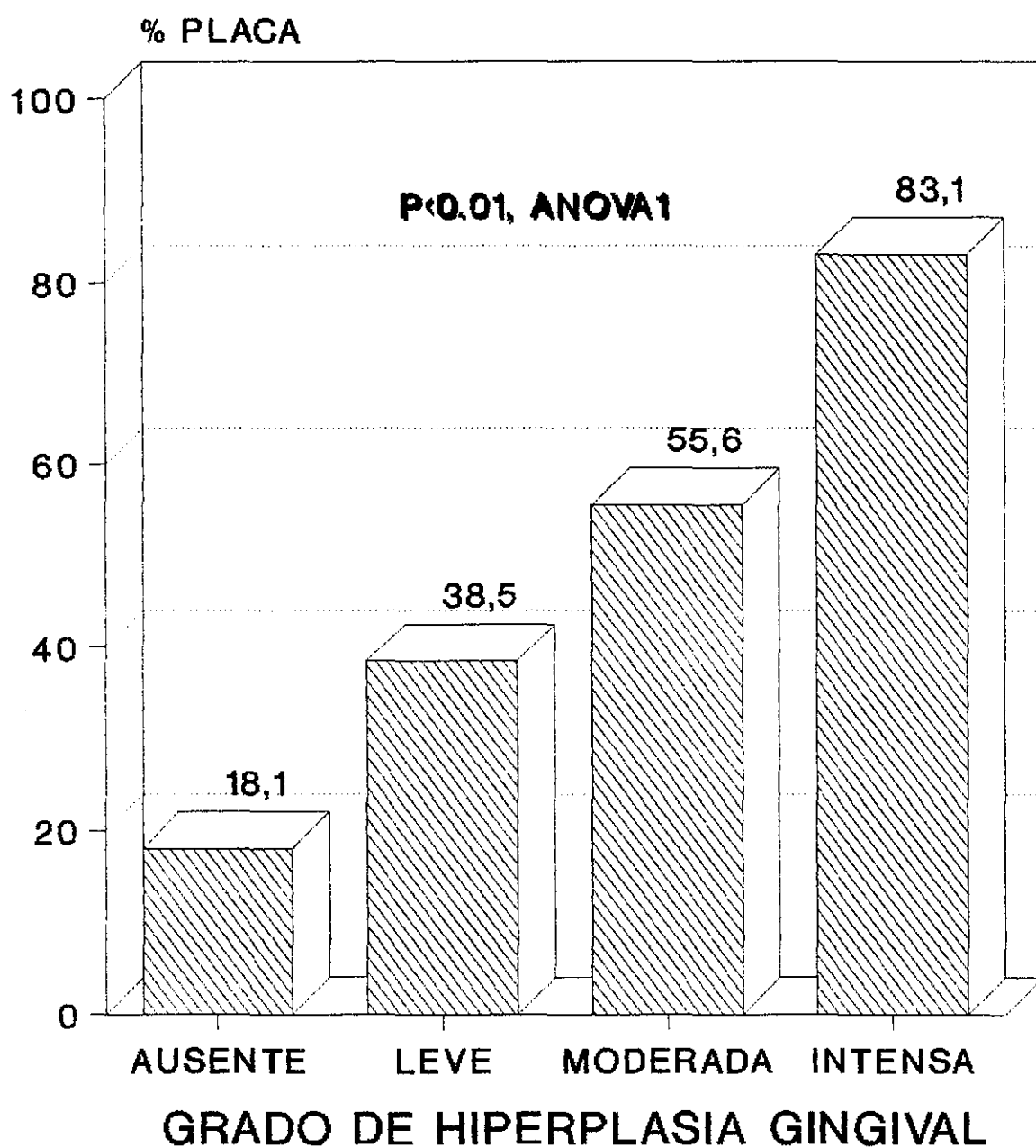
En nuestra serie los niveles de CsA sérica no guardan relación con el grado de hiperplasia gingival, encontrándose todos los casos dentro de valores terapéuticos (HG leve 142 ng/ml, HG moderada 158.2 ng/ml y HG intensa 129 ng/ml). De igual forma los valores de CsA acumulada comparados globalmente con la hiperplasia gingival, no tienen significación estadística. No obstante la CsA acumulada en el caso de hiperplasias gingivales leves es de 175586.4 frente a 323937.5 mg en los casos de hiperplasia gingival intensa.

De la relación entre los parámetros analíticos y el grado de crecimiento gingival, dividido en ausente, leve, moderado, intenso, obtuvimos los siguientes resultados: La comparación con la cifra de creatinina sérica no demuestra relación significativa alguna aunque los valores se encuentran por encima de los normales (en el caso de hiperplasia gingival leve 1.35, en la hiperplasia moderada 2.1, e hiperplasia intensa 1.97), mientras que en ausencia de hiperplasia es de 1.03.

Lo mismo ocurre con las cifras séricas de los enzimas que orientan sobre el funcionamiento hepático (GOT, GPT).

Al confrontar estadísticamente, los datos de salud oral con el grado de hiperplasia, obtuvimos los siguientes resultados: Los índices de placa y sangrado demuestran guardar una alta relación con el grado de hiperplasia ( $p < 0.01$ , ANOVA1) (GRAFICA 15A, 15B), siendo la media de placa del 18.1% en los sujetos sin hiperplasia gingival, frente al 83.1% en el caso de los enfermos con hiperplasia gingival intensa. Igual sucede con el índice de sangrado que de un 9.12% de media que muestran los enfermos trasplantados que no han desarrollado hiperplasia gingival frente al 88.8%

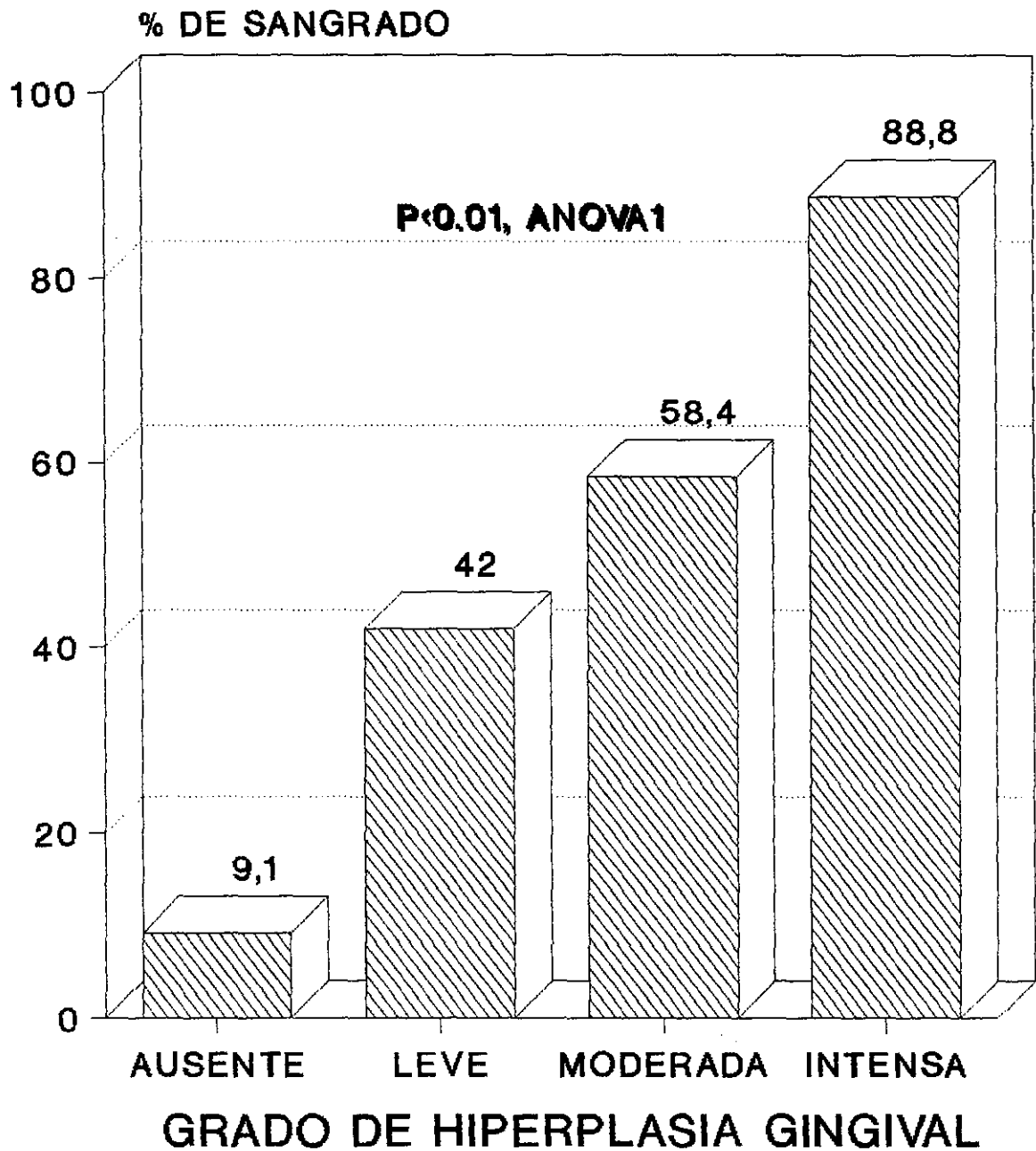
**COMPARACION ENTRE EL GRADO DE HIPERPLASIA GINGIVAL Y EL INDICE DE PLACA EN LOS ENF. TRASPLANTADOS**



**GRAFICA 15A**

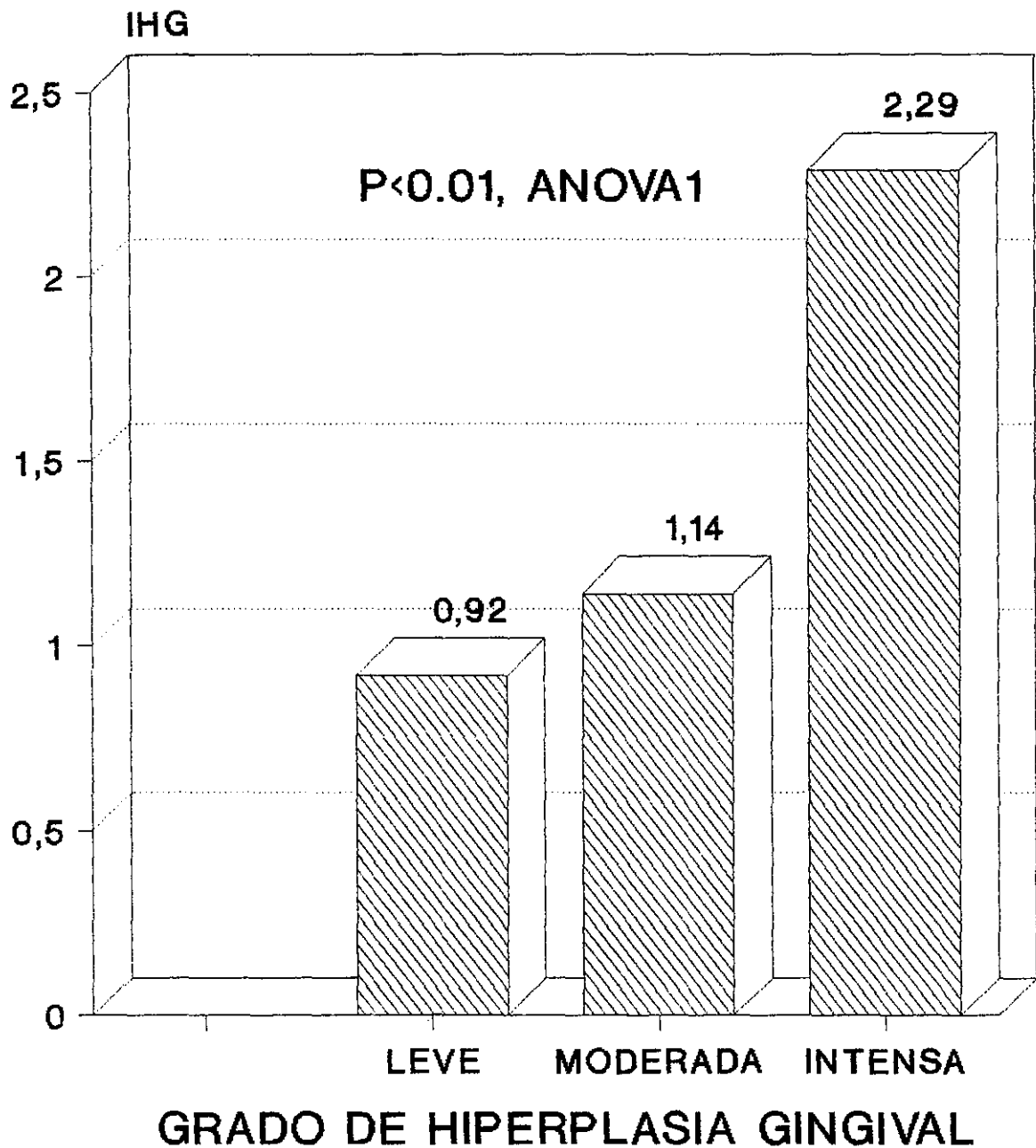


**COMPARACION ENTRE EL GRADO DE  
HIPERPLASIA GINGIVAL Y EL INDICE  
DE SANGRADO EN LOS ENF. TRASPLANTADOS**



**GRAFICA 15B**

**COMPARACION ENTRE EL GRADO DE  
HIPERPLASIA GINGIVAL CLINICA Y  
MORFOMETRICA EN LOS ENF. TRASPLANTADOS**



**GRAFICA 16**

que presentan los sujetos con hiperplasia gingival intensa (GRAFICA 15B).

Por último, hemos demostrado una relación estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ , ANOVA1), entre los dos métodos empleados para la valoración de la hiperplasia gingival (método clínico y cuantificación por análisis digital de imágenes) (GRAFICA 16).

#### IV-5. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA COMPARACION DE LOS INDICES MORFOMETRICOS CON LOS DATOS CLINICOS EN LA SERIE DE ENFERMOS TRASPLANTADOS.

El área dental descubierta, como era previsible, no se relaciona de forma estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros clínicos con que ha sido enfrentado (edad, sexo, dosis de CsA acumulada, transaminasas, creatinina, data del trasplante renal, índice de placa, índice gingival).

El área gingival sólo muestra una relación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ,  $r$  de Pearson=0.47) con el índice de sangrado, si bien es una correlación baja. Con el resto de las variables clínicas con que se ha comparado no presenta relación de significación alguna.

El tamaño de las papilas dentales se correlaciona con el índice de placa ( $r=0.59$ , coeficiente de Pearson) y con el índice de sangrado ( $r=0.61$ ) (TABLA VI).

El IHG también se relaciona de forma estadísticamente significativa con el índice de placa ( $p < 0.05$ ,  $r=0.51$ ), y con el índice de sangrado ( $p < 0.05$ ,  $r=0.54$ ), si bien esta relación se establece para los valores más altos de IHG y de índice de placa y sangrado. En este sentido, el IHG difiere entre los enfermos que presentan índices orales inferiores y superiores al 60%. En nuestra serie los enfermos que no desarrollan hiperplasia o es de grado leve (IHG medio: 1.03) se

TABLA VI

GRADO DE CORRELACION ENTRE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS Y CLINICOS

	INDICE PLACA	INDICE GINGIV.	FECHA TRASPL.	ED	DOSIS SER. CSA	DOSIS ACUMU. CSA	CREATI	GOT	GPT	INDICE HIPERP. GINGIV.	AREA GINGIV.	AREA DENTAL	AREA PAPILA
LHIPER.GING	0.51	0.54	0.43		-0.51								
A.GINGIVAL		0.47											
A.DENTAL										-0.72	0.37		
A.PAPILAR	0.59	0.61								0.36			
LPLACA		0.77	0.43			0.64	0.55			0.51			0.59
LGINGIVAL	0.77		0.48							0.54	0.47		0.61
FECHA TRASPLANT.	0.43	0.48				0.88				0.43			
D.SERICA CSA										-0.51			
DOSIS ACUMULADA	0.64		0.88										
CREATININA	0.55												
GOT									0.72				
GPT								0.72					
EDAD													

Los valores corresponden al coeficiente de correlación de Pearson.

	CD45	CD3	CD4	CD8	CD22	CD16	CD57	HLADR	CD10	HLAI	C3BR	K167	MACR	IL2	COC.
LPLAC	0.42									0.54					
LGING	0.59	0.37		0.38	0.41			0.53		0.55			0.50		
F.TRAS															
D.CsA									-0.61						
D.ACUM															
CREATI															0.57
GOT															
GPT															
EDAD											-0.39				0.54
CD45		0.81	0.78	0.66	0.40			0.67	0.53	0.66	0.42		0.75	0.55	
CD3	0.81		0.63	0.75				0.51	0.40			0.51		0.44	
CD4	0.78	0.63		0.47				0.59	0.41	0.46	0.43			0.53	
CD8	0.66	0.75	0.47					0.52	0.45		0.58	0.51		0.39	
CD22	0.40						0.52	0.63	0.43	0.66	0.69				
CD16					0.76		0.75	0.60		0.56	0.69				
CD57					0.52	0.75		0.56			0.69			0.42	
HLA-DR	0.67	0.51	0.59	0.52	0.63	0.60	0.56		0.72	0.65	0.71	0.67	0.69	0.38	
CD10	0.53	0.40	0.41	0.45	0.43			0.72		0.59	0.43	0.62	0.45		
HLAI	0.66		0.46		0.66	0.56		0.65	0.59		0.56		0.44		
C3BR	0.42		0.43	0.58	0.69	0.69	0.69	0.71	0.43	0.56		0.55	0.45	0.37	
K167		0.51						0.67	0.62		0.55		0.66		
MACROF								0.69	0.45	0.44	0.45	0.66		0.45	

F.TRAS=fecha de trasplante; D.CsA=dosis sérica de CsA; D.ACUM=dosis acumulativa de CsA.  
 los valores corresponden al coeficiente de correlación de Pearson.

TABLA VIII

GRADO DE CORRELACION ENTRE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS E INMUNOHISTOQUIMICOS.

	LHIPER.GIN	A. PAPILAR	A. DENTAL	A.GINGIVAL
CD45	0.53	0.43		
CD3				
CD4				
CD8				
CD22	0.41	0.49		
CD16				
CD57				
HLA-DR	0.58	0.40	-0.49	
CD10	0.65		-0.49	
HLAI	0.76	0.61	-0.57	
C3BR	0.44	0.50		
KI67				
MACROFAGOS	0.40	0.39		0.41
IL2				
Csa IN SITU	0.80	0.73		

los valores corresponden al coeficiente de correlacion de Pearson

## **Resultados**

sitúan con índices orales inferiores al 60%; mientras que por encima de estos valores se encuentran los sujetos que desarrollan hiperplasia moderada o intensa, con un IHG medio de 1.94 ( $p < 0.05$ , t de Student) (GRAFICA 18).

El IHG también se relaciona con la Fecha de trasplante renal. En los enfermos trasplantados observamos como los individuos que han sobrepasado los dos años de trasplantados presentan los mayores índices morfométricos de sobrecrecimiento gingival (IHG media=1.7) con significación estadística ( $p < 0.05$ , t de Student) (GRAFICA 19).

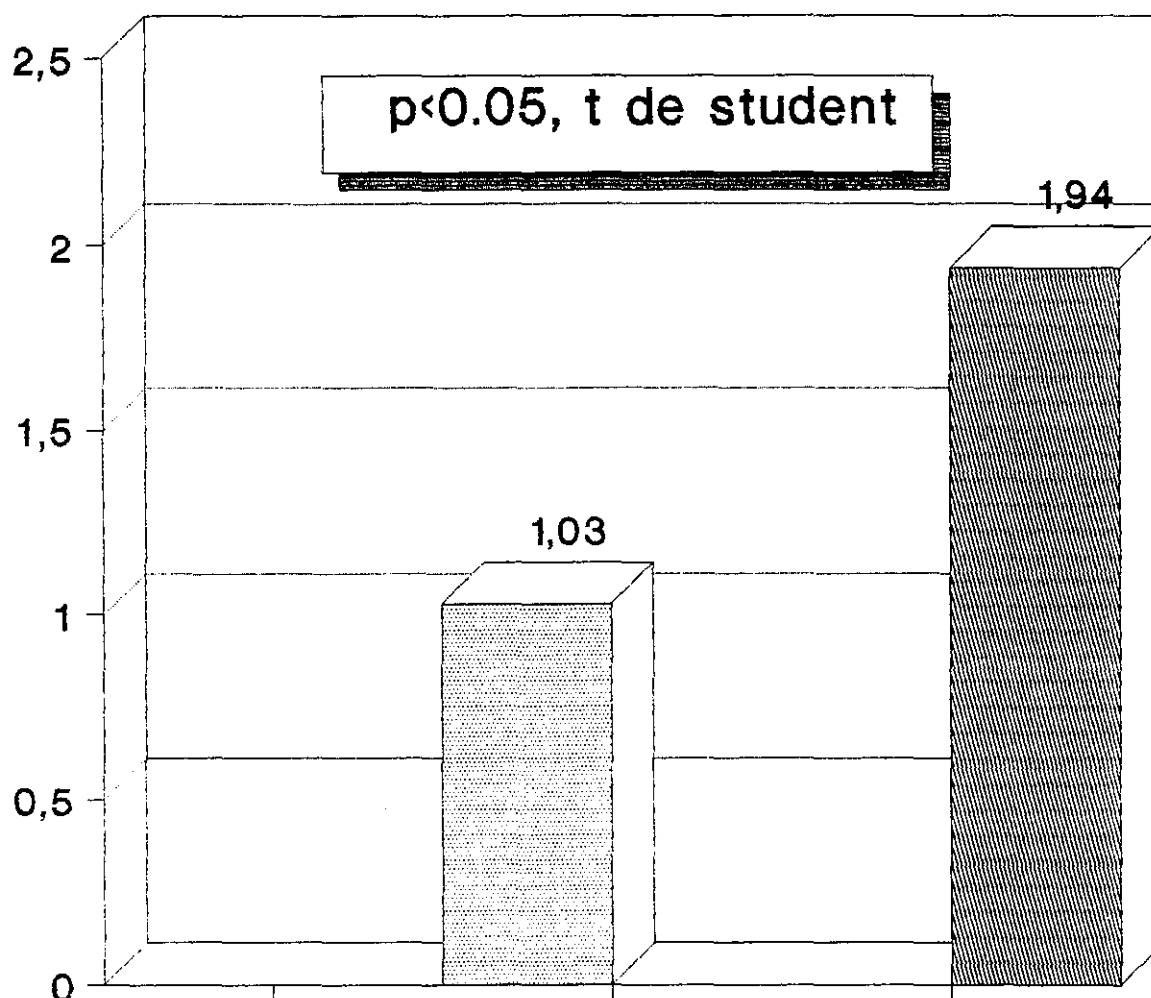
### **IV-6. ANALISIS DE LOS RESULTADOS ESTADISTICOS ENTRE HIPERPLASIA GINGIVAL CLINICA Y EL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LA BIOPSIA GINGIVAL DEL GRUPO DE ENFERMOS.**

Del análisis de los resultados se deduce que el infiltrado inflamatorio total (CD45) sufre se incrementa a medida que la hiperplasia gingival se hace más severa. En particular las subpoblaciones que aumentan de forma estadísticamente significativa son los linfocitos inductores/cooperadores (CD4) y macrófagos (CD68) (GRAFICA 20).

La distribución en acúmulos linfoides remediando incipientes folículos linfoides, se pone de manifiesto al evaluar el infiltrado inflamatorio por linfocitos B. A pesar de no alcanzar significación estadística ( $p < 0.1$ , ANOVA1) la población total (CD22) con referencia al grado de hiperplasia, es manifiesto el incremento en la expresión de CD10 -presente en las células reticulares dendríticas de los folículos y del receptor para C3b (CD35) que también identifica células B precursoras (GRAFICA 21).

El resto de las subpoblaciones como son los linfocitos T citotóxicos (CD8) y células K (CD16) y NK (CD57) no de muestran significación estadística (GRAFICA 22).

# INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL EN LOS ENFERMOS TRSPLANTADOS SEGUN INDICES DE PLACA Y GINGIVAL



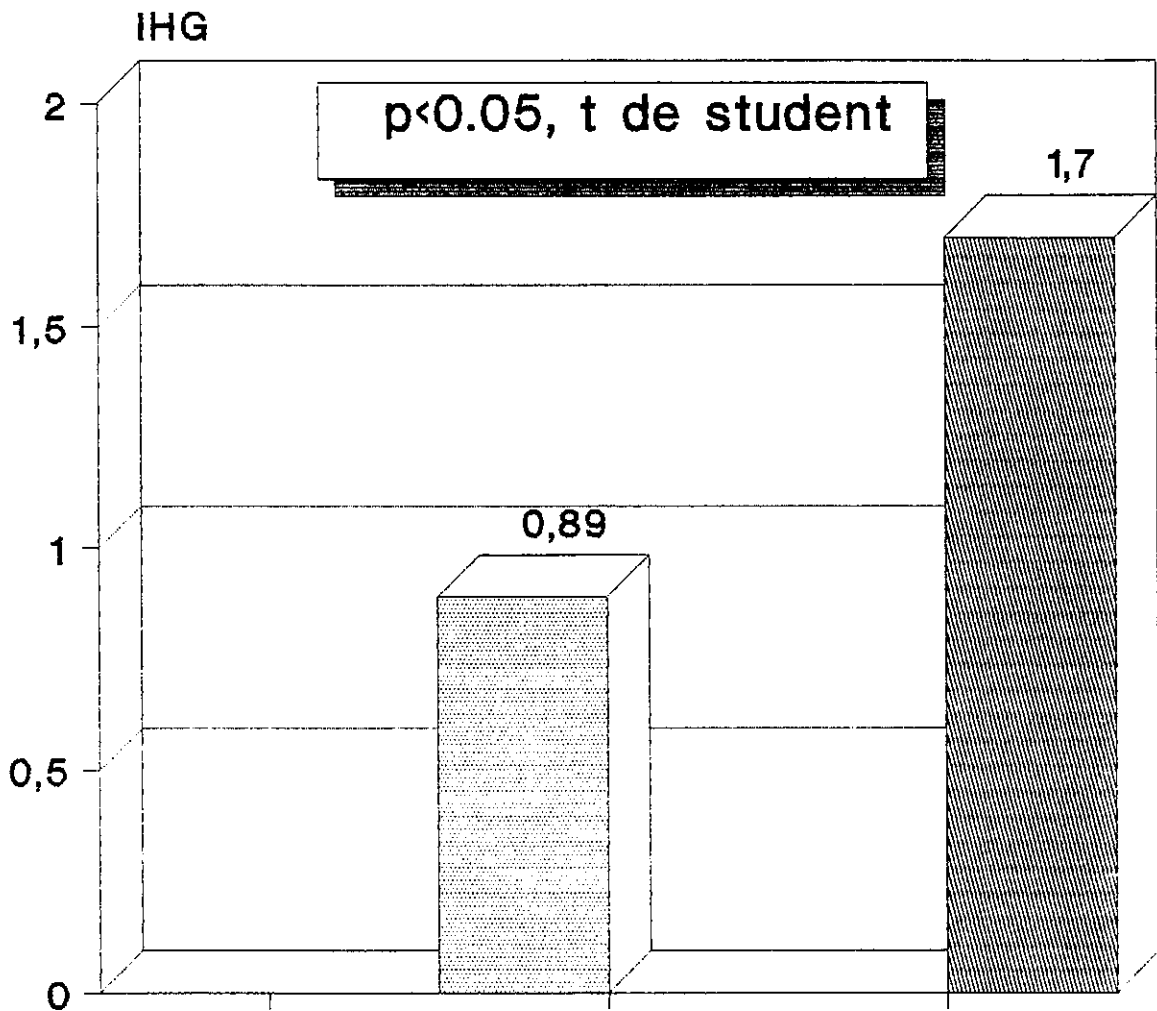
## INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL

I. ORALES <60%      I. ORALES >60%

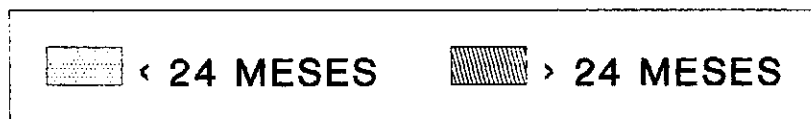
GRAFICA 18



# INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL EN LOS ENFERMOS TRSPLANTADOS SEGUN DATA DE TRASPLANTE

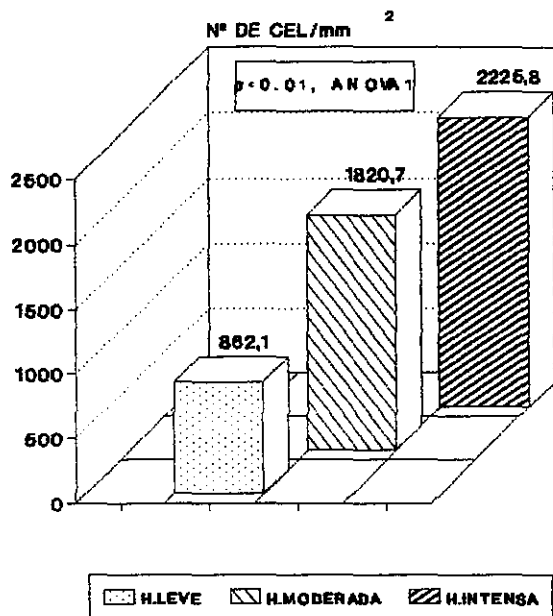


## INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL



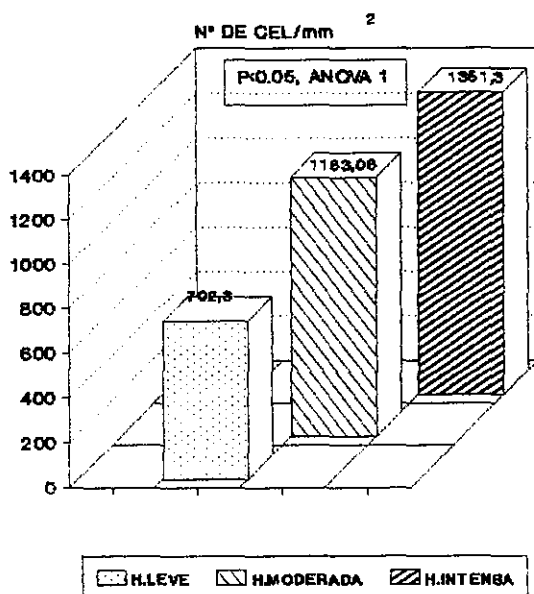
GRAFICA 19

# INFILTRADO INFLAMATORIO GINGIVAL SEGUN EL GRADO DE HIPERPLASIA EN SUJETOS TRASPLANTADOS RENALES



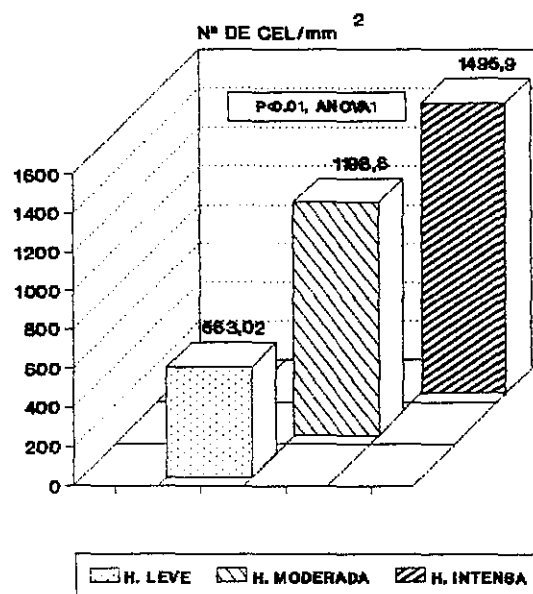
**CD45**

GRAFICA 20



**CD4**

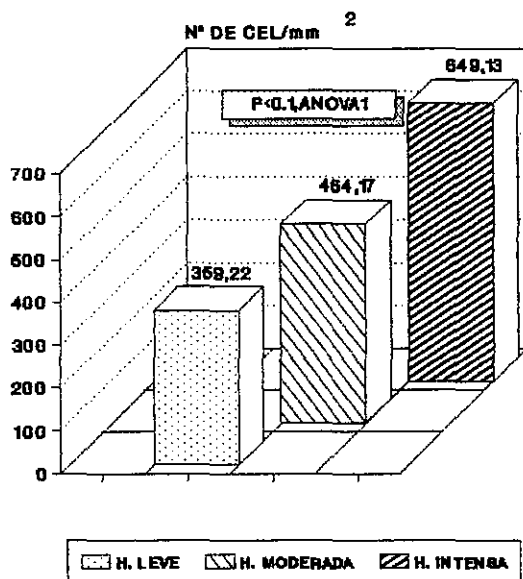
GRAFICA 20



**MACROFAGOS**

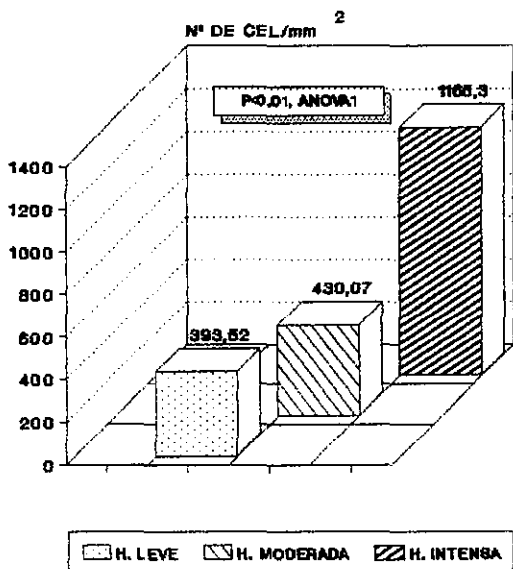
GRAFICA 20

# INFILTRADO INFLAMATORIO GINGIVAL SEGUN EL GRADO DE HIPERPLASIA EN SUJETOS TRASPLANTADOS RENALES



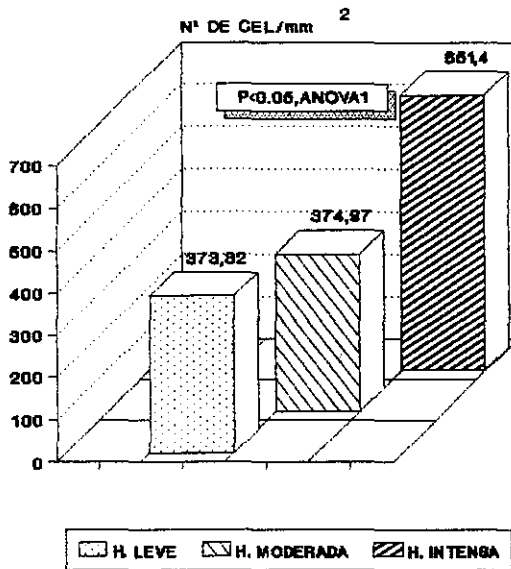
CD22

GRAFICA 21



C3BR

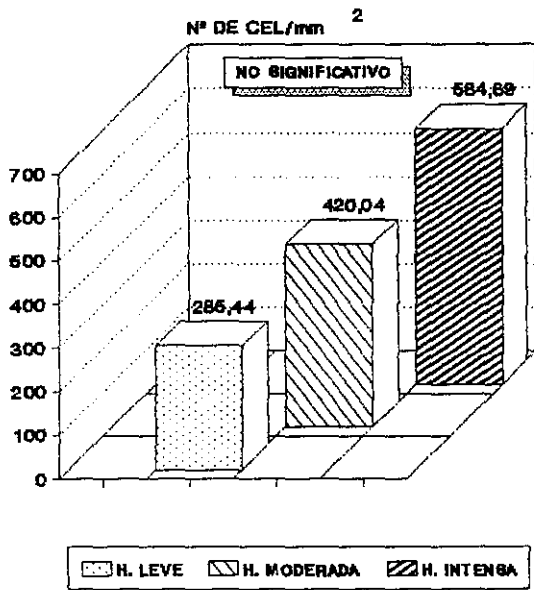
GRAFICA 21



CD10

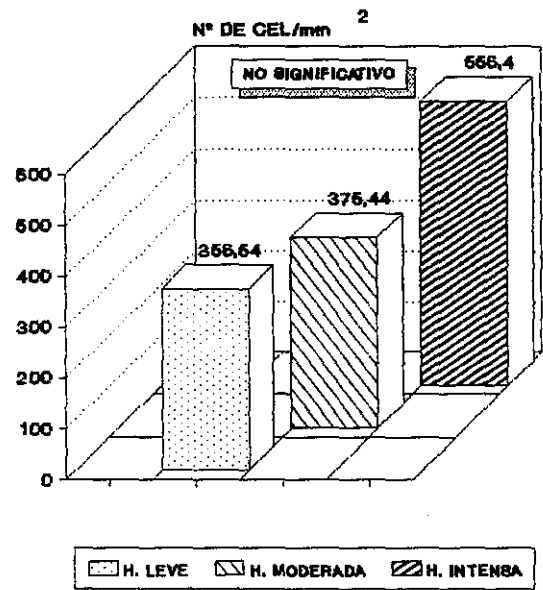
GRAFICA 21

# INFILTRADO INFLAMATORIO GINGIVAL SEGUN EL GRADO DE HIPERPLASIA EN SUJETOS TRASPLANTADOS RENALES



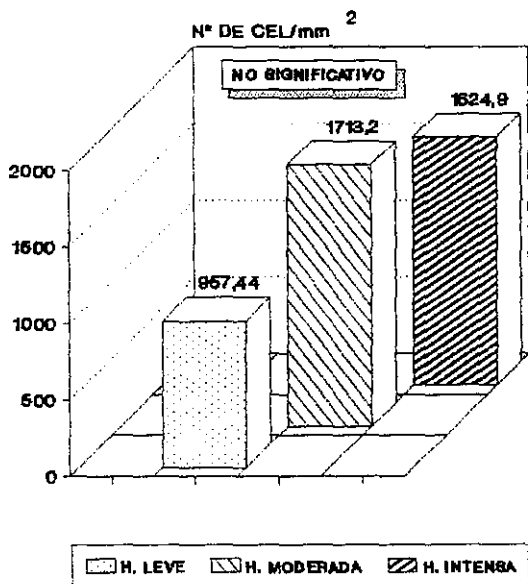
**CD16**

GRAFICA 22



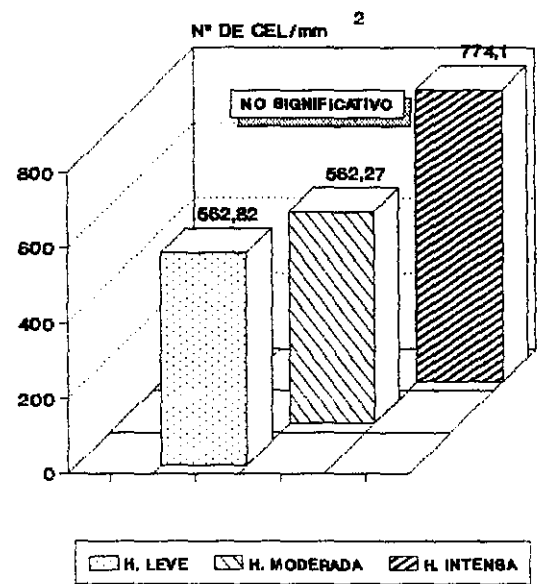
**CD57**

GRAFICA 22



**CD3**

GRAFICA 22

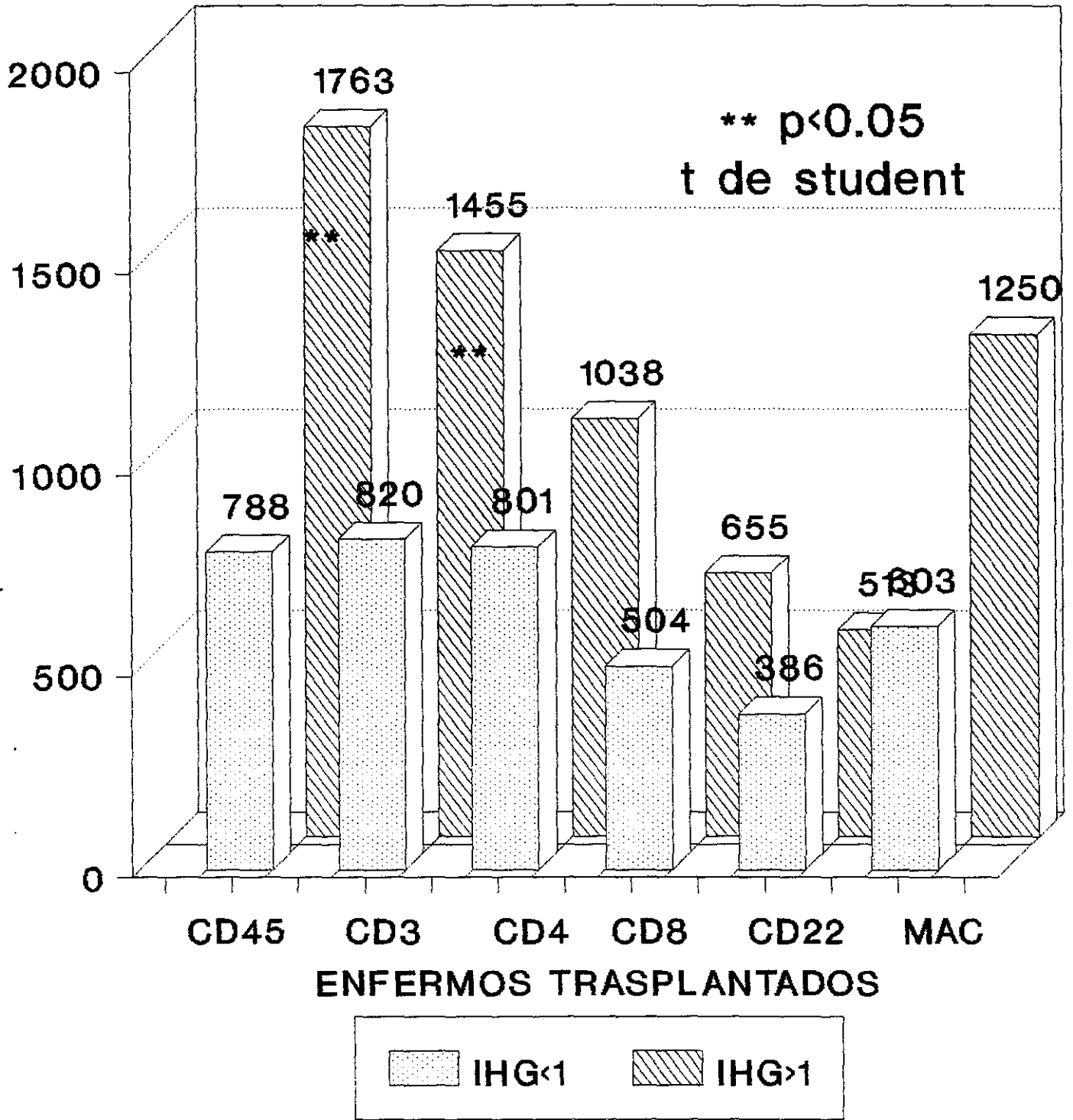


**CD8**

GRAFICA 22

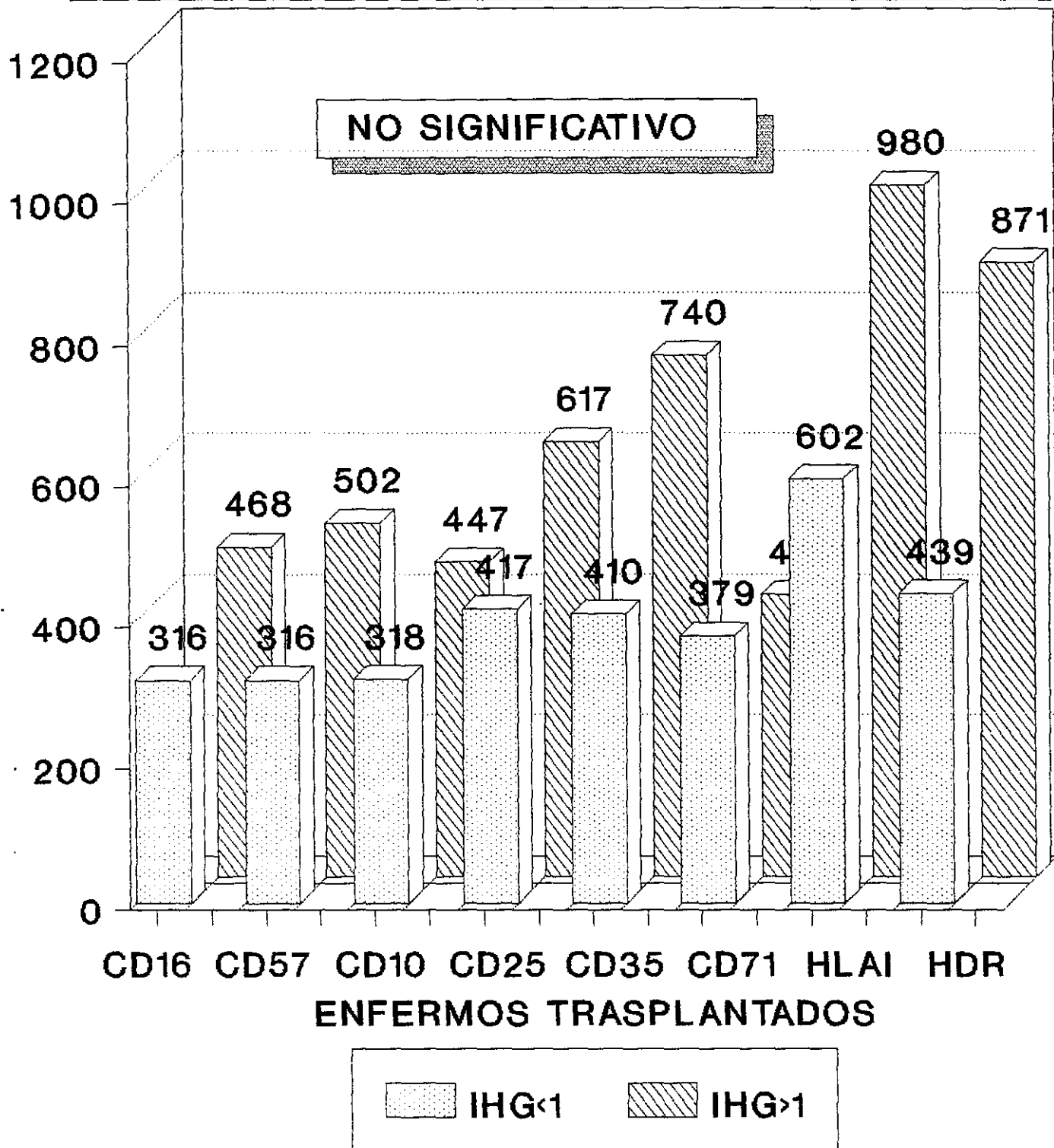
**CUANTIFICACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO GINGIVAL SEGUN IHG**

Nº DE CEL/mm<sup>2</sup>



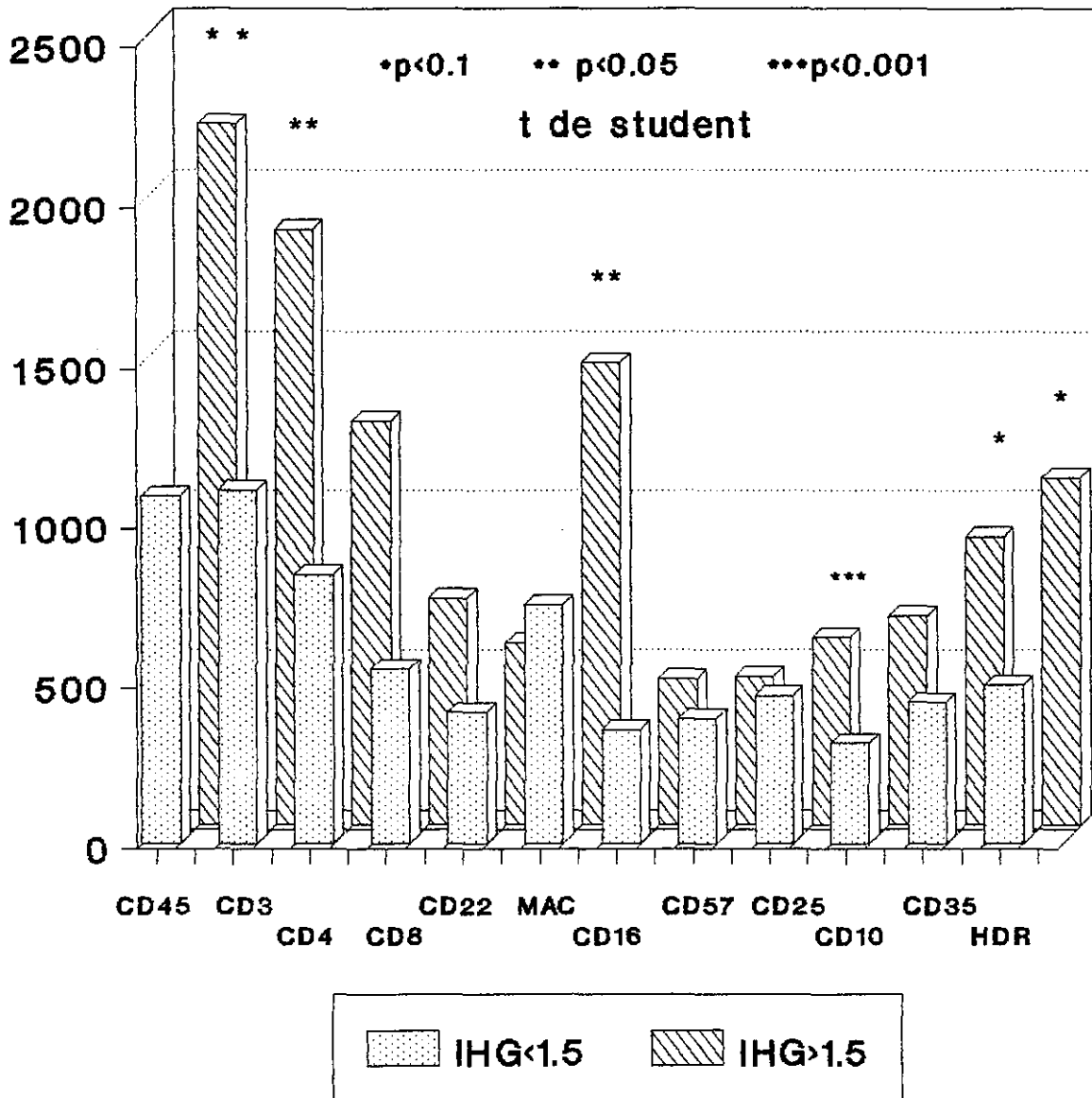
GRAFICA 23

# CUANTIFICACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO GINGIVAL SEGUN IHG



GRAFICA 24

## VALORACION COMPARATIVA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO SEGUN EL INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL MORFOMETRICA



INDICE DE HIPERPLASIA GINGIVAL

GRAFICA 25

## **Resultados**

Basandonos en el IHG hemos dividido la población estudiada en enfermos sin hiperplasia gingival o de grado leve (IHG<1) y enfermos con hiperplasia moderada e intensa (IHG>1). En este caso sólo el infiltrado CD4+ y CD68+ son estadísticamente significativos (GRAFICAS 23 y 24). Si la comparación se establece agrupando ausencia de hiperplasia, leve y moderada (IHG<1.5) frente a la hiperplasia severa (IHG>1.5) se mantienen las diferencias en cuanto al infiltrado CD45+ y CD68+ y además se observa diferencias en la expresión de CD10 (GRAFICA 25).

Como mencionamos previamente, el cociente CD4/CD8 entre el grupo de pacientes trasplantados y el grupo de sujetos sanos presentaban diferencias significativas con un cociente mayor para el grupo de enfermos ( $p<0.05$ , t de Student), sin embargo este cociente dentro del grupo que toman CsA no es estadísticamente significativo, como refleja la gráfica 26.

### **IV-7. ANALISIS DE LOS RESULTADOS DEL GRADO DE CORRELACION ENTRE LOS PARAMETROS ESTUDIADOS EN EL GRUPO DE ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES**

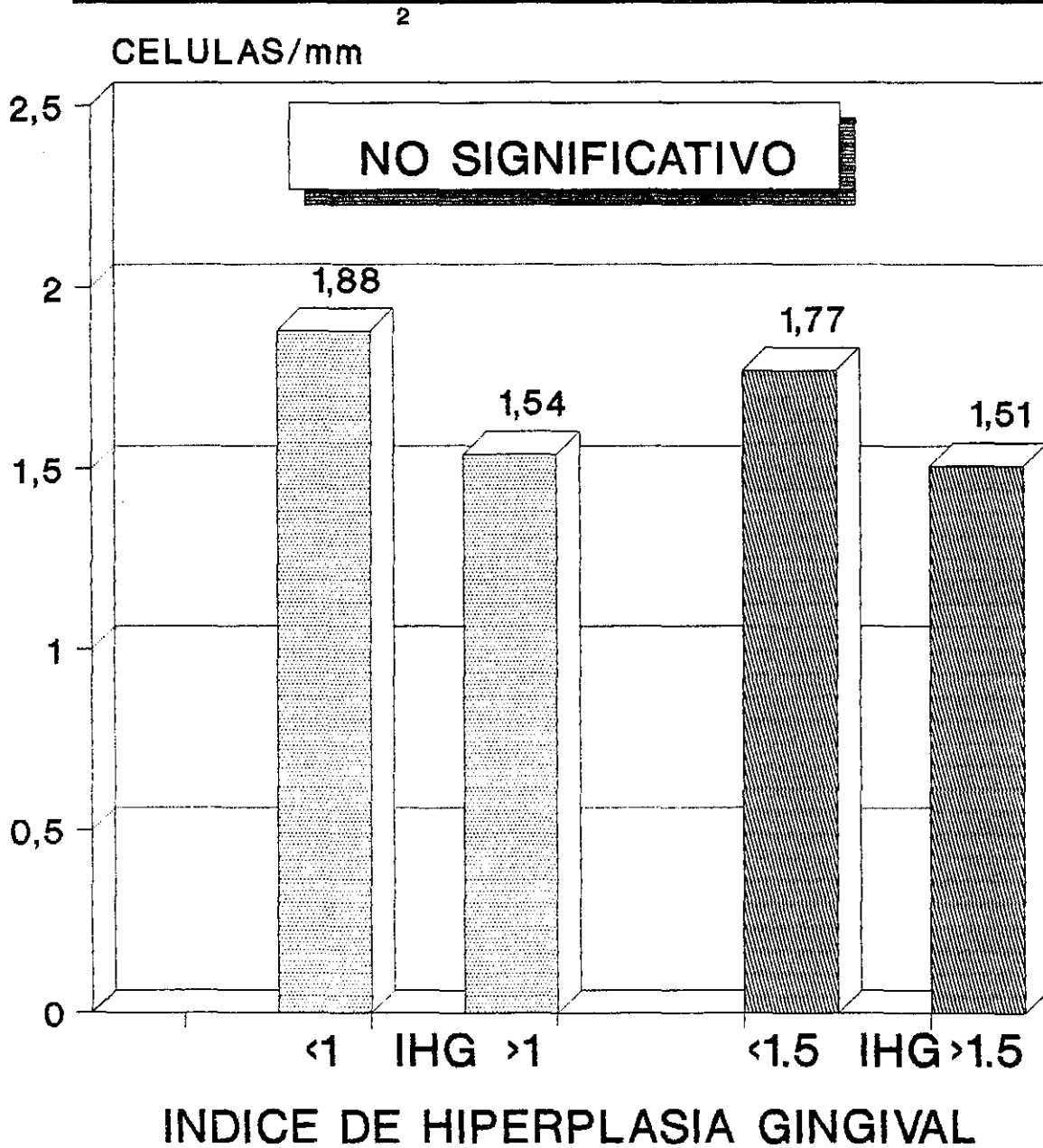
Las correlaciones simples de los distintos parámetros analizados dentro del grupo de enfermos trasplantados se especifican en las tablas VI, VII y VIII. En ellas se comparan entre sí los parámetros clínicos, morfométricos e inmunohistoquímicos. Destaca como el IHG es la determinación que encuentra mayor número de correlaciones estadísticamente significativas, en especial el grado de correlación con el depósito de CsA in situ ( $r$  de Pearson=0.88,  $p<0.05$ ) (TABLA VIII).

Al realizar un análisis de regresión para establecer la relación de la IHG y las variables clínicas, y las variables histológicas han resultado las siguientes ecuaciones:

Tomando IHG como variable independiente se verifica que ésta depende del índice de placa, del índice de sangrado y del tiempo transcurrido desde el trasplante del injerto:



**COMPARACION DEL COCIENTE CD4/CD8  
DEL GRUPO DE ENFERMOS SEGUN INDICE  
DE HIPERPLASIA GINGIVAL MORFOMETRICA**



GRAFICA 26

## **Resultados**

$$\text{IHG} = 0.69 + 0.01 \times \% \text{ placa} + 0.002 \times \% \text{ índice sangrado} \\ + 0.006 \times \text{tiempo transcurrido desde el trasplante.}$$

Pudiendo predecir el IHG en el 50.5 % de los casos con significación estadística.

Al establecer una nueva correlación, teniendo como variable independiente a la misma (IHG) y variables dependientes histológicas la cifra de MACROFAGOS, CD45, y dosis de CsA "in situ", obtenemos la mejor ecuación de regresión, que desarrollada es:

$$\text{IHG} = 0.009 \times \text{CsA "in situ"} + 0.0006 \times \text{CD45} - 0.001 \text{ MACROFAGOS} - 1.89$$

Según la cual, podríamos saber el índice morfométrico de hiperplasia gingival en el 92.5 % de los casos, conociendo: la dosis de CsA "in situ", la población de leucocitos totales del infiltrado inflamatorio y la de macrófagos en la biopsia gingival del paciente, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## V. DISCUSSION

## V. DISCUSION

### V-1. DISCUSION DE RESULTADOS EPIDEMIOLOGICOS Y CLINICOS DE LA SERIE GLOBAL

De nuestra serie de 30 pacientes con hiperplasia gingival secundaria a tratamiento inmunosupresor con CsA cabe destacar que corresponde en su totalidad a pacientes trasplantados renales y asimismo representa hasta el momento la serie más amplia de todas las descritas.

Como se comentó anteriormente, los pacientes proceden de dos áreas hospitalarias distintas con dos protocolos de inducción también distintos y donde la CsA se administra a diferentes dosis, concretamente en los primeros 15 días, 15 mg/kg peso/día en los pacientes trasplantados en Málaga y 8 mg/kg peso /día en los pacientes tratados en Granada. Podría pensarse que ello condicionaría diferentes grados de hiperplasia, sin embargo nuestros resultados no apoyan esta idea y además se demuestra que no existen diferencias significativas en la incidencia de hiperplasia entre los pacientes que siguen sendos protocolos. En este sentido, cuando se consideran series de pacientes trasplantados cardíacos y hepáticos con dosis de inducción y mantenimiento muy superiores (GOLDMAN et al. 1985), parece que la incidencia de hiperplasia gingival depende en gran medida tanto de la dosis de CsA administrada durante el período de inducción como de las dosis considerablemente mayores que requieren estos pacientes para su mantenimiento.

En cuanto a la incidencia de hiperplasia en nuestra serie de enfermos, que en el caso de los de Granada representan 1/5 del total de trasplantados renales en esta provincia del total de 100 trasplantes realizados hasta el cierre del presente estudio, fue del 87% (25 pacientes) los casos de agrandamientos con mayor o menor intensidad y del 13% (4 pacientes) los que no manifestaban este efecto secundario.

Esta incidencia tan alta ya ha sido comentada por algunos autores (WYSOCHY et al., 1983), (FRYSKOPP et al., 1986), sin embargo y debido a que la totalidad de los pacientes del área de Granada fueron informados de la posibilidad de revisión de su estado bucal por parte del Servicio de Periodoncia de la Facultad de Odontología, acudieron a la misma posiblemente los enfermos con mayor afectación gingival o más sensibilizados y por ende la incidencia puede verse artefactuada por este motivo.

El desarrollo de HG no guarda relación con el sexo ni con la edad de los enfermos, hecho que ha sido publicado previamente por diferentes autores Pasqualin y colaboradores consideran que es mayor la incidencia en niños (PASQUALIN y cols., 1990), nosotros no disponemos de casos pediátricos en nuestra serie para poder afirmar este hecho.

Con respecto a la llamativa diferencia con significación estadística entre las cifras de Creatinina de los pacientes trasplantados con los del grupo control, probablemente sea debido a diferentes factores patogénicos que se solapan entre sí: en primer lugar los pacientes trasplantados sufren crisis de rechazo, recidivas de glomerulonefritis e incluso nefrotoxicidad inducida por CsA que producen un deterioro creciente a mediano y largo plazo de su función renal (SCOTT & HIGENBOTTAM, 1988). El hecho de que la propia acción tóxica de la CsA pueda influir en un mayor deterioro de la función renal, está apoyado en el dato de que existe un mayor deterioro en los pacientes de nuestra serie que sufrian los mayores grados de hiperplasia gingival, de esta forma la fibrosis submucosa gingival que aparecería en los pacientes con agrandamiento, podría formar parte de un contexto general fibrogénico que afectaría al riñón (RUIZ et al., 1988), no existe en la literatura referencias concretas, debido a lo reducido de las series estudiadas, sobre la influencia del grado de hiperplasia sobre la función renal de los pacientes valorados.

En relación con la anomalía demostrada en las cifras de GOT y GPT como indicativo de necrosis hepatocitaria en el grupo de pacientes con afectación gingival debe mencionarse que no es valorable debido a que numerosos pacientes trasplantados padecen

mencionarse que no es valorable debido a que numerosos pacientes trasplantados padecen hepatopatías infecciosas fundamentalmente hepatitis B y por virus C.

Otra aportación importante de este trabajo ha sido la valoración realizada sobre los niveles séricos e intragingivales de CsA en un grupo restringido de pacientes así como la importancia que en nuestro trabajo tiene la determinación de la dosis acumulada de CsA en cada uno de los pacientes de Granada que desarrollaron hiperplasia gingival.

En relación con la CsA sérica, llama la atención que la media de este dato para la totalidad de los pacientes tratados se mantenía dentro de los rangos no tóxicos establecidos para este fármaco y que como luego se comentará, dicho valor no mostraba una distribución diferente para los distintos grados de hiperplasia ni tampoco relación con los infiltrados inflamatorios presentes en las muestras. Sin embargo el dato procedente de la dosis Acumulada de CsA ingerida por cada uno de los pacientes, sí que tuvo mucha mayor importancia.

De igual forma, la CsA intragingival valorada en 9 pacientes, se discutirá posteriormente dentro del apartado de discusión de resultados histopatológicos y de análisis global de resultados estadísticos.

En relación con los índices de salud oral entre los grupos de pacientes y controles, como cabría esperar, las diferencias entre ambos son muy notables con una significación estadística elevada, tanto para el índice de placa como para el de sangrado gingival; pese a ello, es de notar, los elevados valores que muestra para ambos parámetros el grupo de enfermos, demostrando la precaria salud oral que tienen estos individuos sometidos a tratamiento crónico con CsA como han constatado autores, que preconizan la necesidad de instaurar protocolos de higiene oral más exhaustivos en este grupo de población (DALEY & WYSOCHY, 1984), (GONZALEZ-JARANAY Y MESA, 1991), (SEYMOUR & SMITH, 1991).

BEEN et ENGEL establecieron los niveles de placa dentaria en un reducido número de enfermos trasplantados tratados con Azatioprina y en enfermos en diálisis, encontrando diferencias con significación estadística con referencia al grupo control, diferencias que se mantuvieron a lo largo de los 36 meses en los que se prolongó el estudio (BEEN & ENGEL, 1982), siempre en ausencia de sobrecrecimiento gingival o aumento de la profundidad del surco gingival.

Por el contrario, demuestran una drástica disminución de la inflamación periodontal, valorada mediante sondaje, en los pacientes inmunodeprimidos, aunque esta reducción no alcanza en ningún caso niveles normales.

En los pacientes en diálisis, la inflamación era leve a pesar del alto porcentaje de placa (BEEN & ENGEL, 1982). Por otro lado, el control de la placa dental reduce pero no evita el desarrollo de la hiperplasia gingival (SEYMOUR & SMITH, 1991).

## V-2 DISCUSION DE RESULTADOS DE MORFOMETRIA.

Una de las aportaciones del presente trabajo, creemos que ha sido, la extrapolación del análisis clínico convencional de la hiperplasia gingival valorada en tres grados, leve, moderada e intensa, hacia un modelo de análisis empleando nuevas tecnologías, como es el Análisis Digital de Imagen, que permiten por una parte una valoración objetiva del agrandamiento gingival y por otra un seguimiento a través de la obtención de imágenes periódicas de la progresión o regresión de la hiperplasia al comparar las diferentes imágenes. En este sentido la introducción de métodos basados en la aplicación de ordenadores y programas específicamente diseñados para ello, ha abierto nuevas expectativas en la valoración de las lesiones tanto macro como microscópicas presentes en los tejidos u órganos (GIARETTI et al., 1983), (FERRER- ROCA, 1986), (G<sup>o</sup> DEL MORAL y O'VALLE, 1992).

En nuestra serie de pacientes, hemos realizado tan sólo un estudio transversal en

un momento determinado de la hiperplasia gingival, sin que se halla planteado como objetivo de este trabajo el hacer un seguimiento en el tiempo de la progresión o regresión de la misma.

El método diseñado por nosotros para valorar el crecimiento gingival, es a parte de original, fácil de realizar, pues sólo necesita una fotografía digitalizada, superando a la clásica valoración clínica e incluso a la aportada por un grupo español de cuantificar la hiperplasia mediante la obtención de modelos de escayola (MACHUCA y cols., 1991), si bien adolece el nuestro, de la cuantificación tridimensional que este último aporta.

En el mismo sentido, el método empleado en esta tesis, facilita el estudio evolutivo de las modificaciones de la encía de los pacientes , desde la fase de espera para el trasplante, en los días postrasplante y posteriormente, en sucesivos controles con el fin de demostrar y cuantificar los mínimos cambios que pudieran presentarse.

En relación con el IHG, que describimos en el método, establece una relación entre el grado de encía hiperplásica y el área dental descubierta, que actúa como factor de corrección sobre los posibles desequilibrios que pudieran observarse entre pacientes que poseen un mayor o menor tamaño de estructuras orales y corrige también las variaciones en el procesado técnico de la fotografía.

De igual forma, el estudio interactivo del área papilar tiene un doble motivo, por una parte, por ser la zona gingival responsable de la mayor parte de las hiperplasias gingivales leves y por otra, el valorar de forma comparativa el crecimiento entre la papila interdientaria y el resto de la encía (insertada y libre).

A cerca del posible defecto que nuestro índice pudiera mostrar ya que sólo valora el sector anterior, cuando la hiperplasia afecta de forma irregular a la totalidad de la boca, merece la pena destacar que tal y como está recogido en la literatura, es en la arcada anterior donde se



inicia la hiperplasia en la mayoría de los casos (SEIBEL et al. 1989), (PASQUALIN y cols. 1990), (ROSTOCK et al. 1985), (BARTHOLD, 1987).

El proceso de Análisis de Imagen, aunque nosotros lo hemos realizado de forma interactiva, no excluye la posibilidad de que en condiciones idóneas fuese posible confeccionar un método automático para la cuantificación del IHG en el cual el proceso interactivo quede restringido a la función de umbralización y segmentación de la imagen por niveles de gris, sin necesidad de manipular directamente la imagen desde el monitor del ordenador.

De hecho la introducción de métodos de Análisis de Imagen en Odontología está cobrando un gran auge y existen ya algunas referencias en cuanto a su utilización en implantología.

En cuanto a los resultados concretos de nuestra serie, hemos definido tres rangos de valores diferentes del IHG procurando que tuvieran cierto grado de correspondencia con los tres grados clínicos descritos por Pasqualin y Pernu (PERNU et al., 1992).

A pesar de ser un número reducido de casos para poder extrapolar los resultados, hemos podido definir un valor medio para cada grado de hiperplasia ( $0.92 \pm 0.14$  HG leve;  $1.14$  HG moderada y  $2.29 \pm 0.87$  HG intensa) al igual que el IHG en sujetos normales ( $0.78 \pm 0.102$ ). Consideramos no obstante que el número de sujetos evaluados debe ser sensiblemente mayor para conocer los valores medios reales. El hecho de encontrarse tan próximos algunos valores hace que clínicamente sea difícil establecer correctamente el grado de agrandamiento, que con esta metodología quedaría obviado.

Al ser un análisis transversal, no poseemos valores de referencia anteriores y posteriores de los mismos pacientes, nos hemos limitado a comparar el grado de hiperplasia gingival con parámetros clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos estudiados.

Como podemos comprobar en la gráfica nº 4, existe una distribución relativamente equivalente entre los tres grados de hiperplasia con una mayor incidencia de las formas leves sobre las moderadas e intensas, hecho que concuerda con lo recogido en la literatura; sin embargo llama la atención el escaso número de pacientes sin hiperplasia recogido en nuestra serie, debido como hemos dicho anteriormente, al sesgo que supone el que nuestra lista de pacientes no está recogida al azar de la totalidad de enfermos trasplantados, sino que corresponde a aquellos que por motivos funcionales o estéticos acudieron a la consulta de Periodoncia, probablemente si la serie se extendiera a la totalidad de trasplantados el número de pacientes sin hiperplasia aumentaría notablemente. En este sentido, la serie de 892 enfermos trasplantados renales, cardíacos y hepáticos recopilados por los Laboratorios Sandoz, comunica una incidencia de hiperplasia gingival del 3.49% (SANDOZ LABORATORIES, 1983).

Con respecto a la relación entre parámetros clínicos, cabe mencionar el trabajo de SEYMUR et al., que compara dos series de pacientes inmunosuprimidos con Azatioprina y CsA, en un estudio longitudinal, donde se demuestra que no existen diferencias significativas en los índices de salud oral en una serie con respecto a la otra, mientras que sí existen, cuando se valora el grado de hiperplasia; como se comprobará después en la discusión de los resultados histopatológicos este hecho probablemente es debido a que en todos los pacientes inmunodeprimidos existe un notable grado de inflamación gingival presumiblemente derivada de la presencia de factores locales infecciosos (BEEN et ENGEL, 1981).

En nuestra serie, es de notar que los mayores grados de hiperplasia corresponden también con los individuos con peores índices de salud oral; cuando se procede al análisis comparativo de dichos parámetros de salud oral con el IHG, se comprueba con el coeficiente de correlación de Pearson, la relación entre el índice de placa y de sangrado gingival con nuestro IHG, pero sólo se cumple en los rangos superiores del índice ( $IHG > 1.5$ ), de forma que en los pacientes con hiperplasia leve no existe esta relación.

Esta aparente discordancia entre los grados de hiperplasia gingival morfométrica y los índices de salud oral en los pacientes tratados con CsA, también ha sido descrito por SEYMUR, SMITH y ROGERS en su estudio longitudinal, arguyen que esta diferencia en sensibilidad es debida a que los índices gingivales son unos métodos subjetivos para valorar la inflamación gingival (SEYMOUR et al., 1987); además este autor al igual que nosotros, encuentra una notable diferencia entre la valoración de la hiperplasia utilizando un modelo morfológico, en su caso estudio en modelos plásticos tridimensionales obtenidos de crecimientos gingivales provocados por la difenilhidantoina, publicado en 1985, y en el nuestro un modelo de análisis digital, con los parámetros de salud oral, hecho que estos autores discuten, ser motivado por la discrepancia observada en la sensibilidad entre los dos métodos, el índice gingival, pese a todo es un método subjetivo para asegurar la inflamación de la encía (no informa sobre el grado de inflamación), en tanto que el método de análisis de imagen, usado por nosotros como el propuesto por ellos, es totalmente objetivo con respecto a la cuantificación exacta, por eso la valoración por estos métodos es mucho más fiable y precisa que la simple valoración clínica donde evidentemente al distribuir a los pacientes en tres grupos suele cumplirse que los pacientes con menores grados de hiperplasia suelen mantener mejor salud oral que los restantes.

### V-3. DISCUSION SOBRE LOS EFECTOS DE LA MEDICACION INMUNOSUPRESORA EN LA INFLAMACION PERIODONTAL

La administración de altas dosis de fármacos inmunosupresores como Azatioprina y Prednisona reducen drásticamente la inflamación gingival (SCHULLER et al., 1983).

### V-4. DISCUSION SOBRE EL FENOTIPO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO EN LA HIPERPLASIA GINGIVAL SECUNDARIA A CICLOSPORINA A.

Todas las biopsias estudiadas se obtuvieron mediante escisión quirúrgica de una mínima parte de la papila interdientaria que no supuso ningún riesgo para el enfermo ni ocasionó

complicación alguna; permitiendo la obtención, en la mayoría de los casos, de un material suficiente para realizar los estudios histopatológicos, ultraestructurales e inmunohistoquímicos comentados en el correspondiente apartado de material y métodos.

El empleo de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales permite catalogar los diferentes infiltrados celulares presentes en las muestras de tejido y en nuestro estudio para determinar el infiltrado existente en mucosa gingival, reconociendo y deslindando los diversos subtipos de linfocitos y monocitos, que pueden ayudar a comprender los mecanismos de respuesta inmunitarios y las modificaciones secundarias a la administración de fármacos inmunosupresores e igualmente, conocer la respuesta inflamatoria inespecífica manifiesta en la enfermedad periodontal. (SCHULLER et al., 1973). Un tercer argumento importante es el hecho de poder establecer diferencias entre HG de distinta etiología en base al diferente tipo de infiltrado inflamatorio, habida cuenta de la similitud tanto clínica como histopatológica que manifiestan estas patologías.

La posibilidad de cuantificar los subtipos celulares y la expresión de receptores de membrana reduce, al menos en parte, la subjetividad del observador y permite objetivar mejor los resultados. Esta sistemática se viene aplicando a otros estudios biópsicos como es la valoración de los infiltrados inflamatorios presentes en el parénquima renal de los injertos, para la evaluación en las crisis de rechazo (GARCIA DEL MORAL y col., 1991a, 1991b).

Son escasas las reseñas bibliográficas sobre la valoración mediante anticuerpos monoclonales del infiltrado inflamatorio de la mucosa gingival, en enfermos sometidos a tratamiento crónico con CsA y las existentes se limitan a la descripción cualitativa del infiltrado presente sólo y exclusivamente a nivel epitelial, no prestando atención al infiltrado presente en el corion mucoso (BARTHOL, 1987), (SAVAGE et al., 1987), (FRISKOPP et al., 1986). De igual forma, los estudios se centran sobre un reducido número de casos.

Por otro lado el panel de anticuerpos evaluado en los anteriores estudios no

demuestra, todos los subtipos de células linfo-monocitarias presentes en las biopsias, centrandose su estudio en la demostración de la presencia de células dendríticas o de Langerhans que marcan con el Leu6 y estableciendo la proporción de linfocitos T y expresión de HLA clase I y II (DP, DQ) presentes a nivel de la capa basal y en el corion de las biopsias gingivales (NIIMI et al., 1990).

Del análisis comparativo de nuestros resultados inmunohistoquímicos referentes a las subpoblaciones leucocitarias infiltrantes en el corion mucoso de los pacientes con hiperplasia gingival frente a los controles, demuestra notables diferencias entre las poblaciones de los pacientes con agrandamiento gingival fundamentalmente relativas a las células CD45, CD3, CD4 y CD8, es decir la población leucocitaria total y la población de células T globales incluyendo las subpoblaciones de células cooperadoras o Helper y supresoras, asimismo existe una notable diferencia en la subpoblación de macrófagos infiltrantes en el corion mucoso.

No ocurre sin embargo este hecho diferenciador tan notable, en el caso de los linfocitos B totales, las células K, y las células NK.

De forma muy llamativa en nuestro estudio, las poblaciones en las que existen mayores diferencias son las que teóricamente son controladas por la CsA (BOREL, 1976, 1977). Los pacientes que desarrollan hiperplasia gingival tienen un nivel bajo de inmunosupresión a nivel gingival, con un infiltrado inflamatorio que parece no estar sometido, o que se escapa, a la inmunosupresión.

La experiencia en trasplantes renales, es que cuando un individuo está bien inmunosuprimido, los infiltrados inflamatorios son más por macrófagos que por células T, de hecho el rechazo renal en individuos trasplantados bien inmunosuprimidos es por macrófagos, estando las células CD4, CD8 y CD3 muy bajas o casi inexistentes, y esto no es lo que ocurre en estos sujetos que además de macrófagos tienen CD4, CD3 y CD8 que son las que controlaría la CsA y que aquí, a nivel gingival por las razones que sean no están siendo controladas.

En nuestra serie de casos, no fue posible realizar la determinación sérica ni intralesional del auténtico mediador controlado por la CsA, que es la interleuquina 2.

Del trabajo de Niimi et al., que es el único donde se comenta un estudio semicuantitativo de subpoblaciones leucocitarias, se deduce que la expresión de leu4 (CD3) es menor en la HG inducida por CsA que en los controles, hecho que se encuentra en total contradicción con nuestros resultados. Interpretamos que puede ser debido a que el estudio se refiere a un sólo caso y que la valoración fue realizada cualitativamente. Nosotros hemos evaluado 27 casos y contabilizado el número de células mononucleadas en la submucosa gingival por mm<sup>2</sup> de superficie, se demuestra significación estadística, no sólo al comparar con los sujetos control, sino también con los enfermos tratados con CsA que no han desarrollado HG. En este sentido es manifiesta la correlación existente entre el índice de hiperplasia gingival y la expresión del antígeno leucocitario común (CD45) ( $r=0.53$ ), que indica la presencia de más infiltrado inflamatorio en los casos de mayor grado de hiperplasia.

Por otra parte, Friskopp y colaboradores han estudiado el infiltrado linfoide y monocitario en biopsias gingivales de cinco pacientes utilizando un reducidísimo panel de AcMo, aunque demuestran que el infiltrado se encuentra constituido principalmente por linfocitos T y monocitos-macrófagos siendo mínima la presencia de linfocitos B, en contraste con los sujetos sanos que tienen escaso infiltrado mononuclear básicamente constituido por linfocitos T (FRISKOPP et al., 1986). Estos datos sí concuerdan con los obtenidos por nosotros, si bien la manera más perfecta de cuantificarlos en nuestro estudio supone variación en el cómputo final de resultados.

Para concluir con el estudio convencional de subpoblaciones leucocitarias convencionales, la hipótesis más plausible que explica nuestros resultados es que debido a que la inflamación local clínicamente manifiesta en forma de gingivitis en estos pacientes, influiría en el desarrollo de una respuesta inmunitaria normal en un paciente con una tolerancia inmunológica al

injerto renal, a favor de esto aboga, el hecho de que la tasa de crisis de rechazo renal en nuestros pacientes es notablemente baja.

Los pacientes con mayor grado de hiperplasia gingival y por lo tanto con mayores grados de inflamación, realmente tienen descontrolado el brazo inmune que comienza en macrófagos que segregan IL-1 que recluta CD4 (que están activados en estos pacientes aún tomando CsA) y estas segregarían mediadores que probablemente estarían en la base de la hiperplasia (CD4 segregaría factores de crecimiento epitelial, factores fibrogénicos entre ellos gammainterferon y otros factores).

#### V-5. DISCUSION SOBRE EL MECANISMO DE INDUCCION DE HIPERPLASIA GINGIVAL SECUNDARIA A FARMACOS.

En términos generales se ha implicado en la patogénesis de la hiperplasia gingival secundaria a fármacos (HGSF), una serie de factores que con mayor o menor peso específico, ha demostrado cierta relación con la misma. Entre ellos se encuentra: La inflamación motivada por la placa bacteriana; el incremento de glicosaminoglicanos sulfatados; defectos en la inmunidad local; fenotipos diferentes en los fibroblastos gingivales; factores de crecimiento; la farmacocinética y la capacidad de unión de la droga a los tejidos; actividad colagenasa; alteración del flujos de la bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en los fibroblastos; déficit de ácido fólico y por último la combinación de varias de estas hipótesis individuales (BROWN et al., 1991).

El componente inflamatorio bacteriano es necesario para la expresión de este efecto colateral. Diferentes estudios han demostrado que la profilaxis y la buena higiene dental pueden reducir o prevenir la HGSF. O'Neil & Figures han probado la eficacia de la clorhexidina como agente con acción antiplaca en el tratamiento de la HG por difenilhidantoina (O'NEIL & FIGURES, 1982), igualmente Svirsky y colaboradores, han logrado la detención de la HG secundaria a CsA (SVIRSKY et al., 1990). Daley y colaboradores han evidenciado que los sujetos con excelente

higiene dental presentan, en el peor de los casos, ligera HG pero sin manifestaciones clínicas evidentes (DALEY et al., 1984).

Por otro lado, Seymour & Smith Han constatado el beneficio que supone el control de la placa bacteriana y de los irritantes locales, si bien, reconocen que no son los únicos factores que intervienen en la HG. En su estudio prospectivo sobre 27 enfermos, separado en dos grupos randomizados, uno de los cuales fue sometido a un exhaustivo programa de control de higiene dental que incluía instrucciones sobre el cepillado, uso de seda dental, raspado y alisado con cobertura antibiótica, permite mantener los índices gingival y de placa semejantes a los presentados en condiciones basales, mientras que sin estas medidas higiénicas, los sujetos sometidos a tratamiento con CsA, tras un periodo de 6 meses, incrementan dichos índices de forma significativa (SEYMOUR & SMITH, 1991).

En nuestra serie, donde no se han tomado medidas higiénicas bucales previas, hemos constatado correlación estadísticamente significativa entre el grado de hiperplasia gingival y los índices de placa y sangrado ( $r=0.466$  y  $r=0.500$  respectivamente). En este sentido, se trata de dos índices que demuestran también correlación estadística entre sí ( $r=0.707$ ).

De igual forma a favor de esta hipótesis, nuestros datos manifiestan que en general los sujetos inmunosuprimidos tienen unos índices orales por encima de la normalidad y que los pacientes que tienen más de 60% de índice de placa y de sangrado muestran mayor grado de hiperplasia gingival, constatando con ello la relación que guarda con éstos últimos.

A pesar de que se ha argüido contra el sistema de medición de placa de Silness & Løe (1964), que se trata de un método puramente cuantitativo, que no tiene en cuenta la microflora ni patogenicidad de la placa y que no valora la placa subgingival ni la capacidad de producir alteraciones gingivales (SEYMOUR & SMITH, 1991); en nuestra experiencia y siempre que no se encuentre sesgada por cepillado previo a la determinación, es un índice necesario determinar,



proceder al seguimiento e intentar controlar en los enfermos tratados con CsA.

Este hecho es extensivo para HG secundaria a otros fármacos como la difenilhidantoina, donde el control de la placa dental evita la producción de HG (MODEER & ANDERSON, 1986).

La relación placa dental e inflamación también ha sido claramente establecida (McGRAW et al., 1987). Nuestros resultados indican que el infiltrado inflamatorio (CD45) guarda relación con el índice placa y de sangrado.

El papel que juega la farmacocinética de la CsA y su capacidad para unirse o depositarse en tejidos u otras estructuras debe ser tenido en cuenta. En este sentido, McGraw y colaboradores han confirmado los resultados obtenidos por Conrad y cols. para la difenilhidantoina, que demostraron una relación directa entre los niveles de excreción de CsA por la saliva y el desarrollo de HG; igualmente, no hallaron relación entre la severidad de la HG y los niveles de CsA en suero (McGRAW et al., 1987), (CONRAD et al., 1974). A este respecto, en nuestro protocolo no hemos recogido la determinación de CsA en secreción salivar, sí en plasma donde encontramos resultados superponibles, corroborando la falta de relación entre el grado de HG y los niveles sérico de CsA.

Fujano y cols. han sugerido que para semejante grado de higiene oral la severidad de la HG, en pacientes trasplantados, se encuentra relacionada con los niveles de CsA en sangre (doc 33 de 33).

No se debe olvidar que la placa dentaria es un posible reservorio local de CsA cuando se administra por vía oral (buscar el trabajo para ampliar el comentario).

En este sentido, hemos determinado por primera vez el depósito de CsA en el corión

mucoso gingival mediante técnicas inmunohistoquímicas, demostrando un alto grado de correlación entre este depósito y el desarrollo de hiperplasia gingival ( $r=0.88$ ). Estos datos permiten especular sobre el papel que juega el factor local de acumulación de CsA que puede ser diferente para cada enfermo y que no guarda relación con los niveles séricos. En relación con el acúmulo de CsA in situ, Seymour y colaboradores han estudiado el depósito de CsA sobre la Placa dentaria verificando la relación que dicho depósito local tiene con la aparición de HG.

## VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

- 1.- El grado clínico de hiperplasia gingival inducida por CsA, guarda relación con los índices de higiene oral (de placa y gingival).
- 2.- Se aporta un nuevo índice, el de hiperplasia gingival por CsA, que permitirá predecir con gran exactitud y a través de una simple fotografía, el grado lesional del periodonto de protección en cuanto al incremento en su tamaño.
- 3.- Las características fenotípicas de las células intersticiales inflamatorias en las muestras de las biopsias obtenidas de la encía hiperplásica, tienen una gran similitud con las poblaciones existentes en la enfermedad periodontal no iatrogénica.
- 4.a.- El incremento del espesor del epitelio de revestimiento en la hiperplasia gingival se produce más por un mecanismo expansivo que proliferativo, hecho que consideramos está en relación con la localización intraepitelial de la CsA.
- 4.b.- Los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales apoyan la hipótesis de que, en gran parte la reacción fibrosa en la hiperplasia gingival por CsA se originaría por la acción indirecta de la CsA.
- 5.- El estudio estadístico aplicado en el que se correlacionan datos clínicos, analíticos, morfológicos y morfométricos permiten concluir que: El índice de hiperplasia gingival que hemos desarrollado se relaciona directamente con la CsA intralesional y las poblaciones celulares CD45 y macrófagos, lo que sugiere una participación importante de la inmunidad inespecífica.

- 6.- El que existan pacientes tomando CsA durante largo tiempo sin desarrollar HG es muy posible que este relacionado con la diferente sensibilidad de las diversas subpoblaciones fibroblásticas. Por tanto consideramos que para que se induzca HG, los pacientes deberán poseer el determinante antigénico de la susceptibilidad del periodonto a la CsA. En este sentido es posible, que dicha susceptibilidad pueda estar vinculada al fracaso de los mecanismos detoxicantes generales de la CsA.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ABBOT LB. & PIPPENGER CE.: Cyclosporine: Its clinical utility, methods of analysis, and TDM. *Diag Med.* 1985; 8: 36-42.
- ABMAYR W., MANNWEILER E., OESTERLE D., DEML E.: Segmentation of scenes in tissue sections. *Anal Quant Cytol.* 1987; 9: 190-196.
- ACEVEDO A.: Grupos de diferenciación de leucocitos humanos (CD). *Patología* 1988; 21: 234-242.
- ADAMS D. & DAVIES G.: Gingival hyperplasia associated with cyclosporin A. *BR.Dent.J.* 1984; 157: 89-91.
- ADAMS R.D. & VICTOR M.: Epilepsia y estados convulsivos. "Principios de Neurologia ". Reverte Barcelona. 1981; 234-251.
- ADDY V., MCELNAY J.C., EYRE D.G., CAMPBELL N., D'ARCY P.Y.: Risk Factors in Phenytoin induced Gingival Hyperplasia. *J. Periodontol.* 1982; 54: 373-377.
- ALSINA J.: Empleo de la CsA en el trasplante renal. Experiencia 1984-1987 del Hospital de Bellvitge. *Nefrología.* 1988; vol.III, supl.I.
- ALLAN B.F., TILLMAN J.E., THOMSON T.J., CROSSLING F.T., GILBERT L.M.: Effective intravenous cyclosporin therapy in a patient with severe Chron's disease on parenteral nutrition. *GUT.* 1987; 28: 1166-1169.
- ALLER M.A: Efecto del verapamilo sobre la toxicidad hepatorenal inducida por CsA. *Arch. Esp. de Urol.* 1989; 42: 847- 850.
- ANDERSON A., BORG H., HALLBERG A., HELLERSTROM C., SANDLER S., SCHNELL A.: Long-Term Effects of CsA on Cultured Mouse Pancreatic Islets. *Diabetología.* 1984; 27: 66-69.
- ANGELOPOULOS A.: Diphenilhydantoin gingival hiperplasia: a clinicopathological review. I. Incidence, clinical features and histopathology. *J. Can.Dent. Assoc.* 1975; 41: 103.
- ANONIMO. Antagonistas del Calcio. *Malaltia Cardiovascular. Bull Ter Vall d'Hebron.* 1986; 2(4): 1-5.
- ATKINSON K., BRITTON K., PAULL P. et al.: Detrimental effect of intestinal disease on absorption of orally administered cyclosporine. *Transplant Proc.* 1983; Vol XV, No 4: 2446-2449.
- AUSTYN J.M. & STEINMAM M.: The passenger leukocyte. A fresh look. *Transplant Rev.* 1988; 2: 139-176.

- AZOGUI O., GLUCKMAN E., FRADELIZI D.: Inhibition of IL-2 production after human allogenic marrow transplantation. *J Immunol.* 1983; 131: 1205-1208.
- BABCOCK J.R.: Incidence of Gingival Hyperplasia Associated with Dilantin Therapy in a Hospital Population. *J.A.D.A.* 1965; 71: 1447- 1470.
- BACUS J.W. & GRACE L.J.: Optical microscope system for standardized cell measurements and analysis. *Appl Optics.* 1987; 26: 3280-3293.
- BANFI G., IMBASCIATI E., FOGAZZI G.B, TARANTINO A.:Renal Lesions in Cyclosporin A Treated Kidney Transplant Patients. *Appl. Pathol.* 1987; 5: 95-100.
- BARAK S., ENGELBERG I.S., HISS J.: Gingival Hiperplasia caused by nifedipine. Hystopathologic findings. *J.Periodontol.* 1986; 58: 639-642.
- BARTOLD P.M.: Cyclosporin and gingival overgrowth. *J.Oral Pathol.* 1987; 16: 463-468.
- BASCONES A.: Periodoncia. ED. Antibioticos S.A. 1985.
- BATLLE D.C.: Effect of CsA on renal function and kidney growth in the uninephrectomized rat. *Kidney Int.* 1990; 37: 21-28.
- BENCINI P., CROSTI C., MONTAGNINO G. e col.: Iperplasia gengivale da CsA. *Mondo Odontostomatologico.* 1985; 4: 23-27.
- BENNETT W.M. & NORMAN D.J.: Action and toxicity of cyclosporine. *Ann Rev Med.* 1986; 37: 215-224.*Ann. Rev. Med.* 1986; 37: 215-224.
- BENNETT J.A. & CHRISTIAN J.M.: CsA induced gingival hyperplasia: case report and literature review. *J. Am. Dent. Assoc.* 1985; 11: 272- 273.
- BERGSTAND A., FARNSWORTH A., GOKEL J.M., KRAUSE P.H., LANG W., HIHATSCH M.J.: Renal histopathology in kidney transplant recipients immunospressed with CsA: results of an international workshop. *Cl. Nephro.* 1985; 24: 107-119.
- BERNABEU M.: Monitorización de ciclosporina. Implicaciones clínicas y farmacológicas. *Nefrología.* 1990; 10: 25-31.
- BERNARD A., BOUMSELL L., DAUSSET L., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F.: *Leucocyte typing I.*, Springer-Verlag, Berlin, 1984.



BEVERIDGE T.: Cyclosporine A: An evaluation of Clinical results. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 433-437.

BEVERIDGE T., GRATWOHL A., MICHOT F. et al.: Cyclosporin A: Pharmacokinetics after a single dose in man and serum levels after multiple dosing in recipients of allogenic bone marrow grafts. *Curr. Ther. Res.* 1981; 30: 5-17.

BONDESSON L. & HAMMAR H.: Treatment of pemphigus vulgaris with CsA. *Dermatologica.* 1990; 181(4): 308-310.

BOREL J.F., FEURER C., GUBLER H.U. et al.: Biological effects of CsA: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976 6:468.

BOREL J.F., FEURER C., MAGNEE C. et al.: Effects of the new anti- lymphocytic peptide CsA animals. *Immunology.* 1977; 32: 1017.

BOREL J.F.: Basic science summary. In: Schindler R. *Cyclosporine: Nature of the agent end its Immunologic Actions.* Ed. Grune & Stratton. New York. 1988: p. 722-730.

BOREL J.F.: Cyclosporine: historical perspectives. *Transplant Proc.* 1983; 15: 3-13.

BOREL J.F. & RYFFEL B.: The mechanism of action of cyclosporine: a continuing puzzle. In: Schindler R. *Cyclosporine in Autoimmune Diseases.* Ed. Springer Verlag. New York. 1985: p. 25-32.

BOURBIGOT B., GUISERIX J., AIRIAU J. et al.: Nicardipine increases cyclosporine blood levels. *Lancet.* (letter). 1986; 1: 1447.

BOWERS L.D & CANAFAX D.M.: Cyclosporine: Experience with therapeutic monitoring. *Ther. Drug. Monit.* 1984; 6: 142-147.

BOWMAN J., LEVY B., & GRUBB R.: Gingival overgrowth induced by diltiazem. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* 1988; 65: 183-185.

BREITMAN T.R., COLLINS S.J., KEENE B.R.: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cell in primary culture in response to retinoic acid. *Blood.* 1981; 57: 1000-1004.

BRITTON S. & PALACIOS R.: CsA : Usefullnes, Risk and Mecanismos of action. *Inmunol. Rev.* 1982; 65: 5-22.

BROWN Z., NEILD G.H., LEWIS G.P.: Inhibition of prostacyclin formation by CsA is not due to reduced availability of arachidonic acid in membrane phospholipids of cultured human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*. 1990; 39: 1136-1138.

BRUCE M., HALL M., DAVID D. et al.: Comparison of three immunosuppressive regimens in cadaver renal transplantation: long-term CsA, short-term CsA followed by Azathioprine and prednisolone, and azathioprine, and prednisolone without cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 1499-1507.

BRYON J., KARDACHI R., NEWCOMB G.: A clinical study of gingival inflammation in renal transplant recipients taking immunosuppressive drugs. *J. Periodontol.* 1978; 6: 307-309.

BURCKART GJ.: Excretion of cyclosporine and its metabolites in human bile. *Transplant. Proc.* 1986; 18, Suppl. 5: 46-49.

BURCKART G.J., VENKATARAMANAN R., PTACHCINSKI R.J. et al.: Cyclosporine absorption following orthotopic liver transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1986; 26: 647-651.

BURCKLE W.S.: Cyclosporine pharmacokinetics and blood level monitoring. *Drug Intell Clin Pharm.* 1985; 19: 101-109.

BUSTOS DE ABAJO M.: Subpoblaciones leucocitarias y valoración del depósito intrarrenal de CsA en la biopsia renal post-trasplante: Análisis clinicopatológico e inmunohistoquímico de 78 casos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 1992.

BUTLER R.T., KALKWARF K.L., KALDAHL W.B.: Drug induced gingival hiperplasia: Phenytoin, Cyclosporin and Nifedipine. *J.A.D.A.* 1987; 144: 56-60.

CALNE D.B.: Epilepsia. *Terapéutica en Neurología*. Salvat.Barcelona. 1979; pag. 171-196.

CALNE R.Y., WHITE D.J.G., THIRU S. et al.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet.* 1978; 2: 1323-1327.

CALNE R., ROLLES K., WHITE D.J. et al.: Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 36 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. *Lancet.* 1979; 2: 1933

CALLIS L., GARCIA L., LORIS C. y cols.: CsA en el tratamiento de las glomerulopatías del niño. Encuesta multicentro. *Nefrología*. 1990; 10(5): 61-66.

CANVIN J.M., DALAL B.I., BARAGAR F., JOHNSTON J.B.: CsA for the treatment of granulocytopenia in Felty's syndrome. AM. J. HEMATOL. 1991; 36: 219-220.

CARDESI E., TURCO G., SACCO M. e col.: Aspecti istopatologici della iperplasia gengivale da ciclosporina. Minerva Stomatol. 1989; 38: 709-712,

CARRANZA F.A. & CARRARO J.J.: Otras enfermedades gingivales en Periodoncia. Buenos Aires. Ed. Mundi S.A.I.C. y F. 1978. pag 325- 339.

CARRANZA F.A. & PERRY D.A.: Manual de Periodontologia Clínica, Ed. Interamericana. 1988; pags. 32-38.

CARREL R., FA T.T., CHAPMAN M.K.: Gingival aberrations in dilantin-treated guinea pigs. J.Period. 1983; 7: 229-240.

CHAMORRO G., GONZALEZ A. Y CORREDOIRA J.: Ciclosporina: Estudio farmacocinético y analítico. Experiencia clínica. Farm.Clin. 1987; 4:12-29.

CHAPMAN J.R., MARCEN R., ARIAS M. et al.: Hypertension after renal transplantation. Transplantation. 1987; 43: 860-864.

CHYTIL F. & SHERMAN DR.: How do retinoids work ? Dermatologica. 1987; 175: 8-12.

CHRISTIANS U., SCHLITT H.J., MAURER G., BLECK J., WONIGERT K., SEWING K.: Measurement of cyclosporine and 18 metabolism blood, bile and urine by high performance liquid chromatography. Transplant. Proc. 1988; 20: 609-613.

CIANCIO S.C., YAFFE S.J., CATZ C.H.C.: Gingival hiperplasia and diphenilhidantoin. J.Periodontol. 1972; 43: 411-415.

CITTERIO F. & KAHAN B.D.: The inhibitory effect of cyclosporine on the nuclear proliferative response to a variety of T cell activators. Transplantation. 1989; 47: 334-338.

COHEN D.J., LOERTSCHER R., RUBIN M.F., TILNEY N.L. et al.: Cyclosporin: A new immunosuppressive agent for organ transplantation. Ann.Int.Med. 1984; 101: 667-682.

COFFMAN T.M., CARR D.R., YAGER W.E., KLOTMAN P.E.: Evidence that renal productions is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation. 1987; 43: 282-285.

COLOMBANI P., ROBB A., HESS A.: Cyclosporin A binding to calmoduline:a posible site of action on T-lymphocyt. Science. 1985; 228:337-339.

COLOMBANI P., BRIGHT E., MONASTYRSKYS O., HESS A.: Subcellular action of cyclosporine: interaction between CSA and calmodulin antagonists. *Transplant Procc.* 1987; 19: 1171-1174.

COLVARD M.P., BISHOP J., WEISSMAN D., GARGIULO A.U.: Cardizem- induced gingival hyperplasia: A report of two cases. *Periodont. Case Rep.* 1986; 8: 67-68.

COOLEY D.A., FRAZIER O.H., PAINVIN G.A. et al.: Cardiac and cardiopulmonary transplantation for immunosuppression: Recent Texas Heart Institute experience. *Transplantation Proceeding.* 1983; 15 (4.suppl.1): 2567-2572.

COOPER K.D., VOORHEES J.J., FISHER G.J. et. al.: Effects of CsA on immunologic mechanisms in psoriasis . *J. AM. ACAD. DERMATOL.* 1990; 23: 1318-26.

CORTES V., GARCIA DEL MORAL R., AGUAYO M.L. y cols.: Gomerulonefritis proliferativa mesangial IgM. Análisis inmunohistoquímico de 11 casos. Resumen. *Nefrologia.* 1991. 10: 32.

CORTEZA Q., SHEN S., REVIE D., CHRETIEN P.: Effect of calcium channel blockers on in vivo cellular immunity in mice. *Transplantation.* 1989; 47: 339-342.

CRABTREE G.R.: Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 1989; 243: 355-361.

CRANDON J.H.: Experimental human scurvy. *J.Med. New. Eng.* 1940; 223: 353-369.

CHAMORRO G., GONZALEZ A., CORREDOIRA J.: Ciclosporina: Estudio farmacocinético y analítico. Experiencia clínica. *Farm.Clin.* 1987; 4:12-29.

CHAPMAN J.R., MARCEN R., ARIAS M. et al.: Hypertension after renal transplantation. *Transplantation.* 1987; 43: 860-864.

CHYTIL F. & SHERMAN DR.: How do retinoids work ? *Dermatologica.* 1987; 175: 8-12.

DALEY T.D. & WYSOCKI G.P.: Gingival hyperplasia in diabetic children receiving CsA treatment: a clinicopathological study. (Abstract). *Boston. Am. Acad.Oral Pathology.* 1984.

DALEY T.D. & WYSOCKY G.P.: Cyclosporin therapy. Its significance to the periodontist. *J.periodontal.* 1984; 55: 708-712.

DALEY T.D., WYSOCKY G.P., DAY C.: Clinical and pharmacological correlations in cyclosporin induces gingival hyperplasia. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.* 1986; 62: 417-421.

DALGARNO D., HARDING N., LAZARIDES A. et al.:  $^1\text{H}$  NMR studies on bovine cyclophilin: Preliminary structural characterization of this specific cyclosporin A binding protein. *Biochemistry*. 1986; 25: 6778-6784.

DALLMAN M.J. & CLARK G.J.: Cytokines and their receptors in transplantation. *Current Opinion Immunol*. 1991; 3: 729-734.

DALTON W.S.: Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: Detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *Am. Soc. Clin Oncol*. 1989; 7: 415-424.

DANIEL T., IVES H.: Cyclosporin A inhibits kinase C-independent activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger by PDGF and vanadate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; 145: 111-117.

DANIELS N.J., DOVER J.S., SCHACHTER R.K.: Interaction between cyclosporine and rifampicin. *Lancet (letter)*. 1984; 2: 639.

DARDENNE M., SAVINO W., FEUTREN G., BACH JF.: Stimulatory effects of cyclosporin A on human and mouse thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*. 1987; 17: 275-279.

DAVIDSON I.: Prevention of acute cyclosporine induced renal blood flow inhibition and improved immunosuppression with verapamil. *Transplantation*. 1989; 48: 577-580.

DAVIS M.M. & BJORKMAN P.J.: T-cell receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988; 334: 395-402.

De GROEN P.C., AKSAMIT A.J., RAKELA J., FORBES G.S., KROM R.: Central nervous system toxicity after liver transplantation: The role of cyclosporine and cholesterol. *N Engl J Med*. 1987; 317: 860-861.

DELTZ E., ULRICHS K., ENGEMANN R. et al.: Prevention of graft - versus- host reaction following small bowel transplantation by temporary CsA treatment. In Kahan (Ed.) *Cyclosporine: Biological activity and clinical applications*. Cirune & Stratton. Orlando, Florida. 1984; pp: 811-815.

DERAY G., LE HOANG P., CACRUB P. et al.: Oral contraceptive interaction with cyclosporin. *Lancet*. 1987; 1: 158-159.

DIEPERINK H. & MOLLER J.: Tetoconazole and cyclosporine. *Lancet (letter)*. 1982; 2: 1217.

- DO NASCIMIENTO A., BARRETO R.de C., BOZZO L., de ALMEDA O.P.: interaction of phenytoin and inflammation induces gingival overgrowth in rats. *J. Periodon. Res.* 1985; 20: 386-391.
- DONATSCH P., ABISCH E., HOMBERGER M., et al.: A radioimmunoassay to measure ciclosporin A in plasma and serum samples. *J Immunoassay.* 1981; 2: 19-32.
- DRUGGE R. & HANDSCHUMACHER R.: Cyclosporine: mechanism of action. In Kahan B, ed. *Cyclosporine: Nature of the agent and its immunologic actions.* Ed. Grune & Sttraton. New York. 1988; p. 301-309.
- ELGART G., STOVER P., LARSON K. et al.: Treatment of pyoderma gangrenosum with CsA: resultados in seven patients. *J. AM. ACAD. DERMATOL.* 1991; 24: 83-86.
- ELLIOTT J.F., LIN Y., MIZEL S.B.: Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by CsA. *Science.* 1984; 226: 1439.
- ELLIS C., GORSULOWSKI D., HAMILTON T. et al.: Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA.* 1986; 256: 3110- 3116.
- ENGLISH J., EVAN A., HOUGHTON D.C., BENNETT W.M.: Cyclosporine induced renal dysfunction in the rat: Evidence for arteriolar vasoconstricción with preservation of tubular function. *Transplantation.* 1987; 44: 135-141.
- ESTERBERG H.L. & WHITE P.H.: Sodium dilantin gingival hyperplasia. *J.A.D.A.* 1945; 32: 16-24.
- EUROPEAN MULTICENTRE TRIAL GROUP.: Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: One-year follow-up of a multicenter trial. *Lancet.* 1983; 2: 986-989.
- FAN T. & LEWIS G.: Mechanism of CsA- induced inhibition of prostaglandine synthesis by macrophaes. *Prostaglandins.* 1985; 30: 735-740.
- FAYNOR S.M., MOYER T.P., STERIOFF S.: Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Mayo Clinic Proc.* 1984; 59: 571-572.
- FERNANDEZ LORENTE P.: Hiperplasia gingival hidantoinica. *Revista Actualidad Estomatológica Española.* 1966; 358: 41-49.
- FERRER-ROCA O.: Análisis de imagen (1). Principios básicos de tratamiento y evaluación estadística. Ed Conf Cajas de Ahorro S/C Tfe. 1986; 54-57.

FERRER-ROCA O., BALLESTER E., FERNANDEZ E.: Clasificación automática en anatomía patológica. Experiencia en patología tiroidea y en linfomas de alto grado de malignidad. *Patología*. 1988a; 21: 195-200.

FERRER-ROCA O., BALLESTER E., MARIN J., GOMEZ R., MAYORA K.: Nuclear chromatin linear texture to differentiate follicular and papillary carcinomata of the thyroid. *Pathol Res and Pract*. 1988; p. 157-163.

FERRER-ROCA O.: Olga'Scan. Software de análisis textural con aplicaciones citológicas. Receptores estrogénicos. En: Ferrer-Roca O. *Análisis de imagen (II)*. Universidad de la Laguna. 1989: 43-53.

FERRER-ROCA O.: Texcan software de análisis textural con aplicaciones citológicas. En: Ferrer-Roca O. *Análisis de Imagen (II) Aplicaciones*. Universidad de la Laguna. 1990: 81-117.

FEUTREN G.: The effects of CsA in patients with systemic lupus. *Transpl.Proc*. 1986; 18: 643-644.

FEUTREN G., QUERIN S., NOEL H. et al.: Effects of CsA in severe systemic lupus erythematosus. *J. Pediatr*. 1987; 3: 1063-1068.

FIDELUS R., LAUGHTER A., TWOMEY J., TAFFET S., HADDOX M.: The effect of CsA on ornithine decarboxylase induction with mitogens, antigens and lymphokines. *Transplantation*. 1984; 37: 383-397.

FISHER G., DUELL E., NICKOLOFF B. et al.: Levels of CsA in epidermis of treated psoriasis patients differentially inhibit growth of keratinocytes cultured in serum-free versus serum-containing media. *J.Invest. Dermatol*. 1988; 91: 142-146.

FREED B.M., ROSANO T.G., LEMPERT N.: In vitro immunosuppressive properties of cyclosporine metabolites. *Transplantation*. 1987; 43: 123-127.

FREEMAN H.: On the encoding of arbitrary geometric configurations IEEE. *Trans Elect Computers* EC-10. 1961; p. 260-268

FRISKOPP J., ENGSTROM P.E., SUNDQUIST K.G.: Characterization of mononuclear cells in CsA induced gingival enlargement. *Scand. J. Dent. Res*. 1986; 94: 443-447.

FRISKOPP J. & KLINTMALM G.: Gingival enlargement. A comparison between cyclosporine and azathioprine treated renal allograft recipients. *Swed. Dent. J*. 1986; 10: 85-89.

FUCHS E. & GREEN H.: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell*. 1981; 25: 617-625.

FURUE M., GASPARI A., KATZ S.: The effect of CsA on epidermal cell,II: CsA inhibits proliferation of normal and transformed keratinocytes. *J.Invest.Dermatol.* 1988; 90: 796-800.

FOXWELL B., HIESTAND P., WENGER R., RYFFLE B.: A comparison of cyclosporine binding by cyclophilin and calmoduli and the identification of a novel 45 KD cyclosporin-binding phosphoprotein in Jurkat cells. *Transplantation.* 1988; 46: 35S-40S.

GABBERT H.E., GERHARZ C.D., BIESALSKI H.K., ENGERS R., LULEY C.: Terminal differentiation and growth inhibition of a rat rhabdomyosarcoma cell line (BA-HAN-1C) "in vitro" after exposure to retinoic acid. *Cancer Res.* 1988; 48: 5264-5269.

GARCIA DEL MORAL R., MONTES A., LOPEZ GIGOSOS R., y cols.: Valoración con anticuerpos monoclonales de la reacción de rechazo en el trasplante renal: Análisis de 21 casos. Resumen. *Nefrología.* 1991; 10: 105.

GARCIA DEL MORAL R., MONTES A., NAVARRO N. y cols.: Subpoblaciones leucocitarias y marcadores de lesión tubular en la biopsia renal postrasplante. Resumen. *Nefrología.* 1991; 10: 104.

GARCIA DEL MORAL R, O'VALLE F.: Técnicas de Análisis de imagen en morfología microscópica. En: G. del Moral R, O'Valle F, Rodríguez MD, Quesada MJ. *Manual de Histotecnología.* Ed. Interamericana. Granada. 1992, en prensa.

GASSER R.: Calcium antagonists: Pharmacologic agents in search of new clinical indications. *Angiology.* 1989; 10: 36-43.

GERDES J., SCHWAB U., LEMKE H., STEIN H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 1983; 31: 13-20.

GERDES J., LEMKE H., BAISCH H., WACKER HH., SCHWAB U., STEIN H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 1984; 133: 1710-1715.

GERDES J., LI L., SCHLUETER C., DUCHROW M. et al.: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* 1991; 138: 867-873.

GERLACH J.H.: P-glycoprotein in human sarcoma: Evidence for multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* 1987; 5: 1452-1460.



GIARETTI W., GAIS P., JUTTING U., RODENACKER K., DORMER P.: Correlation between chromatin morphology as derived by digital image analysis and autoradiographic labeling pattern. *Anal Quant Cytol.* 1983; 5: 79-89.

GLASER G.H.: Trastornos convulsivos. Tratado de neurología. ED. H.Houston Merrit. Barcelona. 1982; pap. 602-630.

GLICKMAN I. & SAUNDERS.: *Clinical periodontology*. W.B. Saunders CO. Philadelphia. 1965; pp 76-78.

GOLDMAN M., BARNHART G., MOHANAKUMAR T. et al.: Cyclosporin in cardiac transplantation. *Surgical Clinics of North America.* 1985; 65(3): 637-659.

GONZALEZ JARANAY M. y MESA F.L.: Hiperplasia gingival inducida por Ciclosporina. *Revista Europea de Odontoestomatología.* 1991; 4: 266-270.

GONZALEZ JARANAY M. y MESA F.L.: Hiperplasia gingival inducida por Nifedipino. *Revista Europea de Odontoestomatología.* 1991; 3: 127-130.

GONZALEZ MOLINA M.A., FRUTOS M., CABELLO G. y cols.: Estudio de 100 pacientes trasplantados con riñón de cadaver tratados con CsA. *Nefrología.* 1988; 8(1): 55-60.

GONZALEZ R.G & WINTZ P.: Digital image processing CH8. Representation and description. In: Gelsema ES and Kanal LN. *Pattern recognition in practice II.* Ed. Elsevier Science Publis. 1986: p. 398-402.

GONZALEZ R. & WINTZ P.: *Digital image processing*, 2nd edition Addison-Wesley Publishing Company, TA. 1987; p. 144-160.

GOTTESMAN M.M. & PASTAN I.: The multidrug transporter a double- edged sword. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 12163-12166.

GRANELLI-PIPERNO A., INABA K., STEINMAN R.: Stimulation of lymphokine release from T-lymphoblasts. *J Exp Med.* 1984; 160: 1792-1802.

GRANELLI-PIPERNO A., ANDRUS L., STEINMAN RM.: Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells: kinetics, mitogen requirements and effects of cyclosporin A. *Journal of experimental medicine.* 1987; 163: 922-937.

GREENE J.C. & VERMILLION J.R.: Oral hygiene index: A method for classifying oral hygiene status. *J.A.D.A.* 1960; 61:172.

GREENE W.C., PARKER C.M., PARKER C.W.: Calcium and lymphocyte activation. *Cell immunol.* 1976; 25: 74-89.

GREVEL J., NUESCH E., ABISCH E., KUTZ K.: Pharmacokinetics of oral Cyclosporine A (Sandimmun) in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1986; 31: 211-216.

GREVEL J.: Significance of cyclosporine pharmacokinetics. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 428-434.

GRONE H.J., WEBER K., GRONE E., HELMCHEN U., OSBORN M.: Coexpression of queratin and vimetin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *Am. J. Pathl.* 1987; 129: 1-8.

GUPTA A.K., ELLIS C.N., COOPER K.D. et al.: Oral cyclosporine for the treatment of alopecia areata. A clinical and immunohistochemical analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1990; 22: 242- 250.

GUPTA A.K., MATTESON E.L., ELLIS C.N. et al.: Cyclosporine in the treatment of psoriatic arthritis. *Arch. Dermatol.* 1989; 125: 507- 510.

GURECKI J., WARTY V., SANGHVI A.: The transport of cyclosporine in association with plasma lipoproteins in heart and liver transplant patients. *Transplant Proc.* 1985; Vol XVII, No 4: 1997-2002.

HALL B.K. & SQUIER C.A.: Ultrastructural quantification of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret. *J. Dent. Res.* 1982; 61: 942-952.

HANDSCHUMACHER E., HARDING M., RICE J., DRUGGE R.: Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for CsA. *Science.* 1984; 226: 544-547.

HANDSCHUMACHER R.: Agentes inmunosupresores. En: Goodman A, Rall T, Nies A, Taylor P. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Ed. Medica Panamericana. Mexico, 1991; 1223-1235.

HANNINK M. & DONOGHUE D.: Lysine residue 121 in the proposed ATP-binding site of the v-mos protein is required for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 7894-7898.

HARDING R. & HANDSCHUNACHER R.: Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine: structural and funtional implications. *Transplantation.* 1988; 46: 295-355.

HARMS H., GUNZER U., AUSH M.: Combined local color and texture analysis of stained cells. *Comp Visgraph Imag Proc.* 1986; 33: 364-376.

HARNETT J., PARFREY P., PAUL M. et al.: Erythromocin cyclosporine interaction in renal transplant recipients. *Transplantation.* 1987; 43: 316-318.

HARRIS J., KITTLER J., LLEWELLYN B., PRESTON G.: Modular system for interpreting binary pixel representations of line structured data. *Pattern Recog Theory and Applic.* 1982; 311-351.

HASSELL T. & COOPE C.: Phenytoin induced gingival overgrowth in a mouged cat modelo. In "Phenytoin induced teratology and gingival pathology". Eds. Hassell T.M, Johnston M.C. and Pudley K.H. 1980; pp 147-162. Raven Press. New York.

HASSELL T. & GILBERT G.: Phenytoin sensitibity of fibroblast as the basic for susceptibility to gingival enlargement. *Am. J. Pathol.* 1983; 112: 218-223.

HASSELL T., O'DONNELL J., PERLMAN J., TESINI D., MURPHY T., BEST H.: Phenytoin induced gingival overgrowth in institucionalized epileptics. *J. Clin. Periodont.* 1984; 11: 242-253.

HASSELL T., PAGE R., NARAYANAN A., COOPER C.: Dyphenylhydantoin gingival hyperplasia : Drug induced abnormality of connective tissue. *Proc. Natl. Acad. Sic. USA.* 1976; 73: 2909.

HELDERMAN J., SAGALOWSKY A., DAWIDSON I. et al.: Csa rescue: Salvage of renal transplants undergoing acute rejection unresponsive to convencional treatment. *Abstract. Kidney Internacional.* 1985; 27: 342.

HELIN H., & EDGINGTON T.: Cyclosporine A regulates monocyte/macrophage effector functions by affecting instructor T cells: inhibition of monocyte procoagulant response to allogenic simulation. *J. Immunol.* 1984; 132: 1074-1076.

HENNEY C.S.: The interleukins as lymphocyte growth factors. *Transplant. Proc.* 1989; 21: 22-25.

HEROLD K.C., LANCKI D.W., MOLDWIN R.L., FITCH FW: Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T Cells. *J. Immunol.* 1986; 136: 1315-1321.

HESS A., & COLOMBANI P.: Inverse correlation of cyclosporin binding with sensitivity and resistance. *Transplantation.* 1988; 46: 61S-66S.

HESS A., & TUTSCHKA P.: Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. *J Immunol.* 1980; 124: 2601-2608.

HESS A., TUTSCHKA P., SANTOS G.: Effect of cyclosporine A on human lymphocyte responses in vitro. III. CsA inhibits the production of T lymphocyte growth factors in secondary mixed lymphocyte responses but does not inhibit the response of primed lymphocytes to TCGF. *J Immunol.* 1982; 128: 355-359.

HESS A., HORWITZ L., BESCHORNER W., SANTOS G.: Development of graft-vs-host disease-like syndrome in cyclosporine-treated rats after syngeneic bone marrow transplantation I. Development of cytotoxic T lymphocytes with apparent polyclonal anti-Ia specificity including autoreactivity. *J Exp Med.* 1985; 161: 718-730.

HIHATSCH M., THIEL G., RYFFLE B.: Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 759.

HOLT D., MARSDEN J., JOHNSTON A., BEWICK M., TAUBE D.: Blood cyclosporin concentrations and renal allograft dysfunction. *Br Med. J.* 1986; 293: 1057-1059.

HOOKE D.H., GEE D.C., ATKINS R.C.: Leucocyte analysis using monoclonal antibodies in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1987; 31: 964-972.

HOWS J., PALMER S., GORDON-SMITH E.: Use of CsA in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anaemia. *Transplantation.* 1982; 33: 382-386.

HSU V, HEALD S, HARDING M, HANDSCHUMACHER R, et al. Structural elements pertinent to the interaction of cyclosporin A with its specific receptor protein, cyclophilin. *Bochemical Pharmacology.* 1990; 40: 131-140.

HUGOSON A.: Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation og pregnant women and experimental studies in dogs. *J. Periodont.* 1970; 5(suppl):1.

INGRIDA S.: Cyclosporine. *Am. J. Pharm. Educ.* 1989; 53: 160-162.

INOUE F., & HARRISON J.: Folic acid and phenytoin hyperplasia. *Lancet.* 1981; II: 86.

JACKSON N., HSU C., VISSCHER G., VENKATACHALAM M., HUNES H.: Alterations in renal structure and function in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *J. Pharm. Exp.T herap.* 1987; 242:749-756.

KAHAN B.: Complications of cyclosporine-prednisone immunosuppression in 402 renal allograft recipients exclusively followed at a single center for from one to five years. *Trasplanta.* 1987; 43: 197-204.

KAHAN B., RIED M., NEWBERGER J.: Pharmacokinetics of cyclosporine in human renal transplantation. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 446-453.

KAHAN B.: Cyclosporine: a powerful addition to the immunosuppressive armamentarium. *Am J Kidney Dis.* 1984; 3: 444-445.

KAHAN B., WIDEMAN C., RIED M. et al.: The value of serial serum through cyclosporine levels in human renal transplantation. *Transplant Proc.* 1984; 16: 1195-1199.

KAHAN B., PELLIS N., LEINIKKI P., YOSHIMURA N., SCHREIBER R.: Pharmacodynamic assays of the immunosuppressive action of cyclosporine therapy in transplant recipients. *Transplant Proc.* 1987; Vol XIX, No 1: 1695-1698.

KAHAN B. & BACH J.: Proceedings of the Second International Congress on cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1988; 20 Suppl. 3: 1-1131.

KAHAN B. & GREVEL J.: Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. *Transplantation.* 1988; 46: 631-644.

KAHAN B.: Drug therapy: cyclosporine. *N Engl J Med.* 1989a; 321: 1725-1738.

KAHAN B.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine. *Transplant Proc.* 1989b; Vol XXI, No 3, Suppl 1: 9-15.

KAHN D., HICKMAN R., DREYER C., TEMPLECAMP C.: Use of verapamil with conventional immunosuppression after porcine renal transplantation. *Eur. Surg. Res.* 1989; 21: 156-161.

KAMEL OW., FRANKLIN W.A., RINGUS J.C., MEYER J.S.: Thymidine labelling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am. J. Pathol.* 1989; 134: 107-113.

KANITAKIS J., URABE A., HAFTEK M., THIVOLET J.: In vivo effects of cyclosporin A on proliferation -and differentiation- associated antigens of human skin. *J. Invest Dermatol.* 1989; 92: 456. Abstract.

KANITAKIS J., RAMIREZ-BOSCA A., HAFTEK M., THIVOLET J.: Histologic light- and electron-microscopic effects of cyclosporin A on normal human skin xenografted onto nude mice. *Virchows Arch [A].* 1990; 416: 505-511.

KANITAKIS J. & THIVOLET J.: Cyclosporine. An immunosuppressant affecting epithelial cell proliferation. *Arch. Dermatol.* 1990; 126: 369-375.

KAPONEN M., GRIEDER A., LOOR F.: The effects of cyclosporins on the cell cycle of T-lymphoid cell lines. *Exp. Cell. Res.* 1982; 140:237-250.

KAPPOS L., PATZOLD U., DOMMASCH D. et al.: Cyclosporine versus azathioprine in the long-term treatment of multiple sclerosis- results of the German multicenter study. *Ann. Neurol.* 1988; 23: 56-63.

KATZ S., MCDONALD J.J., STOOKEY G.K.: Programa de control de placa. Odontología preventiva en acción. Edit. Médica Panamericana. 1986; pp 127-133.

KAY J. & BENZIE C.: Rapid loss of sensitivity of mitogen-induced lymphocyte activation to inhibition by ciclosporin A. *Cell. Immunol.* 1984; 87: 217-224.

KENNY J.: Calcium channel blocking agents and the heart. *Br. Med. J.* 1985; 291: 1150-1152.

KEOWN P.: Therapeutic monitoring of ciclosporin by Sandoz's RIA, cyclotrac and Tdx methods. *Transplantation and Immunology (letter)*. 1988; 5: 8.

KEOWN P. & STILLER C.: Ciclosporina: una espada de doble filo. 1988. *Hospital Practice (Ed. Español)*; Vol. 3, Núm. 1: 51-65.

KEOWN P., STILLER C., WALLACE A.: Effect of ciclosporine on the kidney. *J. of Pediatrics.* 1987; 111: 1029-1033.

KERMANI-ARAB V, SALEHMOGHADDAM S, DANOVITCH, HIRJI K, REZAI A. Mediation of the antiproliferative effect of ciclosporine on human lymphocytes by blockade of interleukin 2 biosynthesis. *Transplantation.* 1985; 39: 439-442.

KHURNI N.: A comparison of calcium-antagonists and propranolol: Exercise tolerance heart rate and ST segment changes in patients with chronic stable angina pectoris. *Err. J. Clin. Pharm.* 1987; 32: 539-548.

KIMBALL O.: The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoina. *JAMA.* 1939; 112: 1244-1245.

KIMBALL P., KERMAN R., KKAHAN B.: Failure of propyl-peptidyl isomerase to mediate ciclosporine suppression of intracellular activation signal generation. *Transplantation.* 1991; 51: 509-513.

KITAMURA K., MORISAKI I., ADACHI C. et al.: Gingival overgrowth induced by CsA in rats. *Arch. Oral. Biol.* 1990; 35(6): 483-486.

KLAR L.: Gingival hyperplasia during dilantin-therapy. A survey of 312 patients. *J. Publ. Health. Dentistry.* 1973; 33: 180-185.

KLAUS G. & HAWRYLOWICZ C.: Activation and proliferation signals in mouse B cells. II Evidence for activation (G0 to G1) signals differing in sensitivity to ciclosporine. *Eur J Immunol.* 1984; 14: 250-254.

KLINGSBERG J., CANCERALLO L., BUTCHER E.: Effects of air drying in rodent oral mucous membrane. A histologic study of simulated mouth breathing. *J. Periodontol.* 1962; 32: 38.

KLINTMALON G. & SAWE J.: High dose methylprednisolone increases plasma cyclosporin levels in renal transplant recipients. *Lancet.(letter).* 1984; 1: 731.

KOHLHAW K., WONIGEIT K., FREI U., et al.: Effect the calcium channel blocker diltiazem on cyclosporin A blood levels and dose requirements. *Transplant Proc.* 1988; 20: 572-574.

KORNER T.: Cyclosporin in primary biliary cirrhosis. *Dtsch-Med-Wochenschr.* 1991; 116: 197.

KOVACS E. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today.* 1991; 12: 17-23.

KRENSKY A.M., WEISS A., CRABTREE G., DAVIS M.M., PARHAM P.: Lymphocytic-antigen interactions in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322: 510-517.

KUENTNY J., FRONDSSEN N.E., JOHNNEN T. et al.: Treatment of Grave's ophthalmopathy with CsA. *Act. Medica. Scandinavica.* 1986; 220: 189-191.

KUNZE K., HERRMAN W., MEYER W.: The ZYPAB image-processing system for cytologic prescreening for cervical cancer. *Anal Quant Cytol.* 1980; 2: 252-256.

LAM Y., GLARD M., WARREN J.: Calcium channel blocker and treatment of hypertension. *Drug.Intell. Chin. Pharm.* 1986; 20: 187-198

LAMBERTENGI G., SANTORO F., POLLI N. et al.: Light and electron microscopic study of CsA induced gingival hyperplasia. *J. Periodontol.* 1986; 57(12): 771-775.

LANDEGREN U., RAMSTEDT U., AXBERG I. et al : Cyclosporin A permits the distinction between specific T and NK activity generated in a human MLC. *Int. J. Cancer.* 1981; 28: 725-730.

LARACHA D. & CAELIS R.: Avances in calcium blocker therapy. *Surg. Pharmacol.* 1986; 151: 527-537.

LATIMER K., RAKISH P., PURSWELL B., KIRCHER I.: Effects of cyclosporin: Administration in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986; 11(2): 161-173.

LAUPACIS A., FOR THE CANADIAN TRANSPLANT STUDY GROUP: Complications of cyclosporine therapy a comparison to azathioprine. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2748-2753.

- LE BIGOT J., LAVWE D., KIECHEL J.: Pharmacocinétique et métabolisme de la CyA. Interactions médicamenteuses. *Néphrologie*. 1987; 8: 136-141.
- LE GRUE S., TURNER R., WEISBRODT N., DEDMAN J.: Does the binding of cyclosporine to calmodulin result in immunosuppression?. *Science*. 1986; 234: 68-71.
- LEDERMAN D., LUMERMAN H., REUBEN S., FREEDMAN P.: Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. *Oral. Surg.* 1984; 57: 620-622.
- LELE P., PETERSON P., YANG S. et al. Cyclosporine and tegretol another drug interaction (abstracted). *Kidney Intern.* 1983; 27: 334.
- LEVELL N.J., MACLEOD R.I., MARKS J.M.: Lack of effect of cyclosporin mouthwash in oral lichen planus. *Lancet*. 1991; 337(8744): 796-797.
- LEMAIRE M. & TILLEMENT J.: Cyclosporine pharmacokinetics. *J Pharm Pharmacol.* 1982; 34: 715-718.
- LICHTMAN A., SEGER G., LICHTMAN M.: The role of calcium in lymphocyte proliferation: An interpretative review. *Blood*. 1983;61: 413-422.
- LILLEHOJF H., MALEK T., SHEVACH E.: Differential effect of cyclosporine A on the expression of T and beta lymphocyte activation antigens. *J Immunol.* 1984; 133: 244-250.
- LINDHOLM A. & HENRICSSON S.: Verapamil inhibits cyclosporin metabolism. *Lancet*. 1987; 1: 1262.
- LITHELL H., ODLIND B., SELINUS I., LINDBERG A., LINDSTROM B., FRODIN L.: Is the plasma lipoprotein pattern of importance for treatment with cyclosporine?. *Transp. Proc.* 1986; Vol XVIII, No 1: 50-51.
- LITTLE T., GIRGIS S., MASSOTTI R.: Diphenilhidantoin induced gingival hyperplasia: Its response to changes in drug dosage. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1975; 17: 421-424.
- LOCK C.: The calcium antagonist. Their current role in cardiovascular therapy. *Drug. Inf. Newslett.* 1985; 4(4).
- LUCAS R., HOWELL L., BRIAN A.: Nifedipine induced gingival hyperplasia: A histochemical and ultrastructural study. *J. Periodontal.* 1984; 56: 211-215.
- LUCIA M., WOAN M., SCHWEIZER R., KOSCIOL C., JOHNSON R. & SHARPE R.: Cyclosporine inhibits the proliferation of squamous cells. *FASEB. J.* 1986; 45: 272.



- LYNCH M.: *Burket's Oral Medicine*. ed.8, pp 856. Philadelphia. J. B. Lippincott CO. 1984.
- LYNCH M.A. & SHIP I.I.: Initial oral manifestations of leukemia. *J. Amer. Dent. Ass.* 1967; 75: 932-940.
- MACHUCA G., MARTINEZ-SAHUQUILLO A., RIOS J.V., ROLAS J., FERNANDEZ A. Y BULLON P.: Valoración clínica de la hiperplasia gingival en pacientes en tratamiento con Nifedipina. Comunicación libre. XXV Reunión Anual de la Sociedad Española de Periodoncia, Palma de Mallorca 1991.
- MANDREOLI M.: Do calcium channel blockers have any influence on the immunological status of renal graft recipients on cyclosporine therapy. *Am. J. Nephrol.* 1990; 10: 58-60.
- MARTOS F. y TAMARGO J.: Hiperplasia gingival hidantoínica: Clínica prevención y tratamiento. *Rev. Actualidad Estomatológica Española.* 1984; 340: 23-30.
- MASON D.W. & MORRIS P.J.: Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu. Rev. Immunol.* 1986; 4: 119-145.
- MASUDA K., URAYAMA A., KOGURE M. et al. : Double-masked trial of ciclosporin versus colchicine and long-term open study of ciclosporin in Behcet's disease. *Lancet.* 1989 ; 125: 507-510.
- MATARASSO S., VAIA E., CAPUTO G., RICCITIELLO F.: Le gingivopatie ipertrofico-iperplastiche. Inquadramento etiopatogénico, clinico ed indirizzi diagnostici. *Minerva Stomatologica.* 1989; 38,5: 567-577.
- MAURER G.: Metabolism of cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1985; 17, Suppl. 1: 19-26.
- MAURER G. & LEMAIRE M.: Biotransformation and distribution in blood of cyclosporine and its metabolites. *Transplant. Proc.* 1986; 18, Suppl. 5: 25-34.
- McCREADY R. & PAPADIMITRIOV J.: An analysis of DNA cytophotometry on tissue sections in a rat liver model. *Anal Quant Cytol.* 1983; 5: 117-123.
- MCGAW W. & PORTER H.: Cyclosporine induced gingival overgrowth: An ultrastructural stereologic study. *Oral. Surg.* 1988; 65: 186- 190.
- MCNALLY P., MISTRY N., IDLE J., WALLS J., FEEHALLY J.: Calcium channel blockers and cyclosporine metabolism. *Transplantation.* 1989; 48: 1071.

MENKES J.: Trastornos Paroxísticos. Neurología Infantil. Salvat. Barcelona. 1981; 423-424.

MERKER M., RICE J., SCHWEITZER B., HANDSCHUMACHER R.E.: Cyclosporin A binding component in BW5147 lymphoblasts and normal lymphoid tissues. Transplant Proc. 1983; 15: 2265-2270.

MERRIT H. & PUTNAM T.: Sodium diphenylhidantoine in the treatment of convulsive disorders. J.A.M.A. 1983; 111: 1068-1073.

MEYER-LEHNERT H. & SCHRIER R.: CsA enhance vasopresin-induced Ca mobilization and contraction in mesangial cells. Kidney Int. 1988; 34: 89.

MEYRIER A.: Treatment of glomerular disease with CsA. Nephrol. Dial. Transplant. 1989; 4: 923-931.

MIHATSCH M., THIEL G., SPICHTIN H. et al.: Morphological findings in kidney transplants after treatment with cyclosporine. Transplant. Proc. 1983; 15: 2821-2835.

MILSTEIN C. & KOHLER G.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256: 495-497.

MINUK G., BOHME C., BURGESS E. et al.: Pilot study of CsA in patients with symptomatic primary biliary cirrhosis. Gastroenterology. 1988; 95(5): 1356-1363.

MIYAWAKI T, YACHIE A, OHZEKI S, et al. Cyclosporin A does not prevent expression of Tac antigen, a probable TCGF receptor molecule on mitogen-stimulated human T-cells. J. Immunol. 1983; 130: 2737-2742.

MOORE J., PEATTIE D., FITZGIBBON M., THOMSON J.: Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. Nature. 1991; 351: 248-250.

MORALES J., ANDRES A., PRIETO C., RODICIO J.: Efecto de la eritromicina en los niveles de ciclosporina. Nefrología. 1987; 7: 199-200.

MORALES J., OLIET A., PRIETO C., ORTUÑO B.: Efecto beneficioso de la interacción ketoconazol-ciclosporina. Nefrología. 1988; 8: 120-125.

MORALES J. y ANDRES A.: Inmunosupresión en el trasplante renal. Jano. 1991; Vol XLI: 97-133.

MORAM M.: Prevention of acute graft rejection by the prosta glandin E-1 analogue nusoprostal in renal transplant recipients treated with cyclosporin and prednisone. N. Engl. J. Med. 1990; 322: 1183-1185.

- MORRIS P.: Cyclosporine, FK506 and other drugs in organ transplantation. *Current Opinion in immunology*. 1991; 3: 748-751.
- MUELLER H., ANTMAN E., FERSR J., MULLER J.: Nifedipine in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacotherapy*. 1981; 1: 78-94.
- MUFTUOGLU A., PAZARLI H., YURDAKUL S. et al.: Short term CsA treatment of Behçet's disease. *British. J. Ophthalmology*. 1987; 71: 387-390.
- MÜHLEMANN H.: Psychological and chemical mediator of gingival health. *Journal preventic-dentristi*. 1977; 4: 6-17.
- MÜHLEMANN H. & MAZOR Z.: Gingivitis in Zurich school children. *Helv. Odontol. Acta*. 1958; 2: 3-12.
- MÜHLEMANN H. & SON S.: Gingival sulcus bleeding-leading symptom in initial gingivitis. *Helv. Odontol. Acta*. 1971; 15: 107.
- MUNRO C.S., HIGGINS E.M., MARKS J.M. et al.: CsA in atopic dermatitis therapeutic response is dissociated from effects on allergic reactions. *Br. J. Dermatol*. 1991; 124: 43-48.
- MURRAY B., PALLER M., FERRIS T.: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int*. 1985; 28: 767-774.
- MURAGUCHI A., BUTLER JL., KEHRI JH., FALKOFF R.J.M., FAUCI AS.: Selective suppression of an early step in human B cell activation by cyclosporin A. *J Exp Med*. 1983; 158: 690-702.
- NAVARRO N., LOPEZ GIGOSOS N., GARCIA DEL MORAL R., MONTES A., NAVAS A., GOMEZ M., CAMARA M., GARCIA A.: Lesiones tubulointersticiales inducidas por Ciclosporina A. *Resumen. Nefrologia*. 1991; 10: 105.
- NICKOLOFF B., FISHER G., MITRA R., VOORHESS J.: Additive and synergistic antiproliferative effects of cyclosporin A and gamma interferon on cultured human Keratinocytes. *Am J. Pathol*. 1988; 131: 12-18.
- NIEDERBERGER W., LEMAIRE M., MAURER G., NUSSBAUMER K., WAGNER O.: Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. *Transplant. Proc*. 1983; 15: 2419-2421.
- NIIMI A., TOHNAI I., KANEDA T. et al.: Immunohistochemical analysis of effects of CsA on gingival epithelium. *J. Oral. Pathol. Med*. 1990; 19: 397-403.

NUSSENBLATT R., ROOK A., WACKER W. et al.: Treatment of intraocular inflammatory disease with cyclosporin A. *Lancet*. 1983; 2: 235.

NYSKA A., WANER T., ZLOTOGORSKI A. et al.: Oxodipine-induced gingival hyperplasia in beagle dogs. *Am. J. Pathol.* 1990; 137: 737-739.

O'GARRA A., WARREN D., HOLMAN M., POPHARM A., SANDERSON C., KLAUSS G.: Effect of cyclosporine on responses of murine B cells to T cell-derived lymphokines. *J Immunol.* 1986; 137: 2220

OTA B. & BRADLEY M.: Side effects of cyclosporine in 100 renal allograft recipients. *Trasplant Proc.* 1983; 15(4): 3150-3156.

OYER P., STINSON E., JAMIESON S. et al: Cyclosporine in cardiac transplantation: A 2 1/2 year follow up. *Trasplant Proc.* 1983; 15 (4, Suppl. 1): 2546-2552.

PAGE E., WEXLER M., GUENTHER L.: Cyclosporin A. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1986; 14: 785-791.

PALACIOS R.: Concavalin A triggers T-lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol.* 1982; 128: 337-342.

PANUSKA H., GORLIN R., BEARMAN J., MITCHELL D.: The effect of anticonvulsant drugs upon the gingiva. A serie of analyses of 1048 patients. *J. Periodontol.* 1960; 3: 336-344.

PARK C.W., HAN C.H., KIM C.C., KIM D.J., KIM H.J.: Immunomodulationtherapy for severe aplastic anemia versus ALG plus CsA. *Korean-J-Intern-Med.* 1989; 4: 28-33.

PASCUALIN F., BEDESCHI G., BOSCHIERO L.: Hiperplasia gingival por CsA. *Odontoestomatología e implantoprótesis.* 1990; 5:319-322

PATCHCINSKI R., BURCKART G., VENKATARAMANAN R.: Cyclosporine. *Drug Intell Clin Pharm.* 1985; 19: 90-100.

PENN I. & FIRST M.: Development and incidence of cancer following cyclosporine therapy. *Transplant. Proc.* 1986; 17: 210-213.

PENN I.: Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation.* 1987; 43: 32-35.

PERNU H.E., PERNU L.M., HUTTUNEN K.R., NIEMINEN P.A. and KNUUTTILA M.L.: Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. *J. Periodontol.* 1992; 63: 548-553.

- PEÑARROCHA M., BAGAN J.V., ANTOLIN M.M., ALFARO A.: Sobrecrecimiento gingival inducido por difenilhidantoína sódica. *Revista Europea de Odontostomatología*. 1989; 1: 41-47.
- PEÑARROCHA M., BAGAN J.V., VERA SEMPERE F., OLTRA M.J., MILAN M.A.: Patología oral secundaria a la ingesta de fármacos antiepilépticos. *Acta Estomatológica Valenciana*. 1986; 3: 187-196.
- PHILSTROM B., CARLSON J., QUENTON T., BASTIEN S., KEENAN K.: Prevention of phenytoin associated gingival enlargement. a 15 month longitudinal study. *J. Periodontol.* 1980; 51: 311-317.
- PISANTY S., SHOSHAN S., CHAJEK T. et al.: The effects of CsA treatment on gingival tissue of patients with Behçet's disease. *J. Periodontol.* 1988; 59(9): 599-603.
- PRATT W.: *Digital image processing*. NY, John Willey & Sons. 1978; 489-490.
- PRESSMAN J.: Markovian analysis of cervical cell images. *J Histoch Cytoch.* 1976; 24. 138-146.
- PTACHCINSKI R.J., BURCKART G.J., VENKATARAMANAN R.: Cyclosporine. *Drug Intell Clin Pharm.* 1985a; 19: 90-100.
- PTACHCINSKI R.J., VENKATARAMANAN R., ROSENTHAL J.T. et al.: The effect of food on cyclosporine absorption. *Transplantation.* 1985b; 40: 174-176.
- PTACHCINSKI R.J., VENKATARAMANAN R., BURCKART G.J.: Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin. Pharmacokinetic.* 1986; 11; 107-132.
- QUESNIAUX V., SCHREIER M., WENGER R. et al.: Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity. *Eur. J. Immunol.* 1987a; 17: 1359-1365.
- QUESNIAUX V., TEES R., SCHREIER M. et al.: Potential of monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine. *Clin. Chem.* 1987b; 33: 32-37.
- QUESNIAUX V., SCHREIER M., WENGER R.: Molecular characteristics of cyclophilin-cyclosporine interaction. *Transplantation.* 1988; 46: 23S-27S.
- RAMIREZ-BOSCA A, KANITAKIS J, HAFTEK M, FAURE M, CASTELLS RODELLAS A, THIVOLET J. Non-immunosuppressive ciclosporin H inhibits the growth and DNA synthesis of cultured normal human epidermal keratinocytes. *Skin Pharmacol.* 1989; 2: 175-179.
- RAMON Y., BEHAR S., KISHON Y., ENGELBERG I.: Gingival hyperplasia caused by Niphedipine. A preliminary report. *Int. J. Cardiol.* 1984; 5: 195-206.

RAS E.: Hyperplasia gingivae diphenylhydantoinae. A clinical histochemical and biochemical study. *Acta Odontol. Scand.* 1963; 21 (Supl.34): 6-132.

RATTEITSCHAK-PLUSS E., HEFTI A., LORTSCHER P., THIEL G.: Initial observation that cyclosporin A induces gingival enlargement in man. *J.Clin. Periodontol.* 1983; 10: 237-246.

REEM G., COOK L., VILECK J.: Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T-lymphocyte inhibited by cyclosporine A. *Science.* 1983; 221: 63-65.

RINGE D. Binding by design. *Nature.* 1991; 351: 185-186

ROBERT A. & SPORN M.: Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: *The Retinoids. Vol.II.* Academy Press. Bethesda 1984; p.210-276.

RODICIO J., MORALES J., RUILOPE L.: Calcium antagonists and the kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1990; 5: 81-86.

ROSANO T., FREED B., PELL M., LEMPERT N.: Cyclosporine metabolites in human blood and renal tissue. *Transplant. Proc.* 1986; Vol XVIII, No 6, Suppl. 5: 35-40.

ROSANO T., BROOKS C., DYBAS M. et al.: Selection of an optimal assay method for monitoring cyclosporine therapy. *Transplant Proc.* 1990; 22: 1125-1128.

ROSTOCK M., FRY H., TURNER J.: Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. *J. Periodontol.* 1986; 57: 294. 299.

ROUTHIER J., EPSTEIN O., JANOSSY G. et al.: Effects of cyclosporin A in suppressor and inducer T-lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 1980; 2: 1223.

RUIZ P., KULBECK PC., SCROGGS M., SANFILIPPO F.: Association between CsA therapy and interstitial fibrosis in renal allograft biopsies. *Transplantation.* 1988; 45: 91-95.

RUSSEL D., LARSON D., CARDON S., COPELAND J.: Cyclosporine inhibits prolactin induction of ornithine decarboxylase in rats tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1984; 35: 159-166.

RYFEL B.: Experimental toxicological studies with CsA. In: White D.J.G. (eds.). *Cyclosporin A.* Amsterdam. Elsevier Biomedical Press. 1982; pp 45-75.

RYFFEL B., FOXWELL BMJ, MIHATSCH MJ, DONATSCH P, MAURER G. Biological significance of cyclosporine metabolites. *Transplant. Proc.* 1988; Vol XX, No 2, Suppl 2: 575-584.

SANCHEZ MADRID F., CEBRIAN M., LANDAZURI M.O. et al.: Report of the International Workshoop on Leucocyte Differentiation Antigens. *Immunologia.* 1989; 8: 35-46.

## *Bibliografía*

- SANFILIPPO F.: Renal transplantation. En: Sale GE, eds. The pathology of organ transplantation. Stoneham: Butterworth. 1990; 51-101.
- SANPEDRO A., BLANCO J., MARTOS F., TEJERINA J.: Aspectos morfológicos del agrandamiento gingival por hidantoinas. *Revista Española de Estomatología*. 1985; 33: 39-44.
- SANDOZ LABORATORIES. Sandimmune (Cyclosporin). Basel. Switzerland. Sandoz Ltd. 1983.
- SANDORAMA. Número especial Centenario Sandoz. 1988. I-17/I-24.
- SASAKI K., MURAKAMI T., KAWASAKI M., TAKAHASHI M.: The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive antigen expression. *J. Cell. Physiol.* 1987a; 133: 579-584.
- SASAKI K., MURAKAMI T., TAKAHASHI M.: A rapid and simple estimation of cell cycle parameters by continuous labeling with bromodeoxyuridine. *Cytometry*. 1987b; p. 526-528.
- SASAKI K., MATSUMURA K., MURAKAMI T., SHINOZAKI F., TAKAHASHI M.: Effects of serum deprivation on Ki-67 reactive antigen. Expression in HeLa cells. *A. Pathol. Jap.* 1989; 39: 638-642.
- SASAKI A., INOUE T., FURUKAMA Y. et al.: Cyclosporin therapy for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Reinsho-Ketsueki*. 1990; 31: 1889-90.
- SAYDJARY R., TOWNSEND C., BARRANCO S., JAMES E., THOMPSON J.: Effects of cyclosporin difluoromethylornithine on the growth of hamster pancreatic cancer in vitro. *JNCI*. 1986; 77: 1087-1092.
- SAVAGE N., SEYMOUR G., ROBINSON F.: CsA induced gingival enlargement. *J. Periodontol.* 1987; 7: 475-480.
- SCHOLLMAYER P. & GROTZ W.: Cyclosporin in the treatment of Wegener's granulomatosis and related diseases. *APMIS-Suppl.* 1990; 19: 54-55.
- SCOTT J. & HIGENBOTTAM T.: Adverse reactions and interactions of cyclosporine. *Med. Toxicol.* 1988; 3: 107-127.
- SEIBEL W., YAHIA N., MCCLEARY L., LESKO L.J., HASSELL T.: Cyclosporine - induced gingival overgrowth in beagle dogs. *J. Oral. Pathol. Med.* 1989; 18: 240-245.
- SEYMOUR R.A. & SMITH D.H.: The effect of a plaque control programme on the incidence and severity of cyclosporin-induced gingival changes. *J. Clin. Periodontol.* 1991; 18: 107-110.
- SEYMOUR R., SMITH D., & ROGERS S.: The comparative effects of Azathioprine and CsA on some gingival health parameters of renal transplant patients. *J. Clin. Periodontol.* 1987; 14:610-613.

SHABTAI M., WALTZER W.C., PULLIS C.K., RAISBECK A.P., MALINOWSKI K., RAPAPPORT F.T.: Natural killer cells subsets and alloresponsiveness in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 1846-1848.

SHAFTIC A., WIDDUP L., ABATE M. & JACKNOWITZ A.: Nifedipine induced gingival hiperplasia. *Drug Intell. Clin. Phar.* 1986; 20: 602-605.

SHARPE R., ARNDT K., BAUER S. & MAIONE T.: Cyclosporine inhibits basic fibroblast growth factor driven proliferation on human endothelial cells and keratinocytes. *Arch. Dermatol.* 1989; 125: 1359-1362.

SHAW LM. *Advances in cyclosporine pharmacology, measurement and therapeutic monitoring.* *Clin. Chem.* 1989; 35: 1299-1308.

SHAW LM., BOWERS L., DEMERS L. et al.: Metabolism of cyclosporine A. *Clin. Chem.* 1987; 33: 1269-1275.

SHEVACH E.: The effects of cyclosporine A on the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1985; 3: 397-423.

SILVESTRI E., VERALDI S., PIFERI M. e col.: Iperplasia gengivale da difenilidantoina, ciclosporina A e nifedipino. *Confronto istopatologico.* *Minerva Stomatologica.* 1988; 37: 189-192.

SKLAREW R. & PERTSCHUK L.: Quantitation of the immunocytochemical assay for estrogen receptor protein (ER-ICA) in human breast cancer by television imaging. *J Histochem Cytochem.* 1987; 35: 1253-1259.

SLAVIN J. & TAYLOR J.: Cyclosporin, nifedipine and gingival hyperplasia. *Lancet.* 1987; 56: 139.

SMEULDERS A. & KATE T.: Accuracy of optical density measurement of cells. 1: Low resolution. *Applied Optics.* 1987; 26: 3249-3257.

SMITH K.A.: Interleukin-2 reception, impact and implication. *Science.* 1988; 240: 1169-1176.

SMITH A.Y., CITTERIO F., WELSH M., KERMAN RH., KAHAN BD.: Interleukin-2 receptor as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity. *Transplant Proc.* 1989; Vol 21, No 1: 1462-1464.

SMITH D., DELGADO A., CRAMER J. & MATTSON R.: Historical perspective on the choice of antiepileptic drugs for the treatment of seizures adults. *Neurology.* 1983; 33: 2-7.



SPORN M. & NEXTON D.: Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed. Proc.* 1979; 38: 2528-2534.

SPORN M. & ROBERTS A.: Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.* 1983; 43: 3034-3040.

STAMENKOVIC I., SKALLY O. & GABIANI G.: Distribution of intermediate filament protein in normal and diseased human glomeruli. *Am. J. Pathol.* 1986; 125: 465-475.

STEINBERG A.: Phenytoin penetration through sulcular tissues and its possible relationship to phenytoin-induced gingival overgrowth. In "Phenytoin-induced teratology and gingival pathology". Eds. Hassell T.M, Johnston M.C. and Dudley K.H. Raven Press. New York. 1980; pp:179-188.

STEINMANN B., BRUCKNER P., SUPERTI-FURGA A.: Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo—indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase. *J Biol Chem.* 1991a; 266: 1299-1303.

STEINMANN B., SUPERTI-FURGA A., BRUCKNER P.: Mechanism of action of FK506 and cyclosporin. (letter). *Lancet.* 1991b; 337: 439.

STERNBERGER L. & STERNBERGER N.: The unlabeled antibody method: Comparison of Peroxidase-Antiperoxidase with Avidin-Biotin complex by new method of quantification. *J Histochem Cytochem.* 1986; 34: 599-605.

STILLER C., LAUPACIS A., DUPRE J. et al.: Cyclosporine for treatment of early type I diabetes: preliminary results. *N. Eng. J. Med.* 1983; 308: 1226.

STOCKINGER M.: Cluster report: CD68. Knapp W., Dörken B., Gilks W.R. et al. in *Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens.* Ed. Oxford. 1989; pp 841-843.

STRICKLAND N., SMITH K. & MAROTTI K.: Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cell: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyl. *Camp cell.* 1980; 21: 335-347.

STROMINGER J.L.: The T-cell receptor and class Ib MHC related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell.* 1989; 57: 895-898.

SYRJANEM S. & SYRJANEN K.: Hyperplastic gingivitis in a child receiving sodium valproate treatment. *Proc. Finn. Dent.* 1979; 75- 95.

TAKAHASHI N., HAYANO T., SUZUKI M.: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature.* 1989; 337: 473-475.

THOMSON D., TUCKER B., GABBAI F. & BLANTZ R.: Funcional effects on glomerular hemodinamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 960-969.

TRAEGER J., DUBERNARD J., BOSI E. et al.: cyclosporine in clinical pancreatic transplantation. In Kahan (Ed). *Cyclosporine: biological activity and clinical applications.* Grune & Stratton. Orlando. Florida. 1984; pp:386-389.

TWENTYMAN P.: Resistence modification by non-immunosuppressive cyclosporins. *Br. J. Cancer.* 1988; 57: 254-258.

TWENTYMAN P.: A possible role for cyclosporins in cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 1988; 8: 985-994.

VAN BUREN C., KERMAN R., AGOSTINO G. et al.: The cellular target of cyclosporin A action in humans. *Surgery.* 1982; 92: 167-174.

VAN der KWAST W.: Speculations regarding the nature of gingival hyperplasia due to diphenylhydantoin-sodium. *Acta Med. Scand.* 1956; 153: 399-405.

VAN der WALL E., TUINZING D. & HES J.: Gingival hyperplasia induced by niphedipine, arterial vasodilating drug. *Oral Surg. Oral Pathol.* 1985; 60: 38-40.

VAN RIJTHOVEN A. & DIJKMANS B.A.: Cyclosporin treatment for rheumatoid arthritis: a placebo controlled, double blind, multicenter study. *Ann. Rheumatic Diseases.* 1986; 45: 726-731.

VELTHUIS P. & JESSERUM R.: Improvement of ichthyosis by cyclosporin. *Lancet.* 1985; 1: 335.

VENKAT K.K., TKACH D., KUPIN W. et al.: Reversal of cyclosporin-associated hemolytic-uremic syndrome by plasma exchange with fresh-frozen plasma replacement in renal transplant recipients. *Transplant-Proc.* 1991; 23: 1256-1257.

VENKATARAMANAN R., PTACHCINSKI RJ., BURCKART GJ. et al.: Cyclosporine . *Drug Intell Clin Pharm.* 1985; 19: 90-100.

VON WARTBURG A. & TRABER R.: Chemistry of the natural cyclosporin metabolites. *Prog. Allergy.* 1986; 38: 28-45.

WADHWA NK., SCHROEDER TJ., O'FLAHERTY E., PESCE AJ., MYRE SA., ROY FIRST M.: The effect of oral metoclopramide on the absorption of cyclosporine. *Transplantation.* 1987; 43: 211-213.

WAGNER K., HENKEL M., HEINEMEYER G. & NEUMAYER H.H.: Interaction of calcium blockers and cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1988; 20:(suppl.2) 561.

## *Bibliografía*

- WAGNER K., HENKEL M. & NEUMAYER H.H.: Interaction of calcium blockers and cyclosporine. *Second.Int.Cong.Cyclosporine.* (Washington DC) 1989; 426.
- WANG CP., BURCKART GJ., PTACHCINSKI RJ., VENKATARAMANAN R., et al.: Cyclosporine metabolite concentrations in the blood of liver, heart, kidney and bone marrow transplant patients. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 591-596.
- WENGER R.: Synthesis of cyclosporin and analogs: Structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. *Prog. Allergy.* 1986; 38: 46-64.
- WENGER R.M.: Structures of cyclosporine and its metabolites. *Transplantation Proceedings.* 1990; 22, Nº3: 1104-1108.
- WENK M., FOLLATH F., ABISH E.: Temperature dependency of apparent cyclosporine A concentration in plasma.(letter). *Clin. Chem.* 1983; 29: 1865.
- WHISLER RL., LINDSEY JA., PROCTOR KVV., NOBUHIRO M., CORNWELL DG.: Characteristics of cyclosporine induction of increased prostaglandin levels from human peripheral blood monocytes. *Transplantation.* 1984; 38: 377-381.
- WILLERHAUSEN B.: Investigaciones en cultivos celulares sobre una hiperplasia gingival inducida por CsA. *Quintessence.* 1989; 2: 18-21
- WONG R., GUTOWSKI J., KATZ M., GOLDFARB R. et al.: Induction of DNA synthesis in isolated nuclei by cytoplasmic factors: inhibition by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 241-245.
- WONIGEIT K., BROLSCH C., NEUHANS P. et al.: Special aspects of immunosuppression with cyclosporine in liver transplantation. CsA biological activity and clinical applications. In Kahan (Ed.). Grune & Stratton. Orlando. Florida. 1984; pp: 370-375.
- WOOD A.J.: Calcium antagonist. Pharmacologic differences and similarities. *Circulation.* 1989; 80: 184-188.
- WOOD A.J. & LEMAIRE M.: Pharmacologic aspects of cyclosporine therapy: Pharmacokinetics. *Transplant. Proc.* 1985; 17, suppl. 1: 27-32.
- WOOD A.J., MAURER G., NIEDERBERGER W., BEVERIDGE T.: Cyclosporine: Pharmacokinetic, metabolism and drug interactions. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2409-2412.
- WYSOCKY G.P., GRETZINGER H.A., LAUPACIS A. et al.: Fibrosus hyperplasia of the gingiva: a side effect of CsA therapy. *Oral. Surg.* 1983; 55: 274-278.

YEE GC., KENNEDY MS., GELF SG., et al.: Pharmacodynamics of cyclosporine in patients undergoing bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* 1986; Vol XVIII, No 4: 774-776.

YEE GC., ROSANO T., PTACHCINSKI R.: Pharmacology: Profiles, parameters, interpretations, and drug interactions. *Trasplant Proc.* 1988; Vol XX, No 2: 715-721.

YOSHIMURA N. & KAHAN BD.: Pharmacodynamic assesment of the in vivo cyclosporine effect on interleukin-2 production by lymphocytes in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1985; 40: 661-666.

YOSHIMURA N., OKA T., CLARK S.C., KAHAN B.D.: The inhibition of interleukin 2 ( IL-2 ) gene expression at the level of messenger RNA by in vivo cyclosporin treatment. 1987;

ZARRANZ J.J.: *Epilepsia. M.T.A. Medicina interna.* 1985; 3: 165-225.

ZEEVI A., EIRAS G., BUREKART G. et al.: Immunosuppressive effect of cyclosporine metabolites from human bile on alloreactive T-cells. *Transplant. Proc.* 1988; 20: 115-121.

ZWITTER M., DRINOVEC J., DUBRAVCIC M. et al.: Cyclosporine may alleviate B syptoms and induce a remission of heavily pretreated Hodgkin's disease: a preliminary report. *Ann. Internal. medicine.* 1987; 106: 843.