

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA  
CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CICLOSPORINA-A EN  
UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFRITIS TÚBULOINTERSTICIAL AUTOINMUNE

---

Antonio José Giménez Pizarro

GRANADA, 1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 19 88 a 19 89

Folio 62 vs

Número 125

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Antonio Gimenez Pizarro, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "Análisis de la respuesta al tratamiento con Diclofenaco-A en un modelo experimental de nefritis tubulointersticial autoinmune."

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de APTO CON LAUDE

Granada 22 de Septiembre de 19 89

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

Fdo.: David Aguilar Peña

Fdo.: RAMONDO G. DEL MORAL

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

Fdo.: J de la Higuera T.P.

Fdo.: FABIAN PARRA

Fdo.: A. BARAT

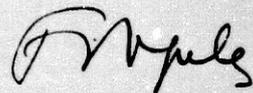
FIRMA DEL GRADUANDO.

*[Faint handwritten signature]*

PROF. D. FRANCISCO NOGALES FERNANDEZ, CATEDRATICO DE ANATOMIA  
PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior  
juicio del tribunal que designe la Facultad de  
Medicina de la Universidad de Granada, D. Antonio  
J. Giménez Pizarro, sobre el tema: "ANALISIS  
DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CICLOSPORINA-A  
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEFRITIS TUBULOINTERSTI-  
CIAL AUTOINMUNE", ha sido realizada bajo mi dirección  
y la del Dr. D. Francisco Mampaso, durante los  
años mil novecientos ochenta y tres a mil novecientos  
ochenta y nueve, en el Servicio de Anatomía Patológica  
del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Y para que conste, firmo la presente certificación, en Granada,  
a tres de junio de mil novecientos ochenta y nueve.



Fdo.: F. Nogales Fernández

A ella.

A ellos.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. D. Francisco Mampaso Martín-Buitrago, que además de coodirector de esta tesis ha sido y es sobre todo un amigo, que ha sabido siempre apoyarme a nivel humano y científico.
  
- Al Servicio de Anatomía Patológica y en especial a la Sección de Inmunopatología del Hospital Ramón y Cajal por su valiosísima colaboración técnica y a Celia Fierro por su inestimable ayuda.
  
- A Rosa Rodríguez Beltrán por su paciencia ya que sin ella no hubiera sido posible la publicación de este trabajo.
  
- Por último agradecer especialmente al Prof. D. Francisco Nogales Fernández por aceptar la dirección y facilitar la presentación de este trabajo.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	I
<b>1. <u>INTRODUCCION</u></b> .....	1
<b>1.1. CICLOSPORINA-A</b> .....	2
1.1.1. HISTORIA .....	4
1.1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES .....	7
1.1.3. FARMACOCINÉTICA .....	12
1.1.4. TOXICIDAD .....	13
1.1.4.1. Nefrotoxicidad .....	14
1.1.4.2. Hepatotoxicidad .....	20
1.1.5. EMPLEO CLÍNICO DE LA CICLOSPORINA .....	23
1.1.5.1. Trasplante de órganos .....	23
1.1.5.2. Enfermedades autoinmunes .....	27
1.1.5.2.1. Modelos experimentales .....	27
1.1.5.2.2. Uso clínico .....	34
<b>1.2. NEFRITIS TÚBULOINTERSTICIAL AUTOINMUNE</b> .....	38
<b>2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b> .....	58

	Págs.
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	61
<b>3.1. MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	62
3.1.1. ANIMALES .....	62
3.1.2. PREPARACION DEL Ag .....	62
<b>3.1.2.1. Antígeno crudo o particulado</b> .....	62
<b>3.1.2.2. Antígeno soluble</b> .....	63
3.1.3. INMUNIZACIÓN .....	64
3.1.4. ADMINISTRACIÓN DE CICLOSPORINA .....	64
<b>3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL</b> .....	65
3.2.1. GRUPOS EXPERIMENTALES .....	65
3.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO .....	68
3.2.3. ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-MBT .....	70
<b>4. <u>RESULTADOS</u></b> .....	73
<b>5. <u>DISCUSION</u></b> .....	98
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	116
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	120

**ABREVIATURAS**

BN:	Brown Norway.
BOV:	Bovina.
CMH:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
CSA:	Ciclosporina A.
ConA:	Concanavalina A.
EAE:	Encefalomiелitis Alérgica Experimental.
Fc:	Fracción Cristalizable.
FRG:	Filtrado Renal Glomerular.
HLA:	CMH humano.
IL-1:	Interleukina 1.
IL-2:	Interleukina 2.
MBG:	Membrana Basal Glomerular.
MBR:	Membranas Basales Renales.
MBT:	Membrana Basal Tubular.
NTI:	Nefritis Túbulointersticial.
NTIA:	Nefritis Túbulointersticial Autoinmune.

1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. CICLOSPORINA-A (CSA)

La evolución en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, como expresión de una modificación de la respuesta inmune, ha sido paralela a la problemática planteada por los trasplantes, en base a la indispensable modificación de esa respuesta inmune para evitar el mayor de sus problemas: el rechazo. En efecto, la mayoría de los problemas quirúrgicos en el trasplante de órganos ha sido solventado y en la actualidad todos los esfuerzos van encaminados a producir una inmunosupresión lo más selectiva posible. Así, la inmunosupresión introducida a finales de los años 50 y durante los años 60 actuaba indiscriminadamente, bloqueando y dañando a la totalidad de las células que se encontraban en mitosis, incluyendo a las células normalmente funcionantes y que son particularmente importantes en la supervivencia del organismo. De este modo, aún cuando se consiguieron mayores supervivencias del trasplante con el uso de estas drogas, al interferir inespecíficamente con la respuesta inmune, los efectos tóxicos y colaterales eran tan

severos que sus resultados totales no fueron considerados muy satisfactorios. Así, el mayor problema planteado por el uso de corticoides y drogas citotóxicas era el alto riesgo de infecciones, que en muchos de los casos eran debidas a microorganismos que normalmente no eran patógenos. Se concluyó que el concepto de interferencia en varios niveles del sistema inmune (represión de la formación de células precursoras, destrucción o bloqueo de células inmunocompetentes, supresión de la proliferación y diferenciación de linfocitos y monocitos por inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas) era correcto.

Sin embargo, el uso de drogas no específicas, es decir, drogas cuya acción no estaba limitada a células inmunocompetentes, era una aproximación errónea.

El siguiente paso, fue por tanto, el desarrollo de drogas linfocitotóxicas o procedimientos que fueran fundamentalmente encaminados a la eliminación de células inmunocompetentes. Este objetivo podía ser alcanzado por el uso de la irradiación linfoide total, canulación del conducto torácico, globulina antilinfocitaria, L-Asparaginasa y esteroides.

El estadio actual, o tercer paso, es el de la Inmunofarmacología. Este estadio está caracterizado por una inmunoregulación selectiva, usando compuestos y métodos que específicamente modulan subpoblaciones definidas de células inmunocompetentes. La inmunofarmacología cuenta con nuevas vías hacia el desarrollo de agentes con acción selectiva sobre la adquisición de falta de respuesta inmunológica, reconocimiento de estímulos inmunológicos por células receptoras, inducción de diferenciación y maduración de linfocitos, interacciones celulares y modulación de funciones efectoras. La Ciclosporina (CSA) emerge como la primera droga que cumple totalmente estos requerimientos en alguna extensión, suponiendo su aparición un impacto en la Inmunología. (Borel, 1983).

#### 1.1.1. HISTORIA

En 1969-70 B. Thiele en el Departamento de Microbiología de Sandoz Ltda. en Basilea aisla dos nuevas cepas de hongos obtenidas de muestras procedentes de Wisconsin (Estados Unidos) y Hardamger Vidde (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 **Tolyocladium Inflatum Gams**. Ambos hongos sintetizan Ciclosporinas, pero dado que únicamente esta última cepa crece en cultivos sumergidos, es la que se utiliza para la producción a gran escala de Ciclosporina por fermentación. Las ciclosporinas no son liberadas en el medio de cultivo, sino que tienen que ser extraídas de los micelios. Del extracto crudo original se aisló una mezcla de metabolitos en una escala micropreparatoria caracterizándose químicamente como nuevos polipéptidos neutros. El procedimiento de fermentación se optimizó y amplió, aislándose en 1971 por Haerr y Rüegger una mezcla de dos componentes denominada 24-556.

El extracto fúngico había demostrado tener un espectro limitado de actividad antifúngica, por ejemplo contra **Aspergillus Niger** y **Neurospora Crassa**. Posteriormente se comprobó una actividad fungistática marginal in vivo, en especial contra organismos clínicamente irrelevantes, mostrando, sin embargo, que esta actividad estaba asociada a una baja toxicidad poco habitual. Esta fue la razón que

indujo a evaluar la mezcla de metabolitos 24-556 en un programa de "screening" farmacológico por Borel en 1972. Una de las pruebas de este sistema fue un modelo animal (ratón) desarrollado por H. Stähelin y S. Lazary en el que la inhibición de la formación de hemaglutinina contra eritrocitos de carnero y el tiempo de supervivencia posterior a la inoculación de líneas celulares de leucemia murina (LI 210) podían evaluarse en los mismos animales. Los resultados obtenidos mostraban una actividad inmunosupresora muy importante (Índice Supresor  $\gt$  0,1) pero sin que el compuesto tuviera efecto sobre las áreas de células tumorales de ratón en cultivo celular, no incrementándose el tiempo de supervivencia de los ratones leucémicos, lo que indicaba que la inmunosupresión no estaba vinculada a la actividad citostática general.

En 1973 Rüegger consigue la purificación de la CSA de la mezcla de metabolitos 24-566, que también contenía ciclosporina B y Dreyfuss et al., 1976, mejoran substancialmente las condiciones de cultivo para producir metabolitos, permitiendo en 1974 iniciar los trabajos farmacológicos utilizando CSA pura.

En 1975 Petcher et al., dilucidan la estructura de la CSA por

degradación química y análisis por difracción de Rayos X. Finalmente en 1980 se sintetiza por Wenger la molécula completa (Borel, 1983).

#### 1.1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICAS

La CSA es un péptido cíclico, hidrofóbico, neutro, compuesto por once residuos aminoácidos que tienen una configuración S característica de los L-aminoácidos naturales, excepto para la D-Alanina en posición 8, la cual tiene una configuración D, y una Sarcosina en posición 3. Siete de los aminoácidos son N-metilados (Fig. 1). Diez de los aminoácidos son aminoácidos alifáticos conocidos:

- Acido  $\alpha$ -Aminobutírico en posición 2
- Sarcosina en posición 3
- N-Metil-Leucina en posición 4, 6, 9 y 10
- Valina en posición 5
- Alanina en posición 7
- D-Alanina en posición 8



- N-Metil-Valina en posición 11.

Uno de los aminoácidos era desconocido hasta ese momento. Este aminoácido situado en posición 1, conocido como "Aminoácido C-9", estaba constituido por 9 átomos de carbono, no habiendo sido previamente aislado o conocido en forma libre. Solamente se consiguió por Ruegger et al., 1976 el aislamiento de artefactos y derivados en que pudiese obtenerse este aminoácido N-Metil C-9 en forma libre.

El tratamiento ácido de la CSA en ausencia de agua y nitrógeno da como resultado la aparición de Isociclosporina la cual por medio de la técnica de degradación de Edman modificada por el uso de Metilisotiocianato, produce un derivado Anhidrometil-tiohidantoinico del Aminoácido N-Metil C-9 insoluble, estableciéndose que el aminoácido C-9 es el primer aminoácido de la secuencia (Wenger, 1983).

A partir del análisis por Rayos X quedó establecido que la molécula de CSA se compone de dos partes diferentes. Una de ellas

presenta una conformación en lámina plegada  $\beta$  antiparalela, de residuos 1-6 y la otra en bucle abierto de residuos 7 y 11 (Wenger, 1982).

La lámina  $\beta$  está mantenida por las siguientes uniones hidrógeno:

- NH del Acido Gammaaminobutírico al C=O de Valina 5.
- NH de la Valina-5 al C=O de Acido Aminobutírico.
- NH de Alanina al C=O de Me-Valina 11.

La restante unión hidrógeno, se sitúa desde el NH de D-Alanina-8 hasta el C=O de Metil-Leucina-6.

Estos enlaces hidrógeno contribuyen significativamente a dar rigidez al esqueleto de la ciclosporina.

Después de la síntesis total de la CSA, la sustitución de varios residuos aminoácidos reveló que el lugar activo de la molécula parecía corresponder al aminoácido C-9. Así, la remoción de la parte no polar de la cadena lateral, como en la Ciclosporina Me Thr<sup>1</sup>, reduce la actividad inmunosupresora dramáticamente; y del

mismo modo la modificación del grupo hidroxilo, en la O-Acetil Ciclosporina y Desoxi-Ciclosporina. El doble enlace contribuye a la actividad biológica dado que los dihidro compuestos son generalmente menos potentes.

El aminoácido 2 permite algunas variaciones con cadena alquil de 2-3 carbonos.

Aunque la Treonin-2 Ciclosporina es un potente inmunosupresor, la Serin-2-Ciclosporina es significativamente menos activa, sugiriendo que las interacciones hidrofóbicas son más importantes para la interacción de la cadena alifática del aminoácido 2 con el receptor, y que el grupo OH de la Treonin-2 Ciclosporina no está involucrado en ninguna función especial de transporte.

La pérdida de actividad observada con la Ciclosporina D-Metil-Vallina<sup>11</sup>, un derivado en el cual la conformación del anillo peptídico en esta posición es ciertamente diferente del de la Ciclosporina, también confirma que la cadena carbonada del aminoácido 11 es importante para su actividad biológica.

En resumen, podría suponer que la cadena Me Bmt está íntimamente

involucrada en la acción biológica de la molécula de CSA, pero que sola no es suficiente para su acción inmunosupresora estando esta actividad biológica asociada con una porción mayor de la estructura de la Ciclosporina, incluyendo ésta probablemente a los aminoácidos 1, 2, 3 y 11 (Wenger, 1983).

#### 1.1.3. FARMACOCINETICA

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la CSA, 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, 1986).

El pico de su concentración en sangre se produce a las 3-4 horas de su administración por vía oral. En sangre, aproximadamente el 50 % de la droga está asociada con eritrocitos y el 10-20 % con leucocitos. Del 30-40 % restante en plasma, el 90 % está ligado a lipoproteínas, siendo escasa la fracción ligada a otras proteínas

séricas. Debido a su alta solubilidad en lípidos, la CSA está extensamente distribuida en tejidos extravasculares, revelando la administración de Ciclosporina-H<sup>3</sup> (tritiada) a ratas, unas concentraciones mayores en hígado, riñón, suprarrenales, páncreas, timo, tiroides y grasa perirrenal (Atkinson et al., 1983; Ried et al., 1983).

Aproximadamente el 70 % de la dosis de CSA administrada parece ser que se metaboliza en el hígado, habiéndose identificado aproximadamente 17 metabolitos generados por el sistema oxidasa P<sub>450</sub> así como también por N-Demetilación de la droga nativa (Rogers, Kahan, 1984).

La vía más importante de eliminación de la CSA es por excreción biliar, siendo solamente un 6 % eliminado por orina, una parte de la cual es ciclosporina no metabolizada (Wood et al., 1983).

#### 1.1.4. TOXICIDAD

El uso de CSA produce una serie de efectos secundarios que deben ser detectados y controlados en orden a permitir una utilización

óptima de la droga. Entre estos efectos adversos los que mayor trascendencia plantean son los de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad.

#### 1.1.4.1. Nefrotoxicidad

Los estudios de Calne et al., 1978; Calne et al., 1979, documentaron la existencia de anuria primaria y secundaria en trasplantados renales tratados con CSA, probablemente en relación a las dosis empleadas, muy superiores a las que actualmente se administran. Este problema quedó magnificado por los estudios de la Universidad de Minnesota (Ferguson et al., 1982), los cuales encontraban en el 85 % de los enfermos tratados con CSA al menos un episodio de elevación de la creatinina sérica.

La nefrotoxicidad de la CSA se expresa clínicamente por una elevación de nitrógeno uréico sanguíneo (BUN) y de la creatina (Kobrenski, 1983). Hows et al., 1983 encontraron en pacientes trasplantados con médula ósea y tratados con CSA la presencia de una nefrotoxicidad precoz caracterizada por un incremento modera-

do de la creatinina plasmática, siendo menos frecuente el desarrollo de una nefrotoxicidad severa. Desde el punto de vista clínico esta situación venía caracterizada por retención de fluidos, hipertensión, edema periorbitario y periférico, y raramente por un fallo oligúrico agudo. Entre los factores de riesgo que incidían en una mayor nefrotoxicidad, estos autores incluían: la presencia de niveles altos de CSA ( $> 500$  ng/ml), el uso de drogas nefrotóxicas y la presencia de hiperbilirrubinemia.

También podía encontrarse una nefrotoxicidad tardía (después de la 4ª semana) que estaba en menor relación con el uso de drogas nefrotóxicas. En estos casos la nefrotoxicidad era de grado medio, aunque aparecían hipertensión y cambios microangiopáticos similares a los del Síndrome Hemolítico Urémico.

En todos los casos en los que se apreciaba un empeoramiento de la función renal, la disminución de la dosis de CSA suponía una recuperación de la misma (Klintmalm et al., 1983; Hows et al., 1983).

Con la administración de CSA también pueden apreciarse anormali-

dades en los electrolitos séricos. Así, puede aparecer una hiperkalemia (Foley et al., 1983; Tonnesen et al., 1983) siendo ésta de tal magnitud que requiere tratamiento en el 25 % de los casos (Murray, 1986). Este aumento en la tasa de potasio se instaure de un modo precoz tras el tratamiento, no estando asociado con una severa limitación del aclaramiento, pudiendo aparecer en pacientes con un aclaramiento excelente.

Así mismo, se encuentra una disminución en la fracción de excreción de sodio (Tonnesen et al., 1983), pudiendo ser utilizado este dato según algunos autores (Morales et al., 1987) como índice de nefrotoxicidad de CSA en trasplantados renales.

La aparición de nefrotoxicidad en trasplantados renales tratados con CSA tiene el interés adicional en base a establecer el diagnóstico diferencial entre la aparición de una posible nefrotoxicidad y/o la aparición de fenómenos de rechazo. Klintmalm et al., 1983, sugieren que existen algunos datos clínicos que podrían aproximar el diagnóstico de rechazo con mayor probabilidad. Para ello se basaron en el estudio de biopsias renales de enfermos trasplantados y tratados con CSA, considerando que existía

nefrototoxicidad en enfermos con biopsia renal normal y función renal alterada. Entre estos datos clínicos se encuentran: reducción de la diuresis, incremento de peso, incremento de la temperatura corporal y un aumento rápido de la tasa de creatinina sérica. En la insuficiencia renal vista en pacientes tratados con CSA como consecuencia de la nefrototoxicidad de ésta, se asiste a un aumento de la tasa de creatinina de un modo más lento y casi siempre asociado a elevadas concentraciones de CSA.

En relación a la patogénesis de esta nefrototoxicidad han sido diversas las teorías expuestas. Así para Diprerink et al., 1983, en un modelo experimental en ratas, el mecanismo de acción estaría a nivel glomerular, más que tubular, en base a que la CSA produciría una reducción en la presión de filtrado, a través de su acción sobre la presión de filtración o sobre el coeficiente de filtración. Desde el punto de vista morfológico estos autores no encontraban datos concluyentes, ya que existía vacuolización tanto en túbulo proximal como en distal en animales tratados con CSA como en animales controles sin tratamiento.

Por el contrario Devineni et al., 1983, en estudios realizados en

perros abogan por la producción de un daño tubular agudo, encontrando alteraciones sobre todo a nivel del túbulo contorneado proximal, mostrando éste tumefacción de células epiteliales, degeneración hidrópica y necrosis, sin que a nivel glomerular se pudieran encontrar alteraciones.

Tonnesen et al., 1983, en un estudio experimental en ratas, centran su atención en la excreción renal de fosfato cuya reabsorción se realiza en el túbulo contorneado proximal, observando que esta excreción fraccional estaba más baja en los animales tratados con CSA comparado con los animales controles, y sugiriendo que la CSA, directa o indirectamente, incide en el índice de reabsorción del filtrado en la porción proximal de la nefrona y limita la "entrega" distal del filtrado.

Desde el punto de vista morfológico, los posibles cambios renales inducidos por la CSA presentan el interés práctico inmediato de la teórica diferenciación del daño producido como consecuencia directa de la acción tóxica de la droga, de aquellos cambios producidos por posibles y/o concomitantes fenómenos de rechazo.

Así Von Willebrand y Häyry, 1983, demostraron la presencia de depósitos de CSA, mediante inmunofluorescencia directa y técnica de peroxidasa-antiperoxidasa, en células parenquimatosas renales del material obtenido por punción aspirado en pacientes con signos clínicos de nefrotoxicidad. Estos depósitos no condicionaban ninguna reacción inflamatoria acompañante de forma, que de aparecer ésta, sugeriría más un proceso de rechazo que de toxicidad inducida por la CSA.

Mihatsh et al. 1983, describen una serie de cambios morfológicos en pacientes tratados con CSA a nivel renal, dándole gran importancia a la presencia de vacuolización tubular isométrica y a la presencia de megamitocondrias, indicando una mayor susceptibilidad al daño renal asociado con la CSA, la presencia de factores asociados tales como existencia de rechazo, vasculopatía de cualquier tipo, fallo renal, etc. Estos autores también dan importancia a la presencia de fibrosis difusa, no focal. También describen la denominada arteriopatía asociada a CSA, definiendo a ésta como una lesión vascular limitada a arteriolas y arterias más pequeñas y caracterizadas por hialinosis severa, necrosis o

engrosamiento mucoso de la íntima como se observa en el Síndrome Hemolítico Urémico. Estos autores sugieren que estas lesiones vasculares podrían desarrollarse a través de un cúmulo de factores como hipertensión transitoria, alteraciones latentes del sistema de coagulación y otros como irradiación, interacción de drogas e infecciones.

Sibley et al., 1983, valoran la presencia de edema intersticial, glomerulitis (exudación de células mononucleares en los capilares glomerulares) y el índice de células inflamatorias en capilares peritubulares (I/C), demostrando la importancia de la vasculitis en predecir el rechazo agudo, y el índice  $I/C \leq 1:3$  en predecir la nefrotoxicidad por CSA. Cuando no se aprecia vasculitis y el índice  $I/C \leq 1:3$  no está presente en una biopsia, la combinación de presencia o no de edema, glomerulitis y un  $I/C \geq 1:3$  e  $I/C > 1:3$  pero  $< 3:1$  son altamente sugestivos de rechazo agudo o nefrotoxicidad por CSA.

#### 1.1.4.2 . Hepatotoxicidad

La hepatotoxicidad inducida por la CSA representa un problema de

menor entidad que la nefrotoxicidad inducida por esta droga. No obstante en un 20-40 % de pacientes tratados se asiste a una hiperbilirrubinemia como perturbación primaria. Otras alteraciones que pueden ser observadas son un aumento en los niveles de transaminasas así como una elevación de fosfatasa alcalina sérica (Klintmalm et al. 1981).

Rodger et al., 1983, comparan las alteraciones hepáticas en trasplantados renales tratados con CSA y trasplantados tratados con prednisolona y azatioprina, encontrando que una dosis inicial de 15 mg/kg/día de CSA conduce a una adecuada inmunosupresión sin marcada hepatotoxicidad, siendo las alteraciones hepáticas más frecuentes en el segundo grupo que en el de los enfermos tratados con CSA. No obstante, los niveles de bilirrubina, aunque en un rango normal, eran significativamente mayores en el grupo de enfermos tratados con CSA, sugiriendo una disfunción hepática subclínica asociada con la droga.

La naturaleza exacta de esta hepatotoxicidad no está bien definida sugiriéndose que los pacientes en situación de fracaso

renal y subsidiarios de trasplante, con frecuencia presentan alteraciones hepáticas previas, condicionadas por la hemodiálisis y transfusiones, tales como hepatitis víricas B y no-A no-B, sobrecargas de hierro, etc. Para obviar este problema, Schade et al., 1983, estudian la función hepática de enfermos trasplantados cardíacos y tratados con CSA, notando elevaciones de la bilirrubina sérica de un modo precoz tras el trasplante y manteniéndose elevada durante un largo período de tiempo.

El incremento de bilirrubina era predominantemente a expensas de la fracción directa. Curiosamente los niveles de SGOT no se encontraban alterados mientras que sí existía un incremento de los niveles de SGPT cuando se comparaban con los que existían antes del trasplante. La fosfatasa alcalina se encontraba dentro de los límites de la normalidad. A pesar de la ausencia de incrementos significativos en los niveles enzimáticos había una profunda colestasis. La elevación de coliglicina y sulfolitocoliglicina indicaban una modificación en el metabolismo del hepatocito que iba más allá de la mera alteración en la excreción de bilirrubina.

#### 1.1.5. EMPLEO CLINICO DE LA CSA

La inclusión de la CSA en el arsenal terapéutico ha impuesto su utilización con mayor o menor éxito en dos campos: trasplante de órganos y enfermedades de base autoinmune.

##### 1.1.5.1. Trasplante de órganos

Desde el ensayo clínico inicial de Calne et al., en 1977, utilizando la CSA para tratar receptores de trasplantes renales, el número de trasplantados que se han beneficiado con el empleo de esta droga como terapia inmunosupresora inicial se ha incrementado rápidamente (Calne et al., 1981) mostrando los distintos estudios una supervivencia del trasplante al año que oscilaba entre un 72 y 90 % (Canadian Study Group, 1983; European Group, 1983; Flechner et al., 1983; Starzl et al., 1983).

La utilización de la CSA en trasplantados renales ha supuesto también una expansión en cuanto a la población susceptible de ser trasplantada, obviando problemas del tipo de pobre compatibilidad HLA, niveles altos de anticuerpos reactivos, edad e historia

positiva para reactividad cruzada (Canadian Study Group, 1983; European Group, 1983; Merion et al., 1984).

La relación de las transfusiones sanguíneas con el pronóstico de trasplantados renales parece menos clara (Van Buren et al., 1984), por más que algunos estudios (Opelz, 1985) revelan una mayor supervivencia del trasplante en pacientes transfundidos y tratados con CSA.

Un problema similar tampoco resuelto es aquel del desarrollo de una necrosis tubular aguda en trasplantados renales tratados con CSA. Calne et al., 1979, observaron que la CSA prolongaba el tiempo de recuperación de la injuria isquémica siendo, así mismo, peor la supervivencia del riñón trasplantado cuando se comparaba con pacientes que habían recibido terapia inmunosupresora convencional (Canadian Group, 1983). En base a esto Melzer et al., 1985, preconizó el empleo de globulina anti-timocítica, azatioprina y prednisona en aquellos pacientes que experimentaban una necrosis tubular aguda a continuación de ser trasplantados, para emplear CSA una vez que el enfermo entre en la fase diurética.

El empleo de la CSA también ha supuesto una mejoría en la tasa de

supervivencia de trasplantes hepáticos (Calne et al., 1979; Starzl et al., 1983) sin que existiesen cambios en los criterios de selección de pacientes, cuando se comparaban con pacientes tratados con inmunosupresión convencional (Pichlmayr et al., 1983).

El mayor beneficio obtenido con el empleo de CSA en trasplante de médula ósea ha sido en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huesped aguda establecida (Powles et al., 1978; Tutschka et al., 1981). Sin embargo el empleo de la droga como profilaxis de esta patología no parece rendir la misma efectividad (Speck et al., 1983; Storb et al., 1983; Tutschka et al., 1981). Tampoco la CSA se ha mostrado eficaz en el control de la neumonitis intersticial que puede desarrollarse en enfermos trasplantados con médula ósea, situación que supone un problema grave y cuya patogenesis permanece oscura (Storb et al., 1983), superponiéndose el hecho observado por Barret et al., 1982 y Powles et al., 1983, de que se producía un daño epitelial y endotelial a nivel pulmonar en pacientes tratados con CSA sin que se pudiese, no obstante, establecer indefectiblemente una relación causal entre los dos hechos.

En el trasplante cardíaco el empleo de CSA también ha supuesto una mejoría de los índices de supervivencia (Oyer et al., 1983; Hardesty et al., 1983; Wallwork et al., 1983). Aunque la incidencia de rechazo fue algo mas baja entre los pacientes tratados con CSA, esta diferencia no representa significación estadística (Oyer et al., 1983; Hunt, 1983). Sin embargo, la presentación clínica y el estudio biopsico en estas situaciones era diferente en enfermos tratados con CSA, mostrando un curso silente sin presencia de signos electrocardiográficos ni fallo cardíaco congestivo precoz, siendo la biopsia endomiocárdica el único método disponible para diagnosticar estas situaciones de rechazo (Oyer et al., 1983; Hunt, 1983), aunque sin que se observe una correlación clínico patológica, de forma que pueden observarse rechazos histológicamente severos sin que se correspondan con una disfunción cardíaca grave desde el punto de vista clínico.

Los casos de trasplantes pancreáticos tratados con CSA no han mostrado una supervivencia del injerto mayor que la obtenida por métodos convencionales, aunque la proporción de injertos funcio-

antes fue algo mayor en los enfermos tratados con CSA (Sutherland, 1983; Sutherland et al., 1983).

#### 1.1.5.2. Enfermedades autoinmunes

Después del uso con éxito de la CSA en trasplantes de órganos, el paso siguiente, y por otro lado lógico, fue la utilización de esta droga en enfermedades de base autoinmune. En este campo el progreso ha sido más lento, en parte justificado por la presencia de respuestas imprevistas en casos individuales y a las pequeñas series de pacientes con enfermedades autoinmunes diferentes.

##### 1.1.5.2.1. Modelos experimentales

El empleo de CSA en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes ha revelado resultados esperanzadores. Así, en 1982 Bolton et al., estudian el efecto de la droga en la Encefalomielite Alergica Experimental (EAE) en ratas Lewis, evitando el desarrollo de la enfermedad cuando las células esplénicas de animales enfermos, que transfieren la enfermedad, eran cultivadas

conjuntamente con CSA. De igual forma los animales transferidos y tratados con CSA desarrollaban signos clínicos moderados y solamente después de la retirada de la droga, desapareciendo totalmente si la dosis de CSA era aumentada. Tampoco se desarrollaba la enfermedad al transferir a ratas sanas células esplénicas de ratas inmunizadas y tratadas con CSA.

En 1983 Heinrichs et al., estudian el efecto de la CSA sobre el desarrollo de EAE en ratas Lewis, observando que la CSA inhibía el desarrollo de la enfermedad en animales inmunizados activamente. La transferencia pasiva por medio de células esplénicas no era afectada con el empleo de la droga, mientras que sí quedaba inhibido el desarrollo de células activas transferentes "in vivo" e "in vitro". aunque requería la presencia de CSA durante el estadio inicial de la respuesta celular ya que si la CSA era añadida 24 horas después que se añadiese Con A a cultivos celulares esplénicos, la transferencia de estas células sí producía la enfermedad. De modo similar, animales tratados con CSA desde el momento de la inmunización no desarrollaban células capaces de transferir la enfermedad. Pero si el tratamiento se

retrasaba hasta el día 2 ó 4 postinmunización, los animales desarrollaban células capaces de transferir algunos signos clínicos de EAE.

Estos autores concluían que la CSA podría inhibir el desarrollo de células efectoras "in vivo", mientras que las células sensibilizadas por el inmunógeno, que son detenidas en su desarrollo por la CSA "in vivo", pueden desarrollar una célula efectora "in vitro" cuando son estimuladas en ausencia de CSA. Esto parecía indicar una aparente necesidad de estimulación por Interleucina-2 (IL-2), dado que el desarrollo de células activas de transferentes podía ser bloqueado por CSA, y ésta actuaría como un inhibidor de la comunicación celular mediada por IL-2.

El 1985 Drachman et al., utilizan CSA como tratamiento de la Miastenia Gravis Experimental en ratas Lewis, donde la droga se mostró eficaz en la supresión de la respuesta humoral, respuesta secundaria y desarrollo de la enfermedad al administrarla en el momento de la inmunización.

En 1985 Tipping y Holdsworth estudian el efecto de la CSA en un

modelo de glomerulonefritis experimental en ratas Sprague-Dawley, desarrollando una glomerulonefritis activa tras la inyección intravenosa de globulina anti-membrana basal glomerular producida en oveja, a ratas preinmunizadas. Después de cinco días, se apreciaba una glomerulonefritis proliferativa difusa con depósitos lineales de IgG de rata en el glomérulo y proteinuria. El tratamiento con CSA iniciado antes de la preinmunización, significativamente atenuaba la lesión glomerular, reducía la proteinuria, prevenía el depósito lineal de IgG reduciendo los títulos séricos de anticuerpos anti-globulina de oveja. Si el tratamiento se iniciaba después de que la respuesta de anticuerpos estuviera establecida la producción de anticuerpos quedaba inalterada, así como el depósito glomerular de estos anticuerpos y el curso de la enfermedad.

El tratamiento con CSA no era efectivo cuando la glomerulonefritis se desarrollaba de modo pasivo, utilizando globulina de oveja anti-membrana basal glomerular de rata en ratas no inmunizadas. Estos autores concluían que la CSA era capaz de bloquear estas glomerulonefritis cuando la droga se administraba antes del

inicio de la enfermedad, previniendo así una respuesta de anticuerpos activa. Sin embargo la glomerulonefritis no sufría alteración cuando la respuesta humoral estaba ya establecida o cuando el daño glomerular se inducía pasivamente.

En 1986 Gunn y Ryffel demuestran en ratones hembras NZB/W la eficacia de la CSA en la glomerulonefritis que estos animales desarrollan espontáneamente a los 3-6 meses de edad, y que tiene unas características similares a la del Lupus Eritematoso Sistémico. Estos autores observan que el tratamiento con CSA no solo prevenía el desarrollo de la glomerulonefritis, sino que además hacía desaparecer la proteinuria una vez que la enfermedad estaba establecida, y que, además, los depósitos glomerulares de IgG y  $C_3$  que aparecen en esta afección no se evidenciaban.

También en 1986, Baran et al. demuestran la utilidad de la CSA en un modelo experimental en ratas Brown Norway (BN) con glomerulonefritis autoinmune inducida por mercurio. En este modelo la CSA a dosis de 7 mg/kg/día y 10 mg/kg/día impedía el desarrollo de alteraciones inmunológicas y renales. La supresión era eviden-

te con dosis de 5 mg/kg/día pero no con la administración de la droga dos veces por semana. Cuando se administraba CSA 10 días después de iniciarse la administración de mercurio, las manifestaciones de la enfermedad desaparecían.

En 1987 Schirijver et al., estudian los mecanismos por los cuales el tratamiento con CSA inhibe la proteinuria en las glomerulonefritis. Para ello estudian un modelo pasivo de nefritis anti-membrana basal glomerular (MBG) en ratones C57/BL 10 administrándoles anticuerpos de conejo anti-MBG tras pretratamiento con CSA diariamente y durante 3 días. La CSA no modificaba la severidad de la glomerulonefritis inducida, pero sí reducía significativamente la proteinuria observándose una considerable disminución del filtrado renal glomerular así como una disminución de la permselectividad de la membrana basal glomerular.

En 1986, Thaiss et al., estudian la influencia de la CSA sobre el desarrollo del daño renal en glomerulonefritis por complejos inmunes "in situ" en ratas con riñones perfundidos con IgG humana cationizada e inyectada intravenosamente con IgG anti-humana

hecha en conejo, observando que la CSA no afectaba el influjo celular, debido principalmente a leucocitos polimorfonucleares y linfocitos, pero sí que la proteinuria era significativamente disminuída, indicando que las interacciones celulares necesarias para inducir daño en la membrana glomerular no tenían lugar en presencia de CSA. Estos datos parecían indicar que las células eran atraídas al glomerulo pero no eran activadas. La atracción de células podría ser debida a factores quimiotácticos tales como productos del complemento o interacción de la fracción  $F_c$  del anticuerpo con receptores para  $F_c$  de las células. La activación podría ser inhibida al disminuir la liberación de IL-1, IL-2 y por un incremento de la actividad celular supresora.

También en 1986, Neild et al., muestran el efecto que la CSA produce sobre la proteinuria en la Enfermedad del Suero Crónica producida en ratas Wistar. Estos autores encuentran que la proteinuria es inmediatamente suprimida por la CSA, al igual que ocurre en la forma aguda de esta enfermedad desarrollada en conejos (Neild et al., 1983) donde se aprecia además una inhibición de la proliferación glomerular. Estas dos circunstan-

cias son mediadas por monocitos y dado que la CSA no actúa sobre células de la serie monocito-macrofágicas sugieren que la injuria glomerular es mediada por linfocitos T.

#### 1.1.5.2.2. Uso clínico

Aunque las enfermedades autoinmunes pueden considerarse en conjunto como alteraciones en la regulación inmunológica, los mecanismos inmunopatológicos específicos pueden variar enormemente de una enfermedad a otra, y aún en la misma enfermedad puede existir un polimorfismo clínico e inmunológico (Talal, 1988), lo cual condiciona una interpretación cauta de los resultados obtenidos con el empleo de la CSA.

La CSA muestra una eficacia importante en el tratamiento de Psoriasis, Artritis Reumatoidea, Uveítis, Diabetes Mellitus Tipo I y Síndrome Nefrótico (Bach, 1988).

El empleo de la CSA en el psoriasis muestra una eficacia casi absoluta en su control, aún en aquellos casos que se muestran refractarios a otros tratamientos, con la ventaja adicional de

necesitar una dosis baja para obtener buenos resultados, aunque existen formas (Psoriasis en gotas activa) que exigen una mayor dosis de la droga (Ellis et al., 1986; Van Joost et al., 1988).

La Artritis Reumatoidea es también sensible a la acción de la CSA incluso en casos rebeldes al tratamiento convencional, mostrando una eficacia cercana al 50 % (Bach, 1988). El manejo de la droga es complicado debido a la interferencia provocada por agentes anti-inflamatorios no esteroideos que presumiblemente aumentan la nefrotoxicidad de la droga.

La Uveítis es otra enfermedad en la cual la CSA muestra un efecto terapéutico considerable (Nussenblatt et al., 1982), produciendo una disminución importante en pocos días o semanas a dosis del orden de 10 mg/kg/día. El efecto sobre la enfermedad de Behcet es de capital importancia y hace predecir que la CSA constituirá un tratamiento regular de esta patología (French-Constant et al., 1983).

La CSA modifica la historia natural de la Diabetes Mellitus tipo I insulino-dependiente, incrementando la duración y frecuencia de

las remisiones cuando se administra en el inicio del síndrome hiperglucémico (Feutren et al., 1986; Assan et al., 1985) sobre todo en niños.

El empleo de la CSA ha permitido también profundizar en la patogénesis de la enfermedad mostrando que los mecanismos inmunes de base celular juegan un papel más relevante en la destrucción de las células que los anticuerpos (Boitard et al., 1988)

El Síndrome Nefrotico Idiopático muestra una respuesta rápida de la CSA tanto en adultos como en niños (Meyrier et al., 1987; Niandet et al., 1987), siendo mayor su eficacia en aquellos casos con cambios mínimos que en aquellos que presentan esclerosis focal y en los casos sensibles a tratamiento esteroideo (Niandet et al., 1987; Brodehl et al., 1987).

En procesos como Enfermedad de Crohn, Lupus Eritematoso Sistémico, Miastenia Gravis, Cirrosis Biliar Primaria y Polimiositis, la CSA ha mostrado una eficacia que podría ser calificada como moderada (Bach, 1988).

Aunque las series de enfermos con Enfermedad de Crohn tratados

con CSA son cortas (Allison, Pounder, 1987; Allam et al., 1987) el empleo de la droga parece ser útil como fármaco alternativo en el tratamiento de la enfermedad, especialmente en aquellos pacientes con inflamación intestinal marcada que son resistentes o intolerantes a la terapia convencional.

La CSA ha sido empleada esporádicamente en el tratamiento del Lupus Eritematoso con resultados contradictorios con disminución de las artralgias en dos de cinco pacientes (Isenberg et al., 1981), e ineficacia en otros (Henle et al., 1986). También se ha observado una disminución en la sintomatología de polimiositis y dermatomiositis (Bendtzen et al., 1984).

La utilización de CSA en la Cirrosis Biliar Primaria no altera el curso clínico de la enfermedad en casos de estadios avanzados mientras que sí parece tener un efecto beneficioso en pacientes con enfermedad activa en estadios no terminales (Benkers, Scholm, 1987).

La CSA muestra una dudosa eficacia en enfermedades del tipo de la Granulomatosis de Wegener, Aplasia de serie roja y Fascitis

Eosinofílica mientras que su actividad es nula en Esclerosis Múltiple y Esclerosis Sistémica.

En resumen prodría decirse que el empleo de CSA debería efectuarse en pacientes seleccionados con evidencia clara de que existen mecanismos autoinmunes implicados en su patogenia.

Debido a las complicaciones que cualquier forma de inmunosupresión supone, la terapia con CSA debería reservarse para pacientes en quienes la inmunosupresión convencional previa ha sido ineficaz o mal tolerada y en aquellos en los que está indicada una inmunosupresión más agresiva. Igualmente el tratamiento con CSA debería ser administrado solamente a pacientes con signos de enfermedad activa o si son tratados en fase de remisión con evidencia de recaídas previas frecuentes.

#### **1.2. NEFRITIS TUBULOINTERSTICIAL AUTOINMUNE: (NTIA)**

La Nefritis Tubulointersticial Autoinmune (NTIA) representa un modelo experimental en el cual la respuesta inmune humoral supone un papel

central, con una contribución de la inmunidad de base celular peor definida.

El desarrollo de este modelo experimental tuvo su inicio en 1971 cuando Steblay y Rudofsky, 1971, describen el desarrollo de una NTI en cobayas inmunizadas con membranas basales tubulares (MBT) de riñones de conejos (90 % tubulares y 10 % glomerulares) en adyuvante completo de Freund. El estudio por inmunofluorescencia puso en evidencia la presencia de depósitos lineales de IgG a lo largo de las MBT en la mayor parte de los animales inmunizados, y en un tercio de éstos, aparecían además, depósitos en las membranas basales glomerulares (MBG).

La IgG eluída de los riñones de las cobayas se fijaba "in vitro" a MBT pero no a MBG, sugiriendo que los depósitos "in vivo" en esta última localización eran inespecíficos.

En 1973, Steblay y Rudofsky establecen el papel esencial que juega la inmunidad humoral en esta enfermedad inyectando suero de cobayas con NTI a animales sanos y logrando transferirla. La adsorción del suero de animales enfermos con homogeneizados completos de riñón de cobaya

sin MBG eliminaba la práctica totalidad de los anticuerpos anti-MBT incapacitándolo para producir la enfermedad.

Estos autores, así mismo, observaron que la aparición en el intersticio renal de macrófagos y células gigantes, que caracterizan el cuadro histológico de este proceso, ocurría con posterioridad al depósito de auto-anticuerpos.

En 1974, Lehman et al., utilizan cobayas inmunizadas con membranas basales renales (MBR) bovinas (BOV). El estudio por inmunofluorescencia directa evidenció, en todos los casos, depósitos lineales de IgG en MBT proximal y distal, apareciendo solamente en un 50 % depósitos en MBG. La IgG eluída del tejido renal reaccionaba con ambos tipos de MBR, aún cuando la actividad anti-MBG no era detectable a bajas concentraciones de IgG. Los estudios de inmunoadsorción con eluidos de tejido renal evidenciaron que un 75 % de la IgG reaccionaba con preparados de MB-BOV y que la totalidad de los anticuerpos reactivos se adherían a MBT, mientras que solo un 40 % lo hacían a MBG. Así mismo, se evidenció que las MBT mostraban antígenos comunes con las MBG.

Un segundo modelo de enfermedad anti-MBT fue desarrollado por

Sugisaky et al. en 1973, en ratas BN e híbridos de ratas Lewis y BN, inyectadas con una suspensión de riñones de ratas Sprague-Dawley en adyuvante completo de Freund, con vacuna de Bordetella Pertussis. En las 2 ó 3 semanas siguientes a la inmunización se observaron depósitos lineales de IgG y C<sub>3</sub> en las MBT de los túbulos contorneados proximales. También a partir de la tercera semana se iniciaba un infiltrado inflamatorio en torno a vasos peritubulares y alrededor de las MBT, constituido por leucocitos polimorfonucleares. En las fases finales de la enfermedad (9 semanas) el infiltrado intersticial estaba constituido por linfocitos, macrófagos y células gigantes multinucleadas. En las últimas semanas, el estudio con inmunofluorescencia mostraba los hallazgos característicos de la fase autóloga de una glomerulonefritis por complejos inmunes: depósitos granulares de IgG y C<sub>3</sub> en las MBG.

El estudio serológico mostró anticuerpos circulantes en los animales inmunizados, que igualmente se aislaron de los eluidos de riñones enfermos. Los anticuerpos reaccionaron "in vitro" con MBT de ratas BN y Lewis/BN pero no lo hicieron con ratas Lewis. La inyección de suero con anticuerpos anti-MBT a ratas sanas provocó lesiones similares.

En 1974, Lehman et al., desarrollan un tercer modelo de enfermedad, inmunizando ratas BN e híbridos de BN y Lewis con MBT-BOV en adyuvante completo de Freund. Histológicamente los riñones de las ratas inmunizadas mostraban lesiones similares a las encontradas por Sugisaky et al., con lesiones glomerulares mínimas y con presencia de depósitos inmunofluorescentes de IgG en MBT proximal, en el 10-20 % de los túbulos distales y, ocasionalmente, en la cápsula de Bowman. En suero y eluidos de tejido renal se detectaron anticuerpos anti-MBT pero no anticuerpos Anti-MBG.

Ninguna de las otras diez familias de ratas (F344, Auguost, Lewis, Wistar Furth, Max, AC1, Buffalo, Wistar, W/F ( $F_2$ ) y DA inmunizadas desarrollaron la enfermedad.

También en este mismo año Lehman et al., 1974, publican un estudio sobre los mecanismos de formación de anticuerpos anti-MBT en trasplantes renales. En este experimento, las ratas Lewis receptoras de riñones, desarrollaban una nefritis intersticial, con depósitos lineales de IgG y C3 en las MBT de los túbulos contorneados proximales. En los riñones nativos de los receptores no se encontraba Ig.

En contraste con las ratas Lewis, ratas BN receptoras de riñones de híbridos de Lewis/BN, no elaboraron anticuerpos anti-MBT. En base a estos hallazgos, los autores concluían que la formación de anticuerpos solo se producía cuando a través del trasplante se introducían antígenos ajenos a la MBT, siendo difícil de evaluar, no obstante, el significado patogénico de los anticuerpos anti-MBT.

Sin embargo, también en este año, el estudio de Abbas et al., 1974, parece sostener el papel lesional de los anticuerpos anti-MBT, ya que las ratas trasplantadas desarrollaban lesiones túbulointersticiales asociadas a anticuerpos anti-MBT pese a haberse suprimido el proceso de rechazo mediante inyección intravenosa de suero hiperinmune antidonante.

En 1975 y 1977, Rudofsky et al. publican dos trabajos analizando la participación del complemento en NTI en cobayas, asignándole un importante papel patogénico en base a la presencia habitual de depósitos lineales de C3 asociados a IgG en las MBT de los animales con NTI, así como por la inhibición de la transferencia pasiva de la enfermedad depleccionando de C3 el suero inmune. De igual forma la

presencia de C3 proactivador en las MBT indicaría una activación del complemento por la vía alternativa y explicaría el desarrollo de NTI en cobayas con déficit de C4, indistinguible de la observada en animales normales.

En 1976, Lehman y Wilson publican un trabajo tratando de esclarecer el papel patogénico de la inmunidad celular en este modelo de NTI. Para ello transfirieron linfocitos aislados, o en combinación con macrófagos peritoneales procedentes de ratas BN inmunizadas a ratas BN no inmunizadas.

La transferencia se efectuó directamente a nivel subcapsular renal, desarrollando lesiones mínimas y focales solamente aquellos animales que recibieron conjuntamente linfocitos y macrófagos. Estos resultados parecían indicar que las células sensibilizadas prestaban una mínima contribución a las lesiones renales en la NTI, correspondiendo a los anticuerpos el papel central.

En 1976, Hyman et al. analizan la influencia de factores genéticos en el desarrollo de esta enfermedad. Estos autores lograron inducir una NTI en cobayas de familias XIII y Hartley tras inmunización con MBT

de conejos en adyuvante completo de Freund. Por el contrario la inmunización a cobayas de la familia II no producía la enfermedad, pese a existir niveles de anticuerpos anti MBT y depósitos lineales de IgG en las MBT. Igualmente la transferencia pasiva de suero conteniendo anticuerpos anti-MBT no lograba inducir la enfermedad, aún cuando se observaban depósitos corticales de anticuerpos anti-MBT. En base a estos resultados los autores concluían que algún o algunos factores genéticos influenciaban la producción de anticuerpos anti-MBT autóloga, así como también que, tras el depósito de anticuerpos en las MBT, era necesaria la existencia de algún factor genético adicional o relacionado para lograr la expresión completa de la NTI, no siendo la presencia de anticuerpos anti-MBT depositados a nivel renal, suficiente para desarrollar la enfermedad.

También en ese mismo año, Van Zweiten et al., 1977, publican un trabajo centrándose en el papel que juegan la inmunidad humoral y celular en la patogenia de la NTI. Para ello desarrollaron la enfermedad en cobayas inmunizadas con MBT-BOV en adyuvante de Freund. La transferencia de suero de animales enfermos a animales sanos, mostró la presencia de depósitos de IgG a nivel glomerular a las 4

horas, pero a partir del tercer día se localizaban predominantemente en las MBT.

Los animales receptores de suero no mostraron acúmulos de leucocitos polimorfonucleares a nivel intersticial, incluso en fases tan tempranas como las primeras 4 y 24 horas postransferencia. Sin embargo, a partir del segundo día se evidenciaban pequeños acúmulos de células mononucleares acompañadas de ocasionales células gigantes y signos de alteración tubular. En los días siguientes, las lesiones iban aumentando su severidad y hacia el día 10 eran indistinguibles de las observadas los días 14 a 21 en los animales inmunizados.

El estudio con hematíes de carnero revestidos con anticuerpos anti-conejo, en cortes en congelación de riñón, correspondientes al día 14 de la enfermedad, mostró abundantes rosetas en torno a las células mononucleares, indicando que eran macrófagos. Los complejos de IgM con hematíes de carnero y complemento no reaccionaban evidenciándose la ausencia de linfocitos B.

Finalmente, la transferencia de linfocitos procedentes de ganglios de cobayas de la familia XIII inmunizados, a cobayas sanos de esta misma

familia, no lograba inducir la enfermedad.

Estos hallazgos se interpretaron en el sentido de que los anticuerpos anti-MBT eran los mediadores de la enfermedad renal sin que existiera participación de la inmunidad celular. Adicionalmente, estos anticuerpos ejercerían un influjo sobre las células mononucleares, sin un efecto similar sobre los leucocitos polimorfonucleares.

En 1976, Rudoksky y Pollara estudian el papel de la inmunidad celular en esta enfermedad. Estos autores logran prevenir el daño tubular inducido por la transferencia pasiva de anticuerpos anti-MBT a cobayas, mediante la irradiación de médula ósea de los animales receptores el día previo o post inyección de los anticuerpos. La transferencia a cobayas irradiados, e inmunizados pasivamente, de células procedentes de médula ósea de cobayas no irradiados, lograba restaurar la capacidad de desarrollar la enfermedad. Esto parecía indicar que las células mononucleares originadas en médula ósea eran atraídas al intersticio renal.

Entre 1979 y 1981, Neilson y Phillips publican cuatro trabajos bajo el título común de: "Inmunidad celular en la nefritis intersticial".

En el primero (Neilson y Phillips, 1979) de estos trabajos se pone de manifiesto que, a partir del día 7 postinmunización los linfocitos de cobayas con NTI presentan una subpoblación de linfocitos T sensibilizados frente a los antígenos de MBT, probablemente con función cooperadora y previamente a la existencia de anticuerpos anti-tubulares. La reactividad de estos linfocitos T entre los días 7 y 11 coincidía con el comienzo de una marcada supresión policlonal, mediada por otra subpoblación T que probablemente ejercía una función moduladora.

En el segundo de los trabajos (Neilson, Phillips, 1979) estudian selectivamente la circulación de los linfocitos sensibilizados, evidenciando la existencia de linfocitos con funciones efectoras entre los días 12 y 17 postinmunización, participando en el desarrollo de las lesiones intersticiales de las cobayas inmunizadas con antígenos tubulares renales. Existiría, por tanto, un efecto combinado de anticuerpos anti-MBT, vía alternativa del complemento y linfocitos T con potencial efector.

En el tercer trabajo, (Neilson et al., 1980), estos autores analizan el efecto de los linfocitos T sobre la fibrosis intersticial y la

síntesis de colágeno observadas en los riñones de cobayas inmunizadas con MBT-bovina, encontrando en los cultivos de linfocitos T de animales enfermos una ausencia de inhibidor de fibroblastos y de la síntesis de colágeno. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad se detectaba a niveles bajos un inhibidor de la proliferación, sugiriendo que el estímulo para la fibrogénesis podría ser la presencia "in situ" de linfocitos en el seno de la reacción inflamatoria. A lo largo del proceso estos mismos linfocitos podrían iniciar la secreción de inhibidores de la proliferación fibroblástica.

En el último de los trabajos (Neilson, Phillips, 1981), los autores consideraron que las células NK podrían ser la primera línea de defensa frente a anticuerpos anti-MBT a través de una reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Este estudio evidenciaba que cuando los anticuerpos anti-MBT se depositan en los riñones podrían actuar como fuente de información entre los antígenos tubulares y las células NK.

En 1979, Erard et al., estudiaron la naturaleza bioquímica de los

determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos anti-MBT en la nefritis autoinmune. Tras la inmunización de ratones Balb/c con MBG insoluble, los anticuerpos se dirigían fundamentalmente contra determinantes antigénicos de naturaleza colágena (procolágeno tipo IV) compartidos por MBG y MBT, mientras que si la inmunización se efectuaba con MBT los anticuerpos inducidos iban dirigidos contra determinantes antigénicos localizados en la fracción glicoproteica no colagenizada de los túbulos renales.

Brown et al., 1979, demuestran la eficacia del antisuero anti-idiotipo en la inhibición específica de una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos, en este caso NTI en cobayas, produciendo una reducción de los niveles de anticuerpos anti-MBT y solamente pequeños focos de afectación intersticial.

En 1979 Andrés et al., establecieron la hipótesis de que las lesiones de MBT en la NTI en cobayas era una consecuencia de la cooperación de mecanismos inmunológicos humorales y celulares probablemente relacionada con la citotoxicidad, y que como expresión última supondría la destrucción de MBT por células gigantes multinucleadas.

En 1981, Kreiger et al., estudian la existencia de rata resistentes a la inducción de NTI y que ésta no es consecuencia de una diferencia cualitativa o cuantitativa en la respuesta anti-MBT, sino la ausencia de un determinante diana en la MBT. Los análisis de segregación y el patrón de distribución de las cepas, indicaron que la expresión de este antígeno de MBT era independiente del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y estaba controlado por un gen dominante, demostrando la existencia de un tipo adicional de control genético a la susceptibilidad a la enfermedad, determinado más por el control a la presencia del antígeno diana que por la respuesta inmune al mismo.

En 1983, Neilson et al., aunque de acuerdo con las diferencias entre cepas en las cantidades de anticuerpos anti-MBT producidas, encuentran poco o ningún efecto del control genético sobre tal respuesta, basándose en la medición de anticuerpos anti-MBT circulantes, más que de los eluidos. Estos autores concluyen que la respuesta genéticamente controlada a membrana basal tubular heteróloga, es mediada por células y determinada por un gen ligado al CMH (RT1).

Moulonguet-Doleris et al., en 1981, estudian la producción de anti-

cuerpos anti-MBG y/o MBT en ratones, llegando a la conclusión que la producción de estos anticuerpos estaba genéticamente determinada y no dependían exclusivamente del CMH.

En 1983 Mampaso y Wilson caracterizan, utilizando anticuerpos monoclonales, el infiltrado inflamatorio intersticial en NTI en ratas BN encontrando un predominio de células T cooperadoras, lo que permite suponer que tras la lesión inicial producida por anticuerpos y complemento, las células T, con un predominio selectivo de la subpoblación T cooperadora sobre la T supresora, jugaban un papel importante en la regulación y progresión de la enfermedad.

También en 1983 Zanetti et al. estudian el posible efecto patogénico que los anticuerpos anti-idiotipo pueden jugar en el desarrollo de la enfermedad, observando que la inyección "in vivo" de suero anti-idiotipo, previamente a la inmunización con MBT, lograba una supresión selectiva y significativa de los anticuerpos contra la fracción de MBT autóloga solubilizada pero no contra los determinantes antigénicos de la MBT intacta, ni contra los de la MBT heteróloga. Estos resultados sugerían que los anticuerpos anti-idiotipo podrían ser de utilidad en el esclarecimiento de los mecanismos patogénicos subya-

centes en estas complejas reacciones inmunes.

En 1985, Ulich et al. en un modelo de NTI en ratas BN inmunizadas con MBT-BOV solubilizada caotrópicamente, fracasan en transferir la enfermedad con suero de ratas inmunizadas, sugiriendo que ésto era debido a que los anticuerpos responsables no estaban presentes en suficiente cantidad. Sin embargo, la transferencia sí era posible al transferir linfocitos ganglionares procedentes de ratas inmunizadas.

En 1980, Rudofsky analiza la diferente susceptibilidad a la inducción de lesiones renales tubulointersticiales autoinmunes en distintas cepas de ratones, utilizando siete haplotipos H-2 diferentes, considerando que dicha susceptibilidad estaba asociada con el CMH y alelos de la región K o sus proximidades y que los rasgos fenotípicos ligados al H2, como son la respuesta inmune celular, reactividad de las células inflamatorias, reconocimiento de lo propio, tolerancia y variaciones en determinantes de MBT, podrían influir en el desarrollo de estas lesiones.

Neilson y Phillips, en 1982a, estudian el efecto de la inmunidad auto-anti-idiotípica en la regulación de la expresión de la NTI en

ratas BN, observando que el tratamiento de ratas no inmunizadas con linfoblastos reactivos a antígenos tubulares, impedía el desarrollo de NTI cuando estos animales eran inmunizados. Así mismo, observaron que la respuesta linfocitaria a antígenos tubulares aparecía específicamente deprimida en los animales protegidos con linfoblastos reactivos. Estos resultados sugerían que la inmunidad anti-idiotípica podía tener una influencia moduladora tanto a nivel del reconocimiento del antígeno como en el desarrollo de la heterogeneidad del receptor antigénico.

En 1983, Zanetti y Wilson analizan los aspectos cualitativos y cuantitativos de la respuesta de anticuerpos a los antígenos de MBT en ratas BN, comparándolos con los producidos en ratas Lewis sometidas al mismo proceso de inmunización, observando una mayor reactividad de los anticuerpos producidos por ratas BN frente a antígenos de MBT-BOV que frente a los de rata BN, tanto con la fracción particulada como con la solubilizada. Apareciéndose, así mismo, una correlación entre la cantidad de anticuerpos reactivos y la intensidad de las lesiones túbulointersticiales.

Las ratas Lewis inmunizadas con el mismo protocolo, sintetizaban

anticuerpos capaces de reaccionar con las MBT de ratas BN, pero no se depositaban en las MBT de sus propios riñones. Estos anticuerpos mostraban una falta de reactividad con la fracción solubilizada de MBT, tanto autóloga como heteróloga.

En base a estos datos, podría sugerirse que la capacidad para elaborar una respuesta inmune a uno o más elementos de la porción colagenasa de la MBT jugaba un papel esencial en el desarrollo de la NTI en ratas.

En 1984, Neilson et al., estudian la inmunidad antiidiotipo en la nefritis intersticial en ratas, observando que estos animales inmunizados normalmente no elaboran una respuesta inmune antiidiotipo humoral o celular a los anticuerpos anti-MBT, implicando en este hecho a células T supresoras, las cuales podrían modular los acontecimientos inmunoreguladores subsiguientes.

Entre 1982 y 1985, Neilson et al. publican una serie de tres trabajos con el título común de: "Nefritis intersticial murina".

En el primer trabajo (Neilson, Phillips, 1982b), observan que las distintas cepas de ratones elaboran anticuerpos anti-MBT que se

depositaban en los túbulos, pero solo determinados haplotipos expresaban la enfermedad, existiendo un intervalo libre entre el momento en que los anticuerpos se depositan y la aparición de las lesiones. La presencia de infiltrados celulares en los ratones susceptibles aparecía ligada a la región H.2K, que definía el estatus de respuesta de un tipo de célula T (Thy 1.2 +, Lyt 2, 3 +) citotóxica para antígenos tubulares nefritogénicos. De este trabajo parecía deducirse una disminución en el papel patogénico de los anticuerpos anti-MBT, una importancia de la región H.2K en la susceptibilidad a la enfermedad y un nivel de actuación sobre las células efectoras citotóxicas.

En el segundo de los trabajos (Zakheim et al., 1984) estos autores lograron transferir la enfermedad mediante linfocitos T (Thy 1.2. + Lyt 1.2 +) y en menor medida con suero, demostrando el papel potencial de los linfocitos T y de los anticuerpos anti-MBT en el desarrollo de la NTI en el ratón.

En el tercero de estos trabajos Nielson et al., 1985b, estos autores sugerían que los ratones susceptibles presentaban un conjunto de genes de respuesta inmune en el contexto y bajo el control H.2K e IGH.1 que

promovían un proceso de selección de células T efectoras que operaban tras inducción, durante la diferenciación y desarrollo de las células T efectoras productoras de la enfermedad.

También en 1985a, Neilson et al., observaron que el efecto nefritogénico de la respuesta T efectora, productora de la enfermedad en ratón, podía ser inhibido en gran medida por transferencia de células T supresoras pre y post inducción de la enfermedad.

En 1986, Bannister y Wilson logran transferir pasivamente la enfermedad a ratas BN a partir de suero de ratas Lewis inmunizadas (que no fijan anticuerpos en MBT pero que sí producen grandes cantidades) cuantificando y definiendo el papel de los anticuerpos anti-MBT en la iniciación de NTI en ratas BN.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La CSA es un fármaco inmunosupresor que ejerce una actividad selectiva sobre células inmunocompetentes, modulando específicamente subpoblaciones definidas que condicionan una inhibición de la proliferación de células linfoides. Su utilización práctica ha representado un mayor interés en el campo de los trasplantes de órganos mientras que su uso en el tratamiento de enfermedades de base autoinmune ha supuesto un progreso algo más lento, aunque ha demostrado ser efectiva tanto en la prevención como en el control de patologías de este tipo.

La NTI inducida en ratas BN, al ser inmunizadas con extractos homólogos o heterólogos de MBT, representa un modelo experimental en el que los mecanismos de base humoral juegan un papel importante, evidenciado por la presencia de anticuerpos anti-MBT en suero y la aparición de depósitos de IgG y C<sub>3</sub> con un patrón lineal en MBT. Sin embargo, la presencia de un infiltrado inflamatorio constituido por células mononucleadas a partir del día 14 postinmunización induce a pensar también en la existencia de un mecanismo inmunológico de tipo celular asociado, evidenciando este modelo las complejas interacciones que estos dos

mecanismos, humoral y celular, tienen en enfermedades de base autoinmune.

Este trabajo pretende evaluar el efecto que el empleo de la CSA puede producir sobre el inicio y desarrollo de la enfermedad, estudiando:

- 1º - Modificación en la tasa de anticuerpos anti-MBT séricos.
- 2º - Modificación de los depósitos de IgG y C<sub>3</sub> en MBT.
- 3º - Modificación del daño histológico renal, expresado por la presencia de células inflamatorias en intersticio.
- 4º - Efecto que la duración del tratamiento con CSA puede inducir en el curso de la enfermedad.
- 5º - Papel que representa el momento de inicio del tratamiento en la modificación de la respuesta inmune.
- 6º - Y, finalmente, examinar en base a los efectos que la CSA ejerza sobre la enfermedad, la contribución que los mecanismos de base humoral y celular juegan en el inicio y progresión de la enfermedad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3.1. MODELO EXPERIMENTAL**

##### **3.1.1. Animales**

Se utilizaron ratas Brown Norway (BN) de cepas consanguíneas, machos, de 8-10 semanas de edad y 140-150 grs de peso aproximado al inicio del protocolo experimental. Los animales se obtuvieron de los Laboratorios IFFA-CREDO (París, Francia) así como de nuestro propio animalario, manteniéndose durante todo el experimento en condiciones estandar con libre acceso a comida y bebida.

##### **3.1.2. Preparación del antígeno**

Se utilizó el método de Mathieu y Winand (1970) parcialmente modificado en nuestro laboratorio.

###### **3.1.2.1. ANTIGENO CRUDO O PARTICULADO**

Se preparó a partir de riñones bovinos de animales sanos sacrifi-

cados entre una hora y dos horas antes de su recogida, manteniéndose a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Tras separar la corteza renal, ésta se pasó a través de un tamiz de acero de 150 micras de malla. El material no tamizado fue posteriormente homogeneizado y resuspendido en tampón fosfato salino (PBS) a 7.4 pH liofilizado y mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta una posterior utilización.

#### 3.1.2.2. ANTIGENO SOLUBLE

Una fracción soluble de (MBT-BOV) se obtuvo del material previamente liofilizado por digestión con colagenasa. La MBT-BOV fue suspendida en un tampón de Tris, pH 7.4, que contenía Cloruro cálcico 0,01 M. A esta solución se añadió colagenasa (CLSPA 395 u/mg, Millipore Corp. Freehold, N.J.) en la proporción de 0,1 mg/ml.

Después de 72 horas de incubación en un baño con agitación de  $37^{\circ}\text{C}$ , la solución fue dializada durante 5 días contra un tampón de pH 8 que contenía Cloruro sódico 0,14 M. La mezcla fue entonces

centrifugada a 24.000 r.p.m. durante 2 horas (Rotor 50 Ti, Beckman) siendo filtrado el sobrenadante a través de un filtro Millipore 0,45 y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El contenido proteico fue determinado por el método de Bradford (1976).

### 3.1.3. Inmunización

Las ratas BN fueron inoculadas con 4 mg de MBT-BOV en 0,5 ml de PBS en adyuvante completo de Freund (CFA) conteniendo 4 mg de **Mycobacterium Tuberculosis** de cepa H-37 Ra (Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.). La dosis de inoculación se dividió entre las almohadillas plantares de patas traseras y varias punciones intradérmicas en el lomo del animal.

Cada rata recibió, adicionalmente, 0,1 ml ( $2,2 \times 10^8$  bacterias/ml) de **Bordetella Pertussis** (Difco Laboratories, Detroit, Mi) por medio de dos inyecciones intradérmicas en el dorso, en el momento de la inmunización.

### 3.1.4. CSA

La CSA empleada fue proporcionada por Sandoz Ltd. Basel Switzer-

land, Sandimmun<sup>(R)</sup>, en la forma de concentrado para infusión intravenosa, conteniendo 50 mg de CSA por ml, siendo disuelta a una concentración final de 10 mg/ml en suero salino estéril y almacenada a 4°C hasta su utilización.

La CSA fue administrada diariamente por medio de inyección subcutánea en el dorso del animal a dosis de 20 mg/kg de peso, previa anestesia con éter del animal.

### 3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.2.1. Grupos experimentales

Las ratas BN quedaron agrupadas de la siguiente forma (Tabla I):

**Grupo I:** Ratas inmunizadas con MBT-BOV como se describió, sin más tratamiento (n:12).

**Grupo II:** Ratas no inmunizadas (n:6) y ratas inyectadas solo con adyuvante (n:6), tratadas con CSA comenzando el día previo a la inmunización (D-1).

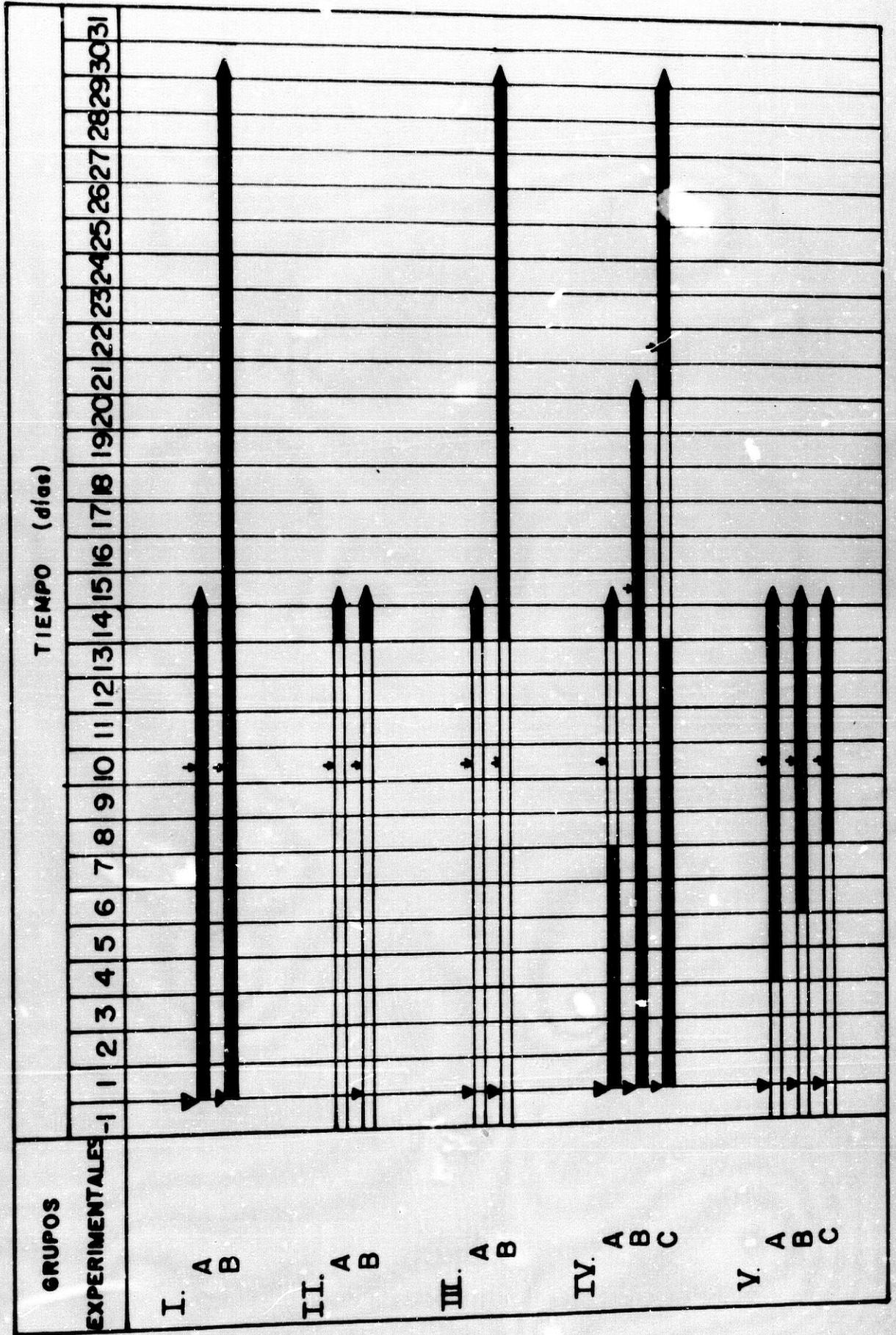


Tabla 1: Protocolo experimental.

■ Longitud del experimento.    ▼ Inmunización.    □ Tratamiento con CSA.  
 ↓ Nefrectomía.    ▲ Sacrificio del animal.

**GRUPO III:** Ratas inmunizadas con MBT-BOV y tratadas con CSA desde el día previo a la inmunización (D-1) (n:10).

Estos animales fueron nefrectomizados unilateralmente el día 10 (D 10) y sacrificados el día 15 (D 15) o día 30 (D 30) después de la inmunización siempre bajo anestesia con éter. (Tabla 2).

**GRUPO IV:** En este grupo todos los animales sufrieron inmunización previa con MBT-BOV, quedando distribuidos como sigue:

**IV-A:** Ratas BN tratadas con CSA, iniciando el tratamiento el día 8 (D 8), sufriendo nefrectomía unilateral el día 10 (D 10) y sacrificadas el día 15 (D 15) después de la inmunización (n:6).

**IV-B:** Ratas BN tratadas con CSA a partir del día 10 (D 10) con nefrectomía unilateral el día 15 (D 15) y sacrificadas el día 22 (D 22) (n:6).

**IV-C:** Ratas BN tratadas con CSA iniciando el tratamiento el día 15 (D 15) con nefrectomía unilateral el día 22 (D 22) y sacrificadas el día 30 (D 30) (n:6).

**GRUPO V:** Ratas BN inmunizadas con MBT-BOV y recibiendo desde el D 1 al D 5 (V-A) (n:6), desde el D-1 al D 7 (V-B) (n:6) y desde el D-1 al D 9 (V-C) (n:6) tratamiento con CSA, con nefrectomía unilateral el día 10 (D 10) y sacrificadas el día 15 (D 15).

### 3.2.2. Estudio inmunohistopatológico

En cada experimento los riñones obtenidos por nefrectomía unilateral o sacrificio del animal fueron procesados para su estudio por microscopía de luz e inmunofluorescencia.

Para su estudio por microscopía óptica el fragmento de tejido renal fue fijado en solución alcohólica de Bouin durante un tiempo de 8-10 horas. Se realizaron cortes de 2  $\mu$  de grosor tiñéndose

con Hematoxilina- Eosina (H-E) y Acido Periódico de Schiff (PAS). Se valoraron una serie de parámetros morfológicos que traducirían la existencia de un daño renal:

- Presencia de infiltrado inflamatorio.
- Características celulares de este infiltrado (Leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, células gigantes multinucleadas, etc).
- Alteraciones tubulares.
- Fibrosis intersticial.
- Alteraciones vasculares.

Estos parámetros tuvieron una valoración semicuantitativa, puntuando de 0 a 4 + la frecuencia de nula (0), ligera (+), moderada (++) importante (+++) e intensa (++++) afectación intersticial presente.

Para su estudio por inmunofluorescencia directa, el tejido renal fue congelado en Isopentano previamente enfriado en Nitrógeno líquido, manteniéndose a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Se realizaron cortes en congelación en un criostato marca Slee, fijándose a continuación en acetona durante diez minutos. Sobre estos cortes se verificó estudio de inmunofluorescencia directa utilizándose antisuero de conejo anti-IgG de rata y antisuero de cabra anti- $\text{C}_3$  de rata obtenidos de Laboratorios Cappel (Downington Pennsylvania). La presencia de depósitos lineales de IgG y  $\text{C}_3$  a lo largo de la membrana basal se valoró de 0 a 3 +, siendo 0 negativo y 3 + máxima la intensidad de estos depósitos.

### 3.2.3. Anticuerpos séricos anti-MBT

Se obtuvieron muestras de sangre de cada animal en distintos días del experimento por punción en la vena dorsal de la cola o por punción directa cardíaca cuando el día coincidía con el del sacrificio del animal, siempre éste bajo anestesia con éter.

La muestra de sangre se dejó coagular a temperatura ambiente

durante 1 hora, centrifugándose a continuación a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos, obteniéndose de este modo muestras que fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

La cuantificación de los anticuerpos anti-MBT circulantes se verificó mediante técnica de "Enzymed Linked Immunosorbent Assay" (E.L.I.S.A.) descrita por Stevens y Saxon y parcialmente modificada en nuestro laboratorio.

Para ello se utilizaron placas de Polyvinilo (Dynatech, Flow Laboratories) como soporte de fase sólida. El antígeno BOV-MBT solubilizado con colagenasa, se diluyó en suero salino, pipeteando  $100\ \mu\text{l}$  en los pocillos de la placa, incubándose a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Tras ésto, el antígeno fue vertido de la placa y ésta lavada con PBS a fin de eliminar todo el antígeno que no se hubiera pegado a la placa. Para evitar inespecificidades las placas se bloquearon con  $200\ \mu\text{l}$  por pocillo de Albúmina sérica bovina diluída en tampón borato salino de pH 8.4 (BSA). Las placas fueron entonces incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

Se preincubaron  $500\ \mu\text{l}$  de suero de rata conteniendo anticuerpos

anti-MBT con 25  $\mu$ l de una solución de antígeno BOV-MBT. Se utilizaron como controles 500  $\mu$ l del mismo suero preincubado con 25  $\mu$ l de una solución de Toxoide Tetánico a una concentración de 1 mg/ml o con suero salino.

Las placas fueron incubadas 2 horas a 22<sup>o</sup>C y más tarde lavadas.

Se diluyó IgG de conejo anti- IgG de rata conjugada con fosfatasa alcalina (Zymed Laboratoires, Inc., San Francisco, CA, USA) 1/1000 en BSA salino al 1 % añadiéndose 100  $\mu$ l por pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas a 4<sup>o</sup>C lavándose a continuación 5 veces con PBS.

Como sustrato del sistema se empleó 4-Metil Umbellyferyl fosfato (Sigma, London Chemical. Co Ltd. Surrey) preparándose a una concentración final de 10<sup>-4</sup>M. en Buffer carbonato a pH 9.5, agregándose 100  $\mu$ l a cada pocillo.

Después de un período de incubación de 90 minutos a 22<sup>o</sup>C, en oscuridad, la actividad enzimática fue determinada mediante Espectrofluorometría utilizando una longitud de onda de 360 nm para excitación y 470 nm para emisión.

4. RESULTADOS

#### 4. RESULTADOS

##### A) GRUPOS DE CONTROL

###### A.1: Grupo I

La inmunización con MBT-BOV en adyuvante no causó mortalidad en los animales durante el período de observación.

En el día diez, día en el que estos animales sufrieron nefrectomía el riñón aparecía macroscópicamente agrandado y tumefacto. Existía una palidez focal e irregular con pequeñas áreas subcapsulares de hemorragia así como adherencias capsulares. A partir del día quince y en adelante, los riñones aparecían disminuidos de tamaño mostrando una consistencia firme.

Histológicamente todas las ratas desarrollaron lesiones túbulointersticiales severas, caracterizadas por un infiltrado inflamatorio intersticial focal e irregularmente distribuido. En el día diez el infiltrado estaba constituido fundamentalmente por leucocitos polimorfonucleares (Fig 2). En el día quince este infiltrado era de mayor entidad apreciándose, así mismo, la existencia de células

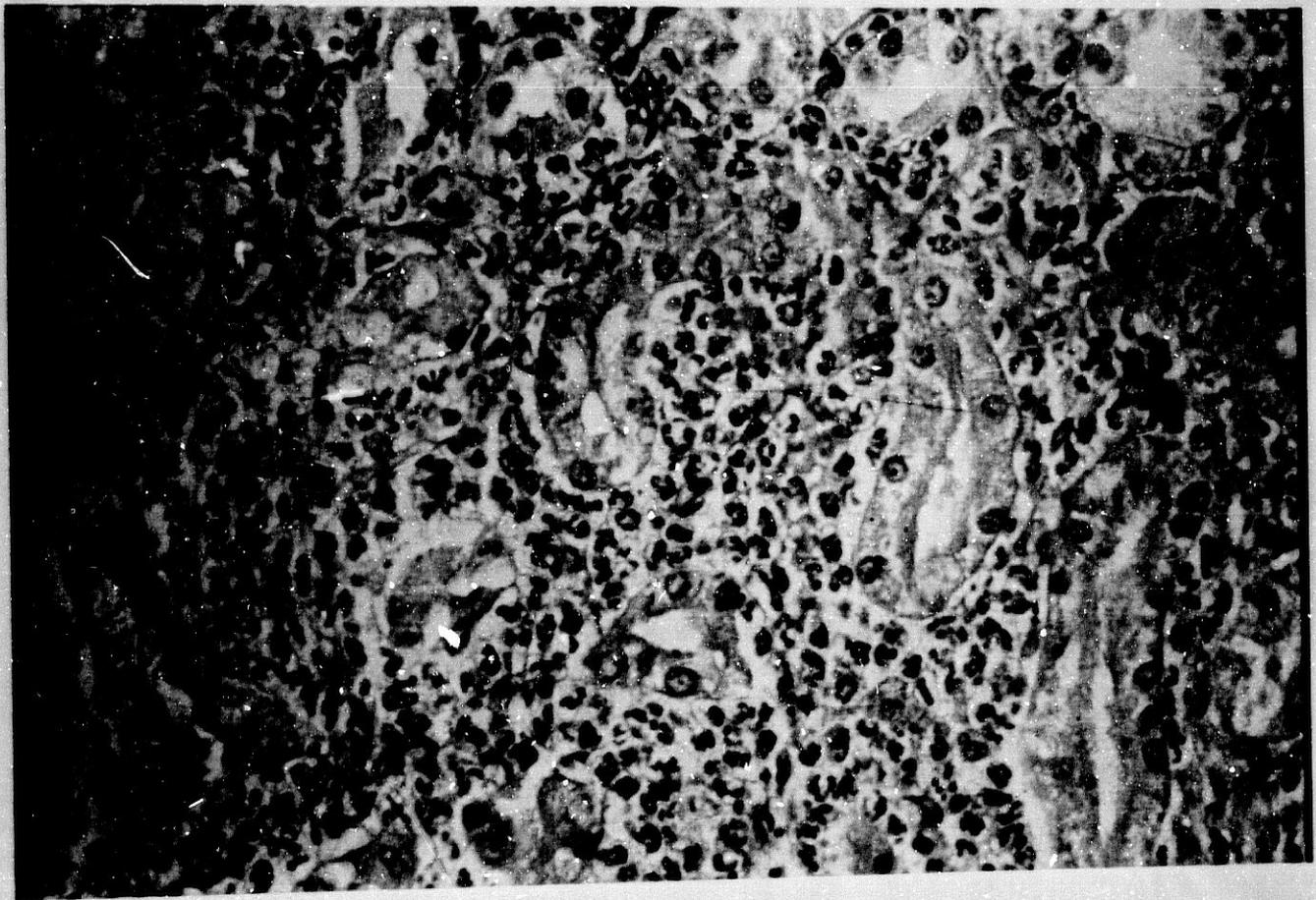


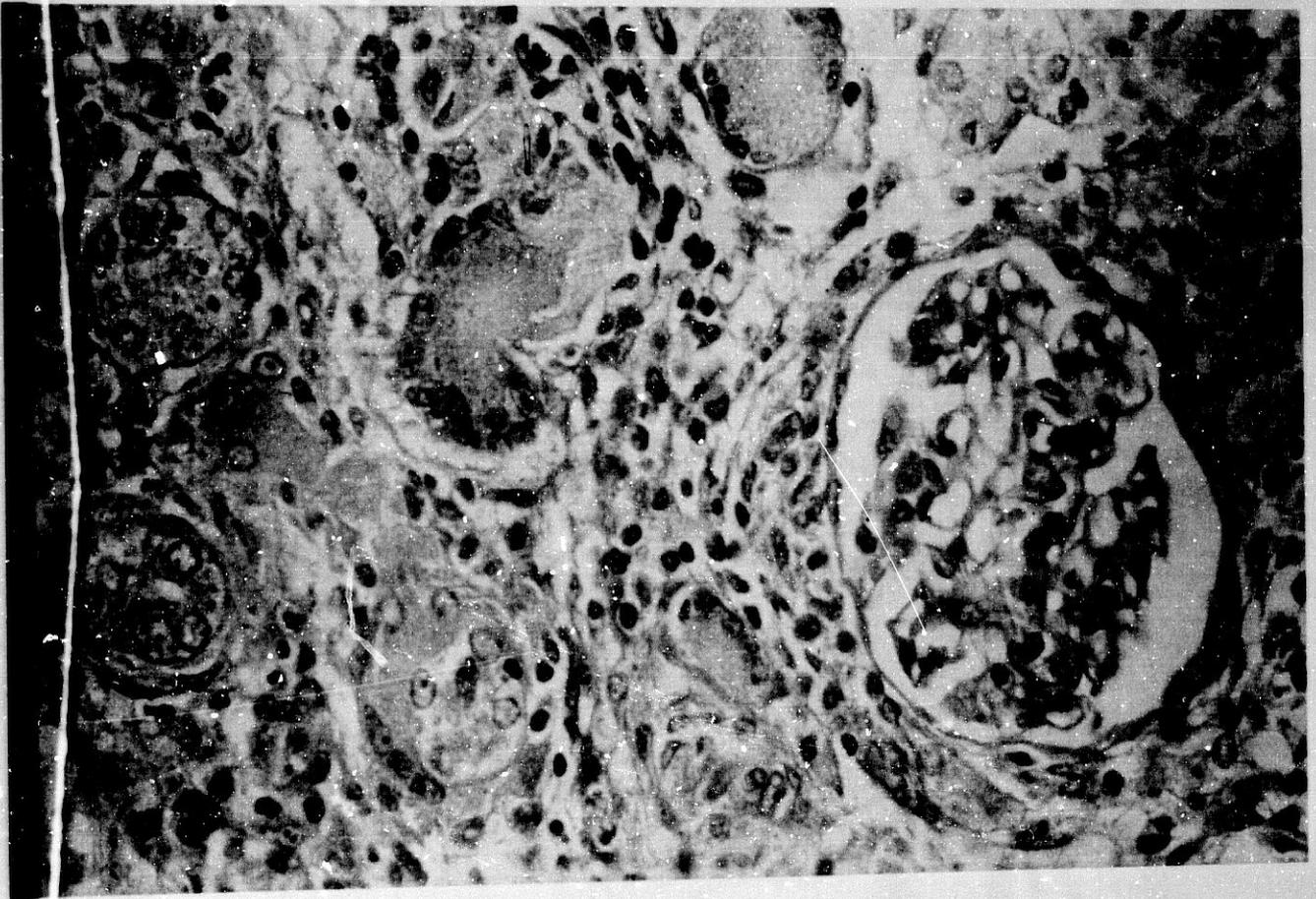
Fig. 2: Infiltrado inflamatorio túbulointersticial constituido por leucocitos polimorfonucleares.

multinucleares gigantes (Fig 3) junto con cambios epiteliales degenerativos (núcleos hipercromáticos y vacuolización citoplasmática) (Fig 4) así como cambios tubulares atróficos, prominentes fenómenos de fibrosis peritubular y periglomerular y lesiones vasculares con cambios moderados de arterioesclerosis (Fig 5).

El estudio de inmunofluorescencia mostraba ya en el día diez un depósito de IgG en membrana basal de túbulos proximales con un patrón lineal (Fig 6). Se apreciaban también depósitos de  $C_3$  con un patrón similar, pero de menor intensidad (Fig 7) (Tabla II).

#### A.2: Grupo II

Las ratas no inmunizadas y aquellas inyectadas solamente con adyuvante y que recibieron un curso de quince días de duración con tratamiento de CSA mostraban un aspecto macro y microscópico normal sin evidencia de infiltrado inflamatorio alguno y sin cambios en epitelio tubular. Tampoco existían depósitos de IgG y  $C_3$ , en ningún caso (Tabla III).



F.g. 3: Células gigantes presentes en el infiltrado inflamatorio (Día 15 postimmunización).

er

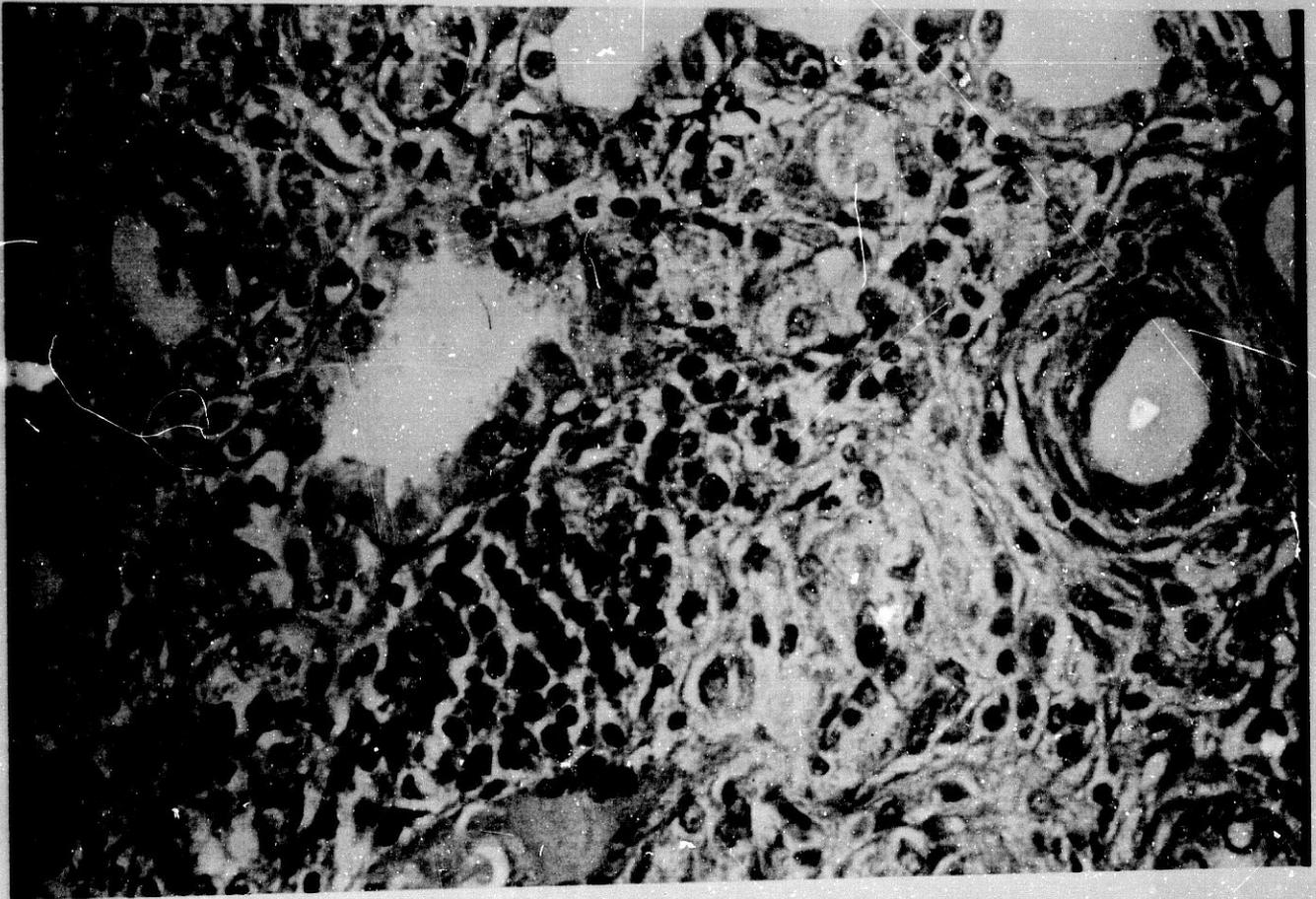


Fig. 4: Cambios degenerativos en epitelio tubular.

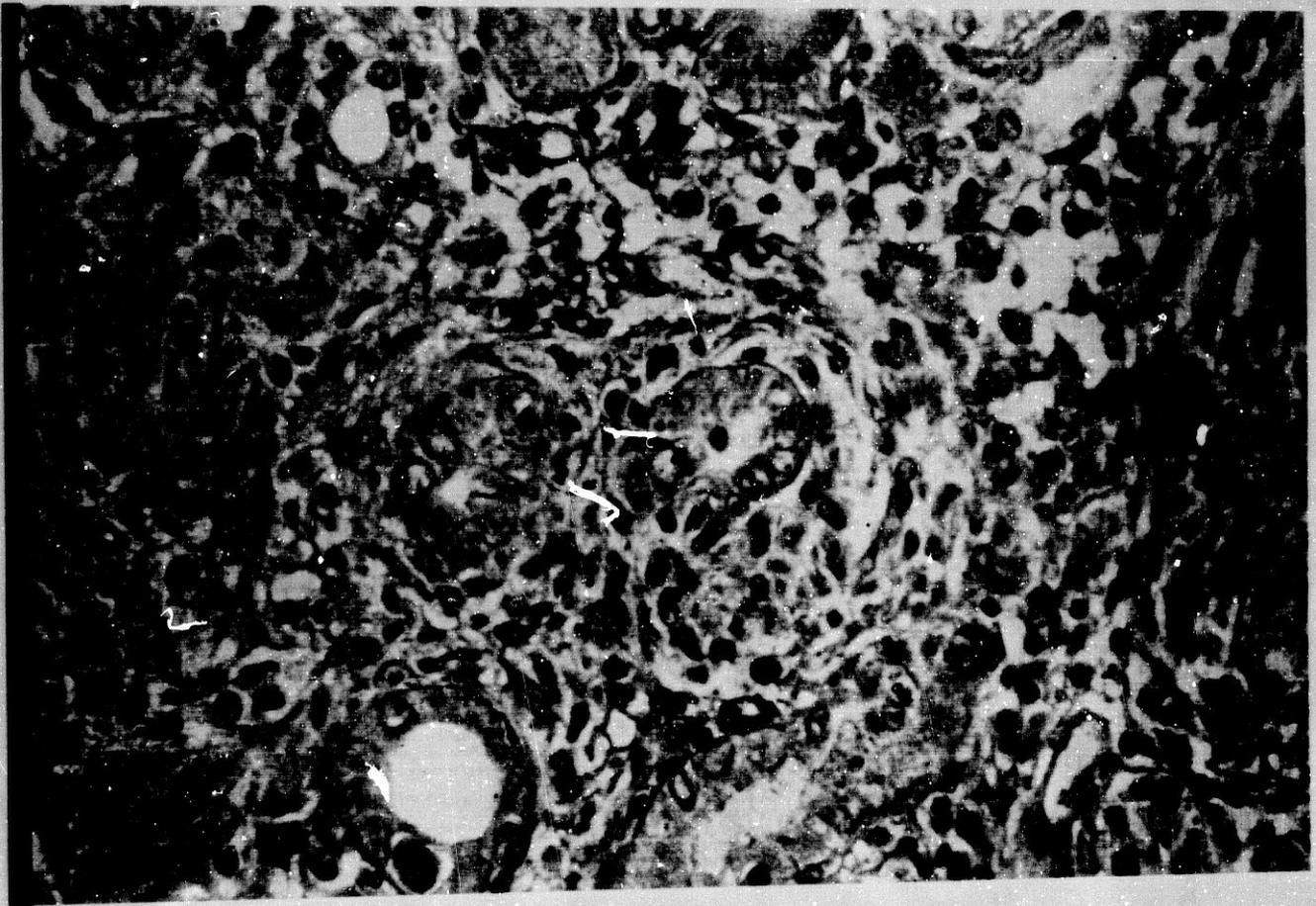


Fig. 5: Fibrosis intersticial.

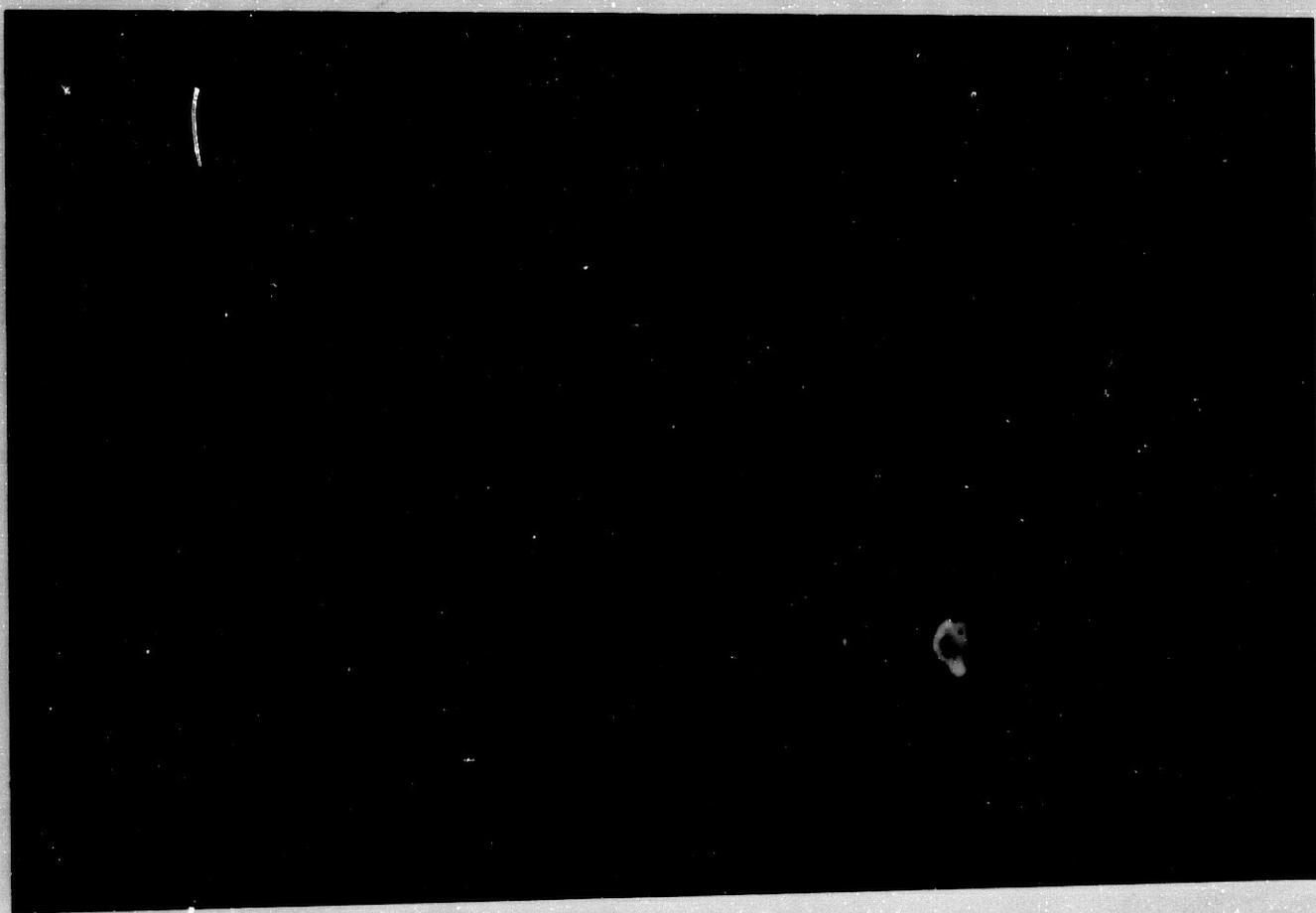


Fig. 6: Depósito lineal de IgG en membrana basal de túbulos proximales.

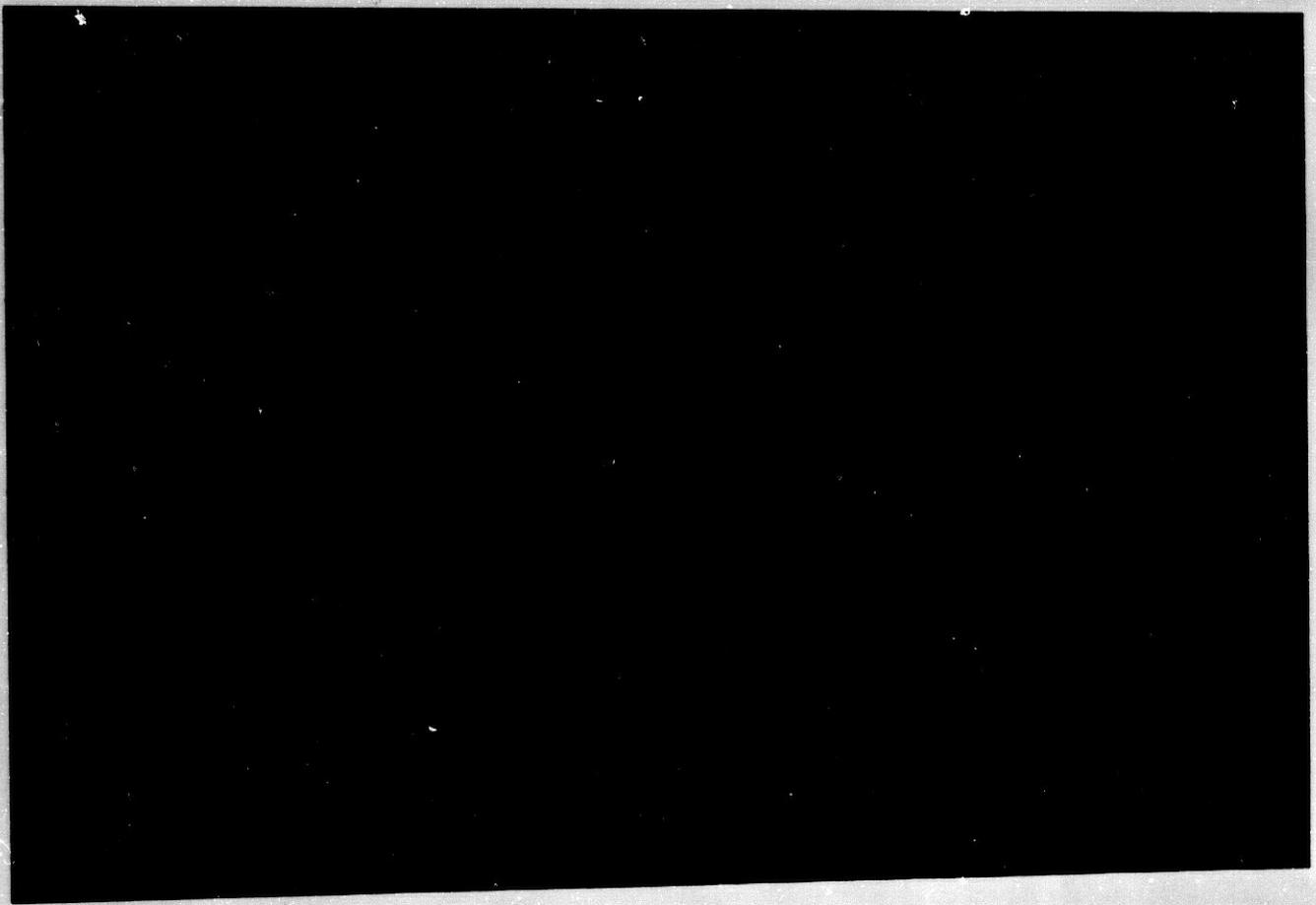


Fig. 7: Depósito lineal de  $C_3$  de menor intensidad que el de IgG. (Fig. 6).

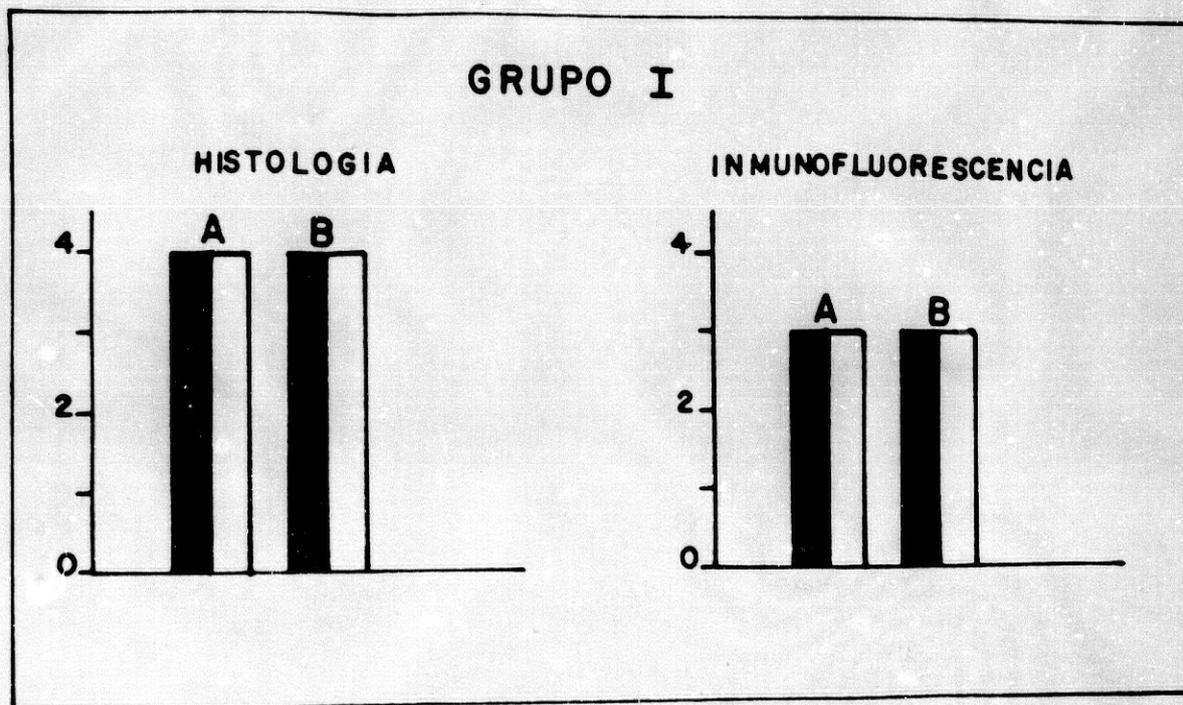


Tabla II: Representación gráfica de los hallazgos histológicos y de inmunofluorescencia. Grupo I.

□ Nefrectomía. ■ Sacrificio.

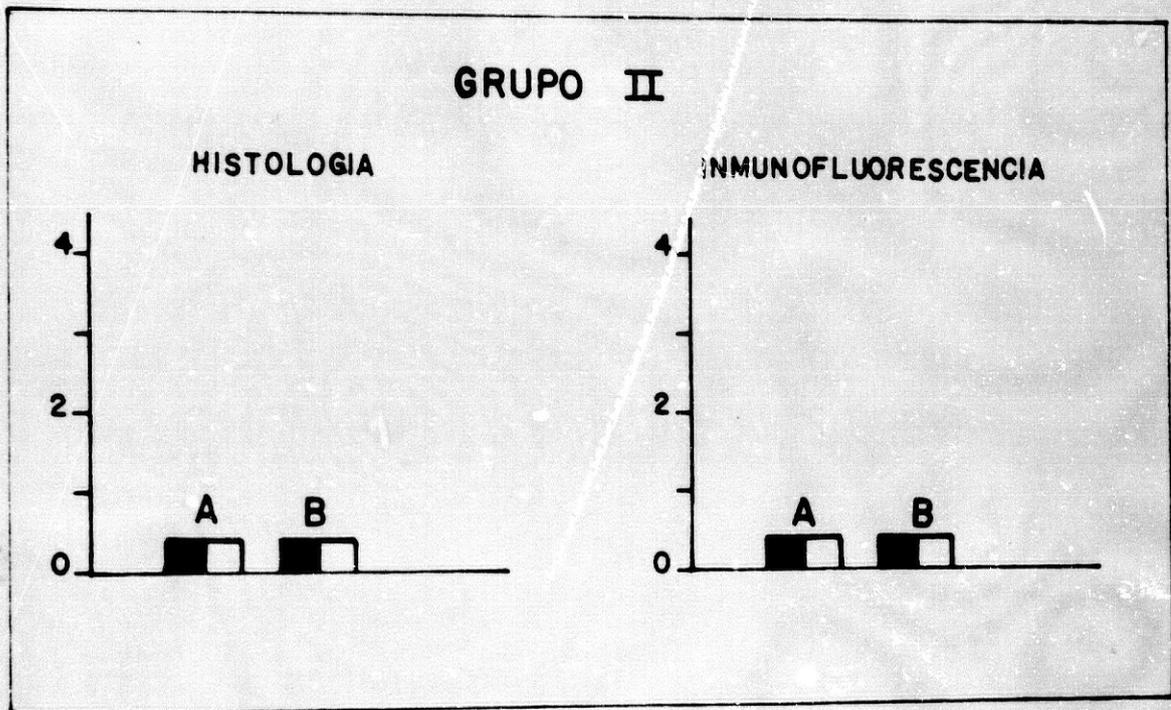


Tabla III: Representación gráfica de los hallazgos histológicos y de inmunofluorescencia. Grupo II.

□ Nefrectomía. ■ Sacrificio.

**B) Ratas BN tratadas con CSA e inmunizadas con BOV-MBT****B-1: Grupo III**

Ninguno de estos animales en los que el tratamiento con CSA se iniciaba en el día anterior a la inmunización, mostraban alteraciones histológicas así como tampoco presentaban depósitos inmunofluorescentes de IgG y  $C_3$  aún cuando el animal fuese sacrificado días después de haber suspendido el tratamiento con CSA el día catorce. Es decir, la droga parecía establecer una completa prevención de la enfermedad (Fig 8 Tabla IV).

**B.2: Grupo IV**

En los animales en los que el tratamiento se retrasaba al día ocho y diez después de la inmunización, se apreciaba una ausencia de daño histológico en riñón sin evidencia de infiltrados inflamatorios, fibrosis, etc; determinado tanto al inicio del tratamiento (día diez en grupo IV-A) como tras haber cesado la administración de CSA (día quince en grupo IV-B). Sin embargo la intensidad y patrón de los depósitos de IgG y  $C_3$  permanecían sin modificar siendo indistinguibles

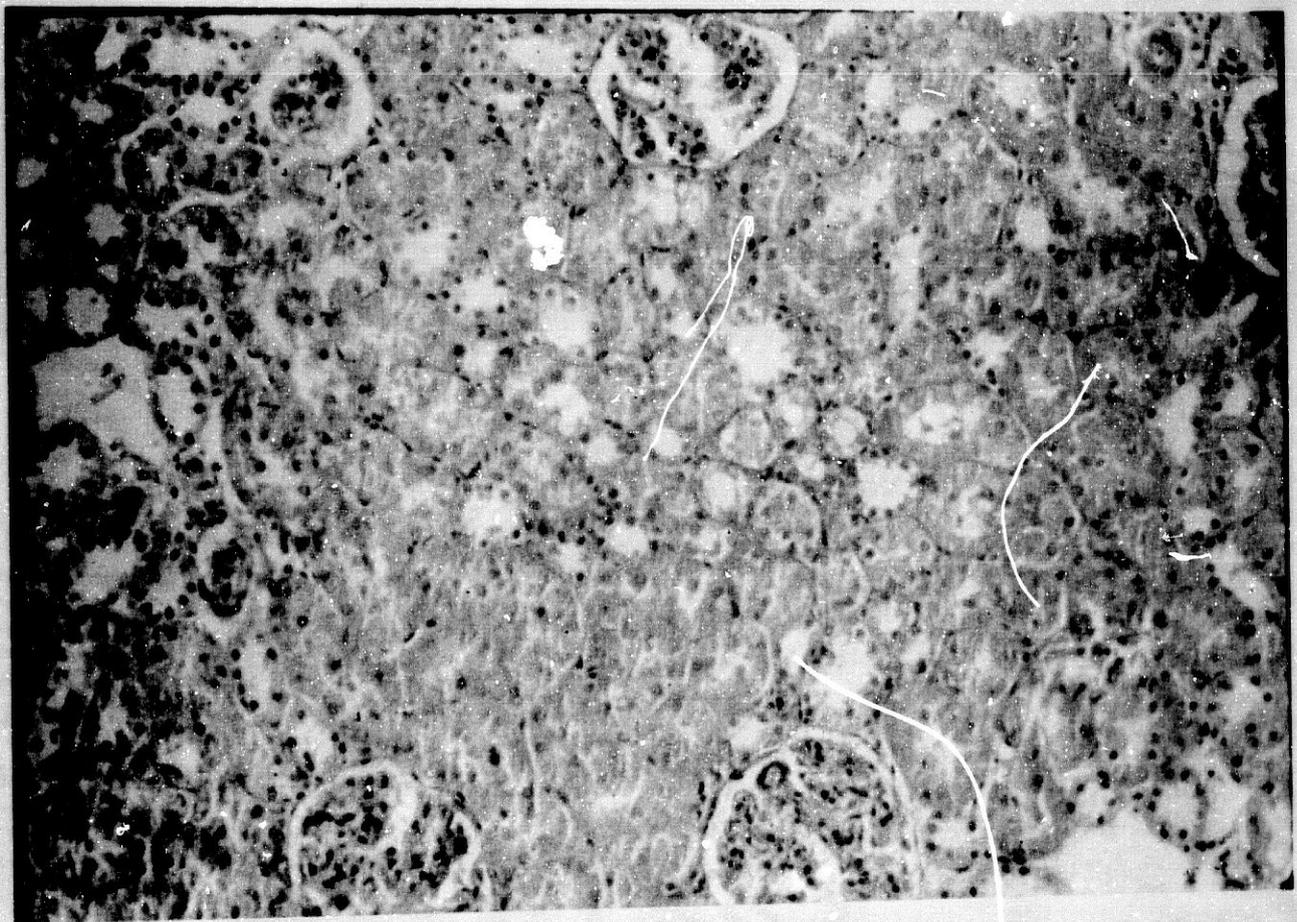


Fig. 8: Ausencia de alteraciones histológicas en animales tratados con CSA (Grupo III).

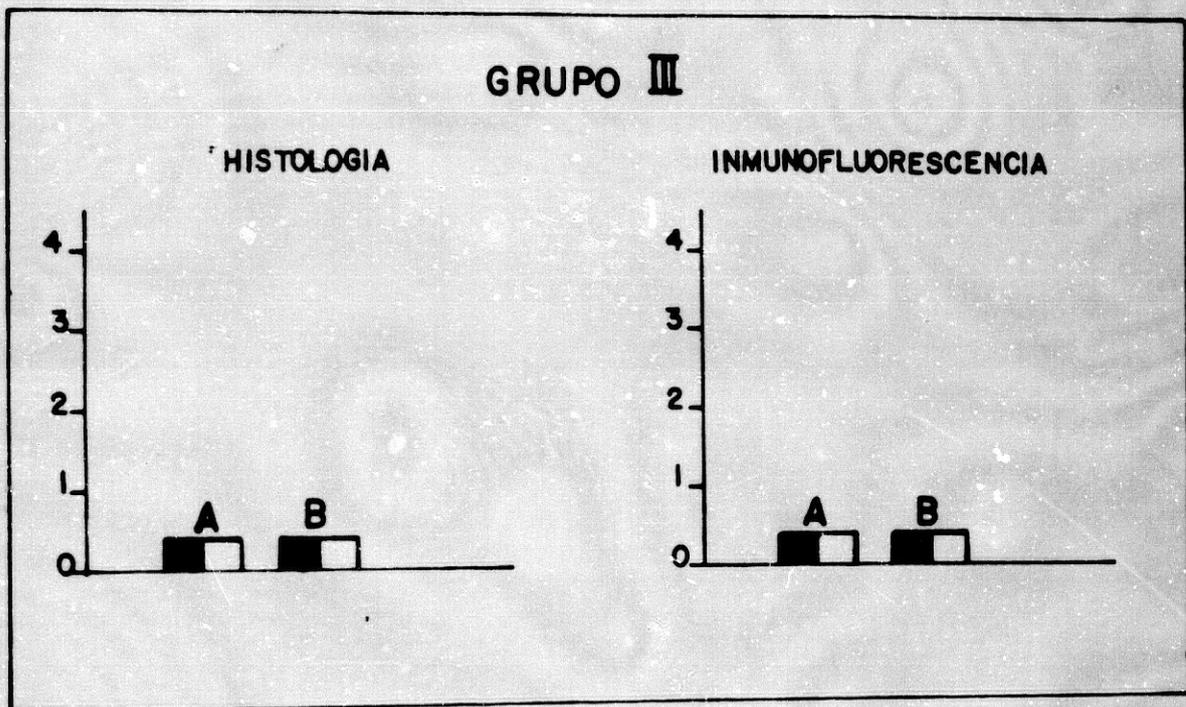


Tabla IV: Representación gráfica de los hallazgos histológicos y de inmunofluorescencia. Grupo III.

□ Nefrectomía. ■ Sacrificio.

de los que aparecían en animales sin tratamiento (Fig 9).

En el grupo IV-C, es decir, en aquellos animales inmunizados, en los que el tratamiento con CSA se retrasaba hasta el día catorce después de la inmunización, el curso de la enfermedad aparecía inmodificado con presencia de daño intersticial desde el punto de vista histológico y depósitos lineales inmunofluorescentes de IgG y  $C_3$  (Tabla V).

### **B.3: Grupo V**

Los animales inmunizados que recibían un curso corto de cinco y seis días de tratamiento con CSA (grupos V-A y V-B) mostraban una discreta disminución del daño renal histológicamente, pero los depósitos de IgG y  $C_3$  lineales aparecían inmodificados. Si el tratamiento con CSA se prolongaba dos o más días (grupo V-C) se asistía a una completa normalidad, tanto histológicamente como en cuanto a la existencia de depósitos inmunofluorescentes (Tabla VI).

### **Anticuerpos Anti -MBT- séricos**

Las determinaciones seriadas de anticuerpos anti-MBT, por método de ELISA



Fig. 9: Depósitos de IgG no modificados (Grupo IV).

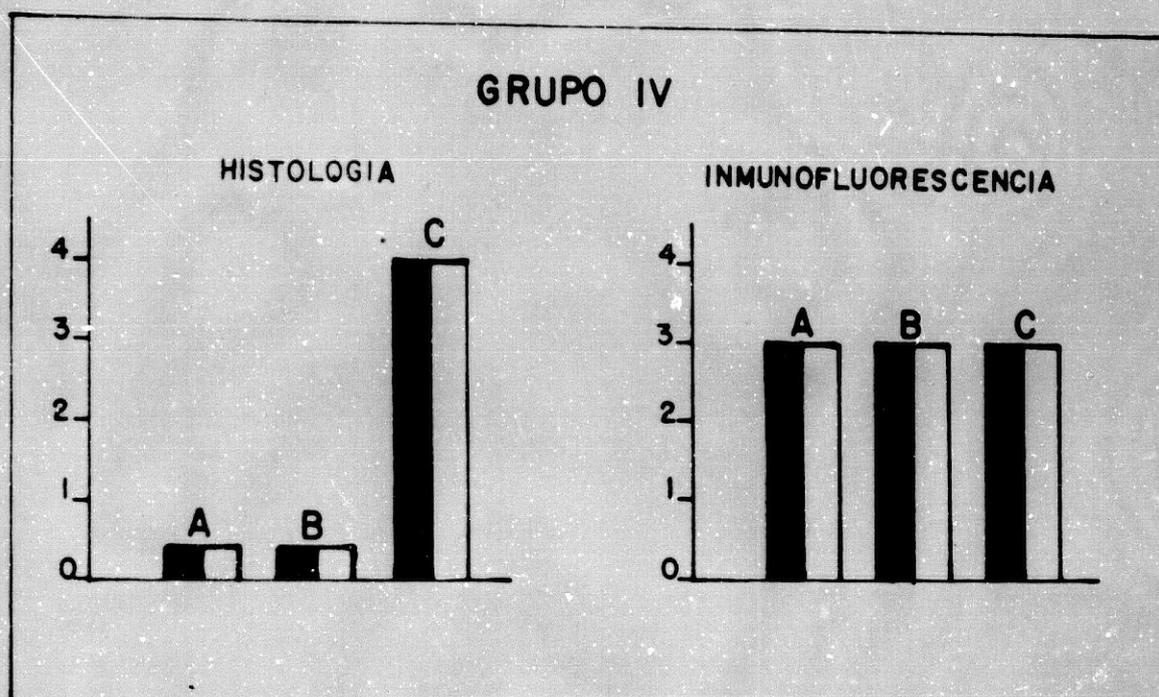


Tabla V: Representación gráfica de los hallazgos histológicos y de inmunofluorescencia. Grupo IV.

□ Nefrectomía. ■ Sacrificio.

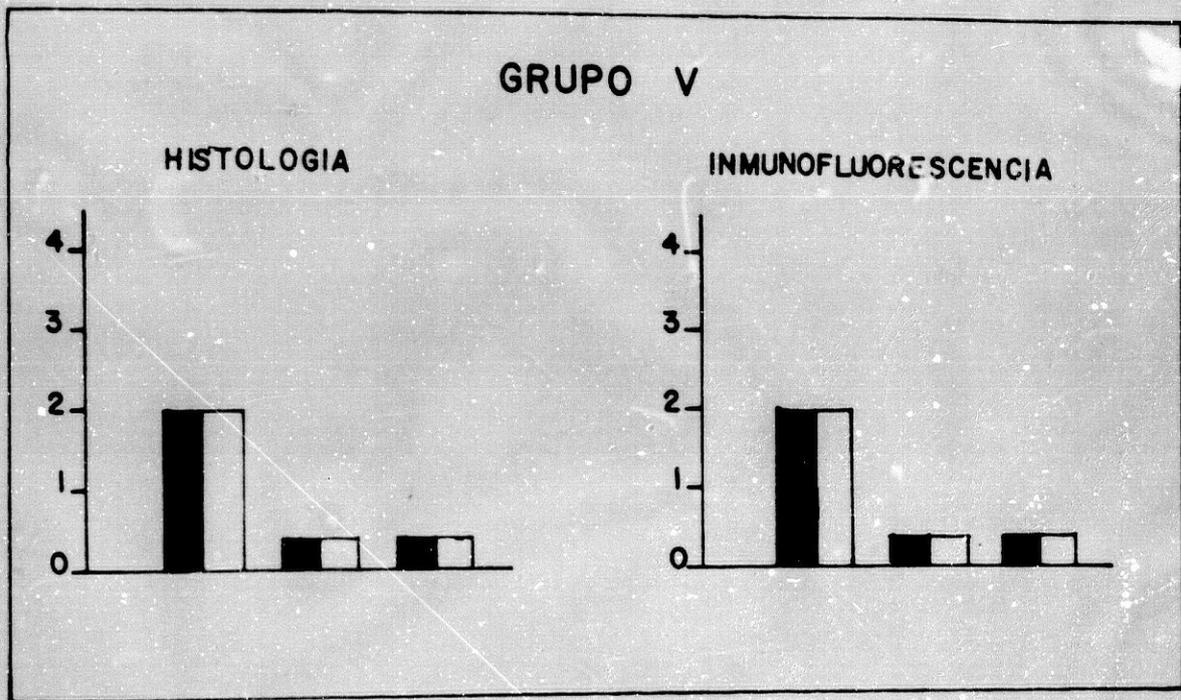


Tabla VI: Representación gráfica de los hallazgos histológicos y de inmunofluorescencia. Grupo V.

□ Nefrectomía. ■ Sacrificio.

mostraron que la IgG anti-MBT en ratas del grupo I se detectaba precozmente después de la inmunización (día tres: 2-2,4  $\mu\text{g/ml}$ ) y continuaban aumentando su nivel durante todo el curso del experimento (día veintiocho: 4,3  $\mu\text{g/m}$ ) (Tabla VII).

En los grupos II y III los niveles séricos de IgG anti-MBT eran constantemente más bajos que los de los animales del Grupo I (0,7  $\mu\text{g/ml}$  en día tres y 0,8  $\mu\text{g/ml}$  en día 28) (Tablas VIII y IX).

Las ratas del grupo IV mostraban una drástica caída en los niveles de anticuerpos anti-MBT cuando el tratamiento con CSA se iniciaba en los días ocho y diez postinmunización cayendo hasta 1,4  $\mu\text{g/ml}$  en el día diez en el primer grupo y hasta 1,5  $\mu\text{g/ml}$  en el día veintiuno en el segundo grupo. Sin embargo las ratas de este grupo IV que comenzaban el tratamiento catorce días después de la inmunización, solamente mostraban una ligera disminución en los niveles de Anticuerpos anti-MBT (3,6  $\mu\text{g/ml}$  en el día 28) (Tabla X).

En el grupo V las ratas tratadas con CSA durante los cinco primeros días del experimento, alcanzaban niveles de IgG anti-MBT similares a los del grupo I (3,6  $\mu\text{g/ml}$  del grupo V frente a 4  $\mu\text{g/ml}$  del grupo I en el día

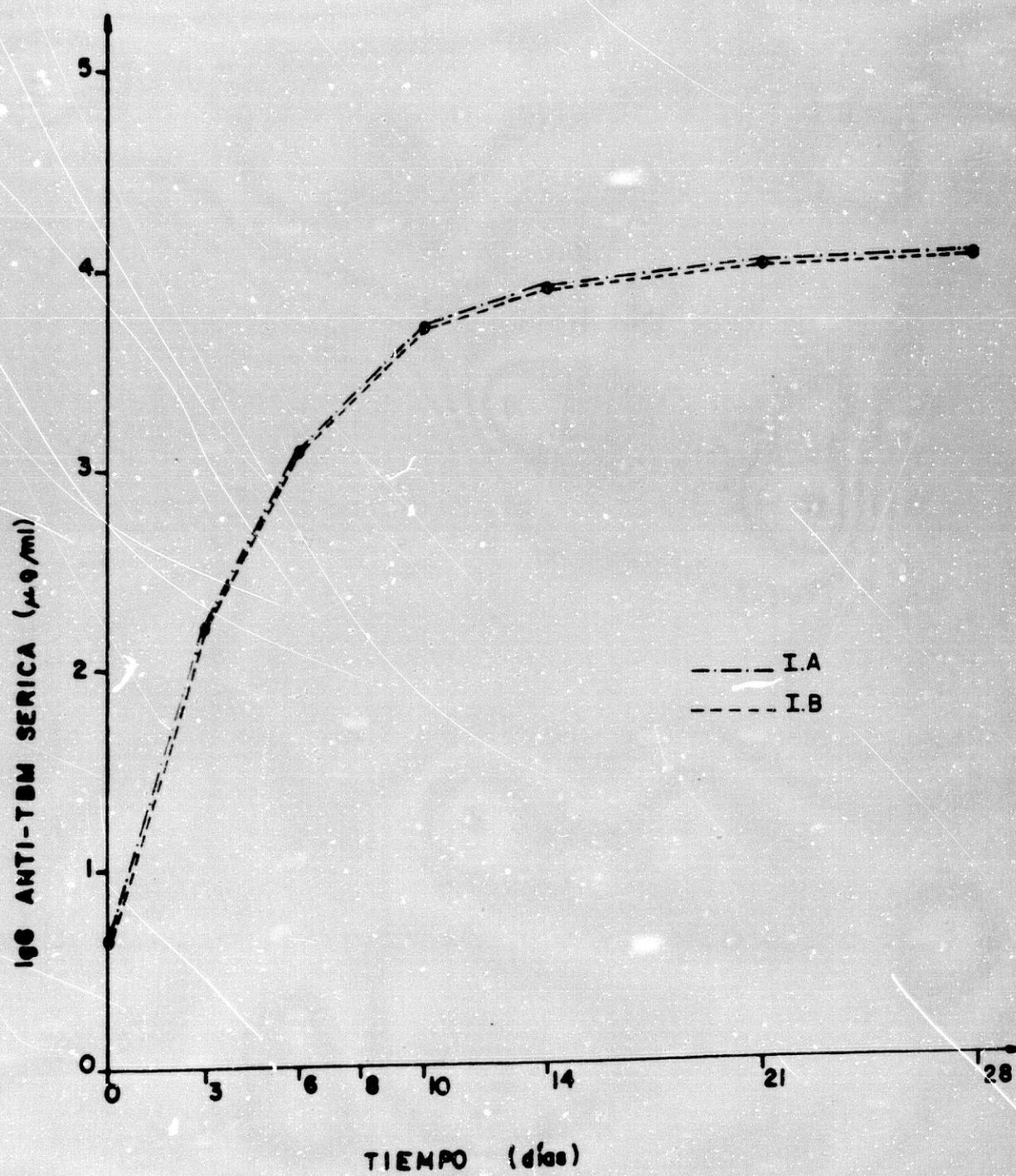


Tabla VII: Anticuerpos anti-MBT circulantes. Grupo I.

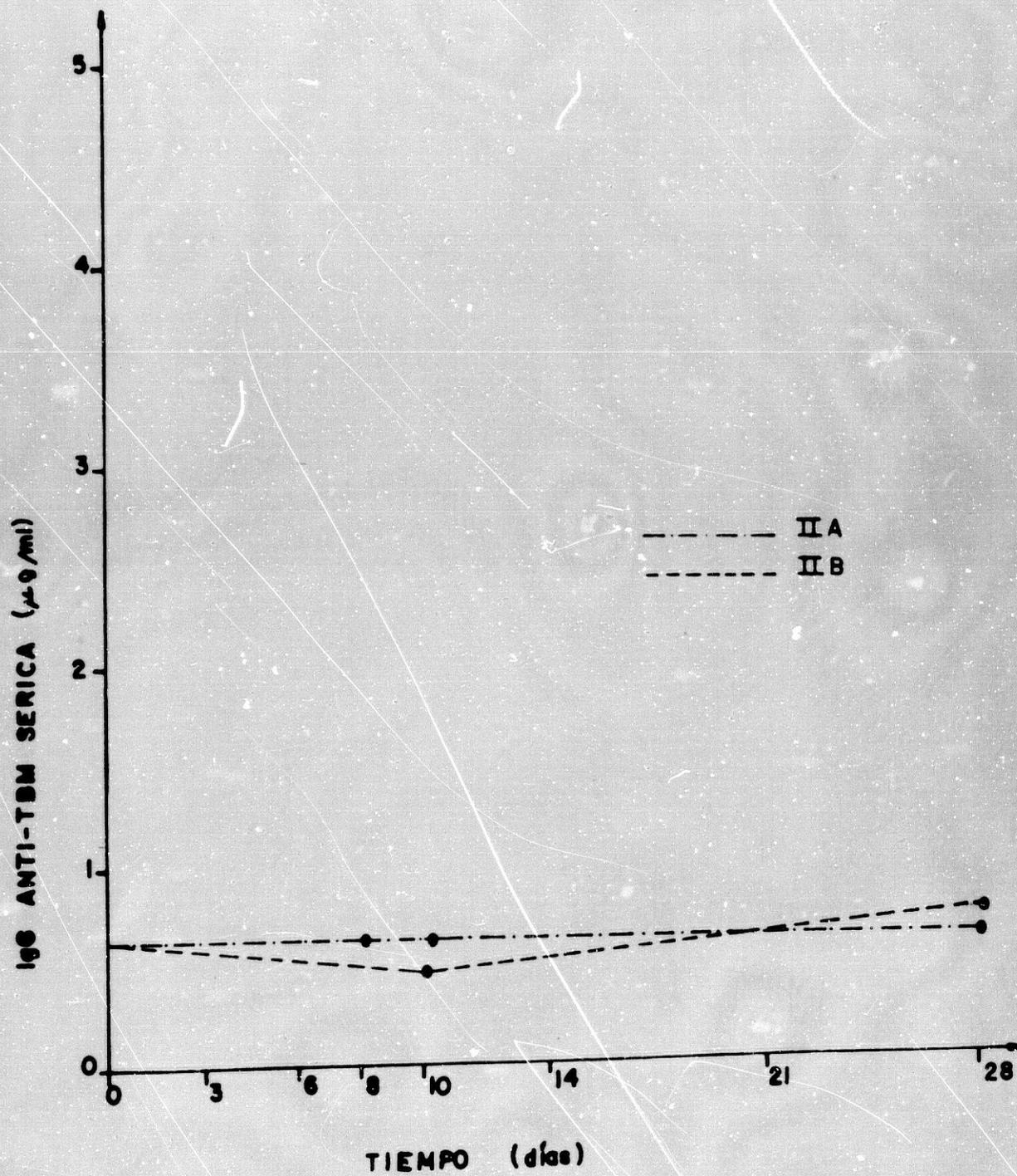


Tabla VIII: Anticuerpos anti-MBT circulantes. Grupo II.

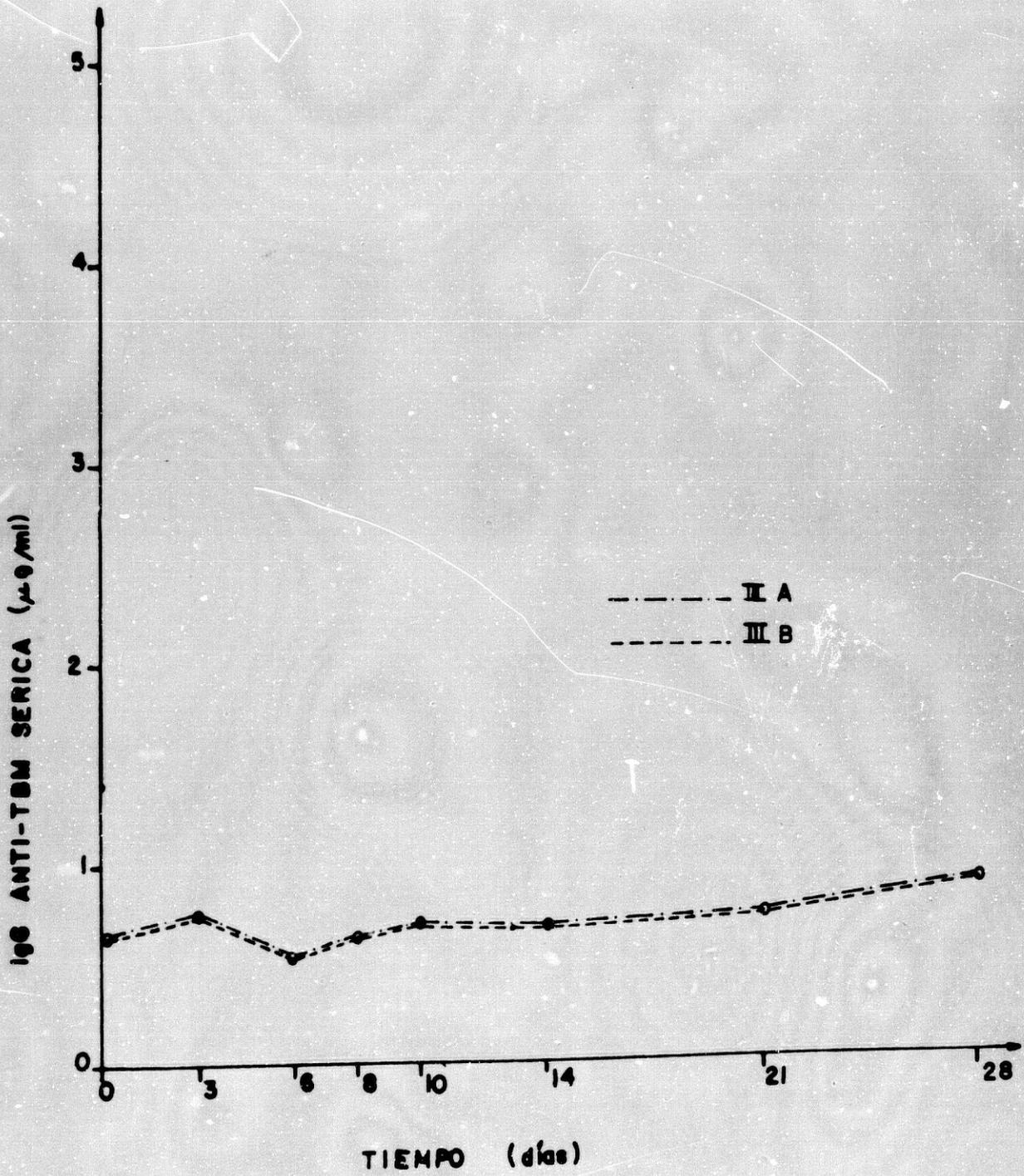


Tabla IX: Anticuerpos anti-MBT circulantes. Grupo III.

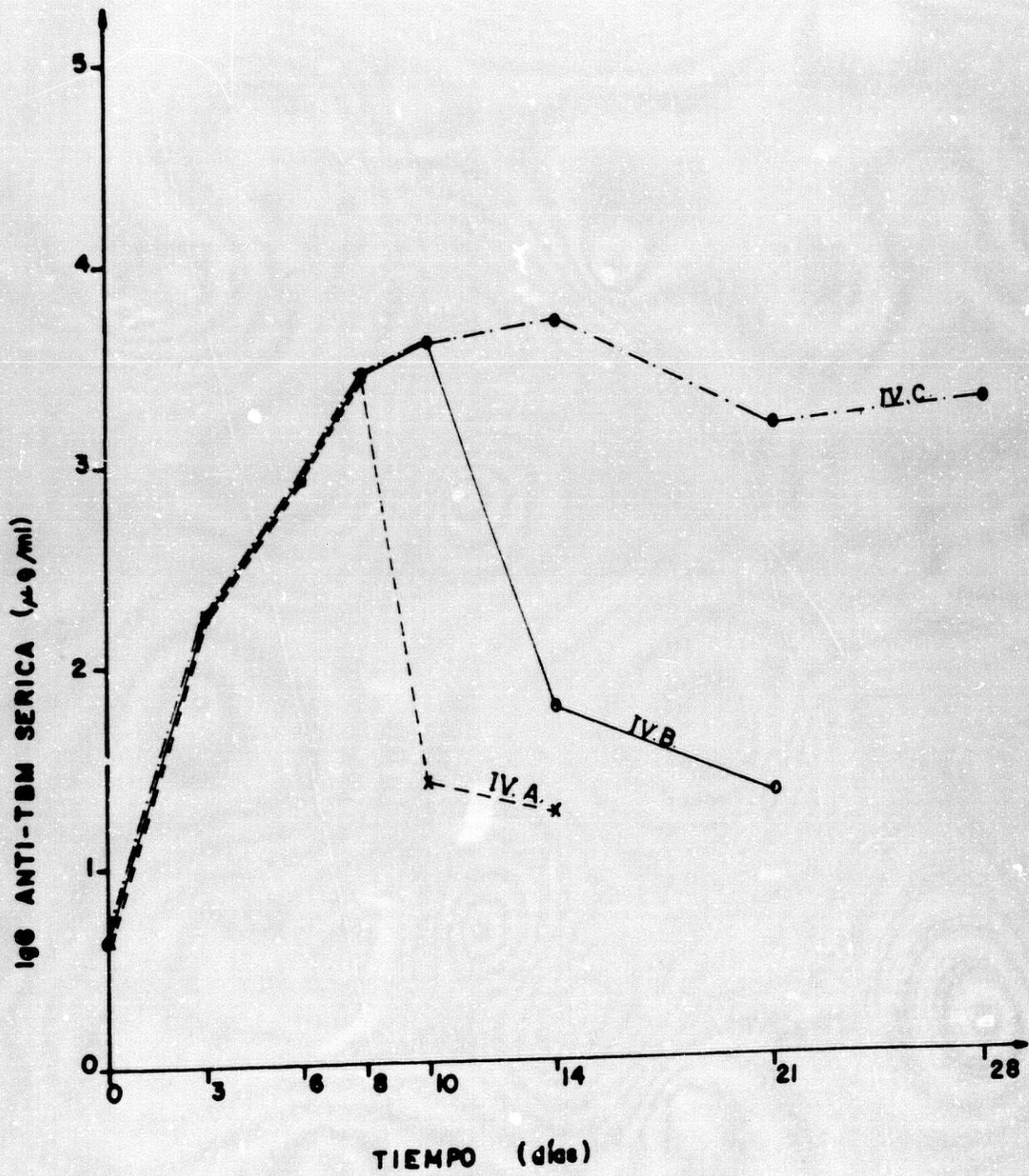


Tabla X: Anticuerpos anti-MBT circulantes. Grupo IV.

catorce). No obstante, si el tratamiento con CSA era prolongado durante dos o más días, los niveles de IgG anti-MBT caían precozmente (1,4  $\mu\text{g/ml}$  y 0,7  $\mu\text{g/ml}$  en grupo V-B y V-C respectivamente) (Tabla XI).

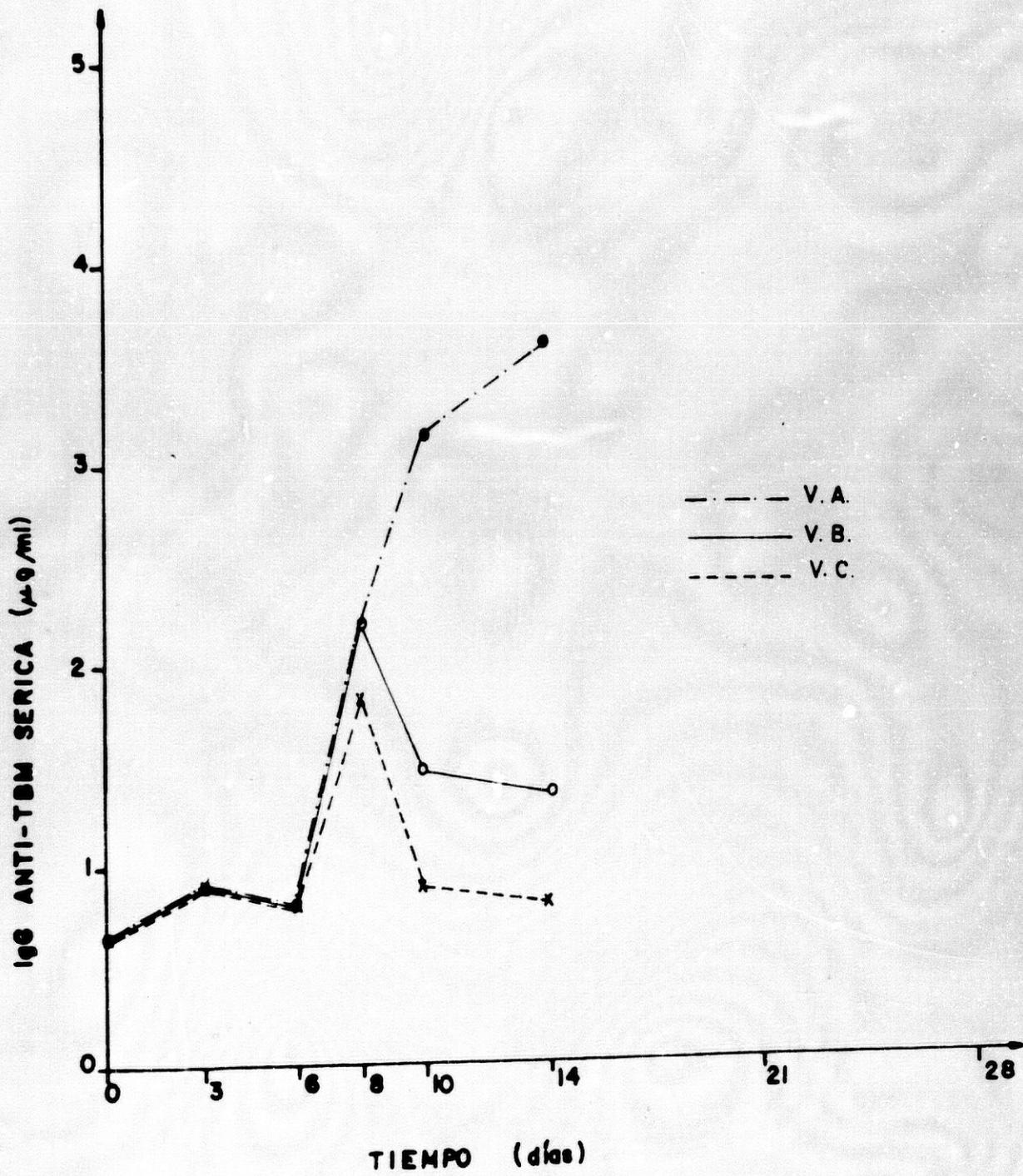


Tabla XI: Anticuerpos anti-MBT circulantes. Grupo V.

5. DISCUSSION

## 5. DISCUSION

La inmunización de ratas BN con MBT heteróloga (BOV) produce una NTI que representa un modelo experimental de enfermedad autoinmune (Lehman et al., 1974). Este proceso viene caracterizado histológicamente por un infiltrado inflamatorio intersticial irregularmente distribuido que varía sustancialmente en su composición a lo largo del experimento. Así, entre los días 8 y 10 postinmunización este infiltrado está constituido por leucocitos polimorfonucleares que, progresivamente, disminuyen en número estando prácticamente ausentes en la tercera semana. Entre los días 13 y 18, casi todas las células son identificadas como de estirpe mononuclear, y localizadas predominantemente en zonas de daño tubular severo se aprecian células gigantes multinucleadas.

Serológicamente, la enfermedad queda definida por la presencia de anticuerpos anti-MBT que se detectan en el día 3 y que continúan aumentando a lo largo del experimento. El estudio por inmunofluorescencia directa revela la existencia de depósitos de IgG en MBT

que adoptan un patrón lineal a partir del día 8 postinmunización. También se observan depósitos de  $C_3$  con un patrón similar pero de menor intensidad.

Parece claro, por tanto, que el hecho más precozmente detectado en la evolución de la enfermedad es la presencia de anticuerpos anti-MBT permitiendo suponer que éstos anticuerpos juegan un papel central en el inicio de la enfermedad (Lehman et al., 1974; Zanetti et al., 1983; Bannister et al., 1986; Zanetti, Wilson, 1983), estando el desarrollo de la misma en relación con la cantidad de anticuerpos depositados en MBT (Lehman et al., 1974). Estos anticuerpos presentan un evidente poder nefritogénico, estando la mayoría dirigidos contra una fracción de MBT resultante de su digestión con colagenasa (Zanetti y Wilson, 1983) que resulta en la precipitación de un antígeno tubular de aproximadamente 43 kd. La administración de un modo pasivo de anticuerpos heterólogos anti-idiotipo produce una disminución en la tasa de anticuerpos anti-MBT circulantes (Zanetti y Wilson, 1983).

Los datos histológicos, inmunohistoquímicos y serológicos de enfermedad túbulointersticial son reproducibles en los animales del grupo I, es decir en aquéllos utilizados como control. Sin embargo en las ratas del grupo III, en las que la administración de CSA comenzaba en el día previo a la inmunización, existía una prevención de la enfermedad sin alteraciones histológicas, depósitos tubulares y con títulos de anticuerpos anti-MBT permanentemente bajos, similares a los del grupo II.

La CSA, por tanto, se muestra eficaz en evitar la producción de anticuerpos anti-MBT por parte de células P. La observación de Borel et al., 1977, que la CSA no afecta la producción de anticuerpos frente a lipopolisacáridos, que funcionarían como antígenos T-independientes en ratones atímicos, supondría que la actividad de la droga estaría restringida al compartimento celular T. Este punto de vista es mantenido por la observación de que la CSA no inhibe la proliferación de células B "in vitro" a dosis en las que produce inhibición de la actividad T (Bird et al., 1980; Leapman et al.,

1980). Frente a ello parece que la CSA afecta en la misma extensión a la transformación de células B y T frente a mitógenos Pokeweed o antígenos de *Stafilococcus Aureus*. Sin embargo, el problema que se plantea es que la activación de células B resultante de la exposición a estos mitógenos, puede no ser enteramente independiente de células T y que la inhibición observada podría ser consecuencia de una inhibición de la actividad T celular. Kunkel y Klaus, 1980, han demostrado la existencia en ratones de dos tipos de antígenos T-independientes que se corresponderían con dos subtipos de células B. Uno de estos grupos supondría una respuesta humoral normal o supranormal en animales totalmente suprimidos con CSA, mientras que los anticuerpos frente al segundo grupo (que incluye lipopolisacáridos) serían totalmente suprimidos por CSA.

En el modelo experimental estudiado por nosotros cabría pensar que los antígenos que desencadenan la respuesta inmune, es decir los antígenos de MBT de 43 Kd anteriormente expresados, pertenecerían al segundo tipo, pudiendo la CSA inhibir a células macrofágicas o células T cooperadoras que establecerían un estímulo para la activación y diferenciación de células B (existiendo así mismo una

falta de respuesta de la función de la célula B como presentadora de antígeno) (Britton y Palacios, 1982).

La posible implicación patogénica de una falta de producción de autoanticuerpos anti-idiotipo en el curso de la NTI como consecuencia de la acción de células T supresoras que se desarrollarían precozmente después de la inmunización (Neilson et al., 1984), no parece ser corroborada con el empleo de CSA, ya que ésta facilita la inducción de células supresoras aloantígeno específicas (Yoshimura et al., 1983; Tutschka et al., 1981) sugiriéndose la existencia de un mecanismo alternativo que permita la amplificación de la acción supresora y que sería independiente de la IL-2 (Hess et al., 1983). Es posible que de modo similar a como Wagner et al., 1981, encuentran un factor de diferenciación, requerido para la maduración de linfocitos T citotóxicos, exista un factor de aumento de células supresoras que es posible, que en ausencia de CSA, puede actuar de modo singénico con la IL-2.

Este hecho podría ser también mantenido por la evidencia observada en receptores de trasplante renal, que, tratados con CSA muestran un número disminuido de células T cooperadoras, estando mantenido el

número de células supresoras con lo que existiría una distorsión relativa en los linfocitos T reguladores con, el subsiguiente cambio en el balance inmunológico (Kahan et al., 1982; Luidor et al., 1986).

En los estudios de artritis experimentales en roedores (Agus et al., 1985), así como en series de pacientes con lupus eritematoso sistémico tratados con CSA (Feutren et al., 1986) parece deducirse que la droga administrada desde el momento de la inmunización o durante la fase efectora precoz de la enfermedad, produciría una moderada supresión de la inmunidad humoral, mientras que la administración de CSA más tarde durante la fase efectora no produciría cambios, en los títulos de anticuerpos anti-DNA. Tal como se aprecia en los animales incluidos en el grupo IV, A y B de nuestra serie, en los que la CSA se administró cuando la enfermedad se encuentra ya en su fase efectora, existe una interrupción en la respuesta B establecida. El hecho de existir depósitos tubulares, aún con una caída de los títulos séricos de anticuerpos anti-MBT vendría a significar que el depósito de los anticuerpos se produce con anterioridad a la administración de la droga y que en función de su

escasa cantidad serían incapaces de desarrollar la enfermedad, tal como demostró Lehman en el sentido de que el desarrollo de la NTI estaría en relación con la cantidad de anticuerpos anti-MBT depositados en respuesta a antígenos de la MBT (Lehman et al., 1974). Así, por ejemplo, aunque la rata Lewis no carece de antígenos reactivos, éstos presentan un epitope o epitopes inaccesibles al anticuerpo, produciendo estas ratas altas cantidades de anticuerpos anti-MBT al ser inmunizadas con MBT heteróloga, pero no desarrollando la enfermedad al no depositarse estos anticuerpos en la MBT (Bannister y Wilson, 1986). La importancia que la tasa de anticuerpos tiene en el desarrollo de la enfermedad, quedaría también demostrada por la dificultad en efectuar la transferencia pasiva de la enfermedad a través del suero de ratas EN enfermas, siendo esto debidamente a las pequeñas cantidades de anticuerpos nefritogénicos que existen en la circulación de estas ratas inmunizadas ya que la mayoría estarían depositadas en riñón. Sin embargo, utilizando suero de ratas Lewis inmunizadas, que producen anticuerpos pero que no se depositan en la MBT, es posible transferir previamente la enfermedad a ratas BN (Bannister y Wilson, 1986).

Esta importancia en la cantidad de anticuerpos también queda expresada por el hecho observado en las ratas del grupo IV-C en las que no se modifica el curso de la enfermedad cuando el tratamiento con CSA se inicia en el día 14 postinmunización, y en las que a pesar de existir títulos de anticuerpos anti-MBT más bajos que en los grupos controles, éstos son ya suficientemente altos como para desencadenar un daño inflamatorio intersticial.

La importancia de la duración del tratamiento queda reflejada en el comportamiento de la enfermedad en los animales del grupo V. Así, mientras las ratas que recibían un curso de tratamiento de cinco días de duración mostraban solamente una discreta reducción en las lesiones túbulointersticiales y no se modificaban los títulos y depósitos de anticuerpos anti-MBT, en los animales en los que se prolongaba el tratamiento dos o más días, se asistía a una completa detención de la enfermedad. Este hecho podría explicarse por el posible efecto que la CSA podría tener sobre nuevas generaciones de células efectoras no sensibilizadas que fracasarían en su activación ya que si bien la vida media de la mayoría de los linfocitos en múridos es de 53 días (Lancet, 1985;

Norman et al., 1965), hay además una pequeña población de linfocitos de "vida corta" que sobreviven solamente horas o días. Esta aproximación podría tener la implicación teórica de que en enfermedades autoinmunes mediadas por una población linfocitaria de "larga vida" la posible respuesta al tratamiento con CSA podría aparecer meses e incluso un año después de iniciado el tratamiento, siendo la respuesta a la droga más rápida en enfermedades mediadas por linfocitos de "vida corta".

La importancia de la inmunidad de base celular en este modelo de NTI experimental queda definida por la posibilidad de reproducir la enfermedad por medio de transferencia pasiva de células de ganglios linfáticos y células de exudados peritoneales obtenidos de ratas BN inmunizadas (Lehman y Wilson, 1976). Otro hecho que aboga por el papel que juega la inmunidad celular es que el infiltrado monocelular que aparece en el intersticio en el día trece postinmunización, está constituido predominantemente por células T. El análisis de estas células muestra un predominio de células W3/25<sup>+</sup> es decir, linfocitos T-cooperadores, que también predominan en bazo y sangre periférica, indicando ésto una

prevalencia de subpoblación T cooperadora que expresan antígeno - Ia (Mampaso y Wilson, 1983; Ulich et al., 1985). Los porcentajes de monocitos y macrófagos que se observan en bazo y sangre periférica son iguales a los que aparecen en animales controles, siendo su número en riñón más elevado, sugiriendo este hecho la posible existencia de factores a nivel de órgano diana, probablemente relacionados con la infiltración celular T, y pudiendo ocurrir algo similar a lo que Tipping et al., 1985, encuentran en un modelo experimental de glomerulonefritis representando las células macrófagicas Ia positivas un papel preminente en el brazo aferente de la respuesta inmune (Schreiner y Unanue, 1984) y que el tratamiento con CSA prevendría el influjo de Linfocitos T-cooperadores y monocitos.

En nuestro modelo existe una ausencia de infiltrado inflamatorio tras la administración de CSA a las ratas de los grupos III, IV-A y IV-B y V-B y V-C. Este hecho pone de manifiesto la acción de la CSA sobre la población linfocitaria T, quedando esto también constatado desde el punto de vista clínico, por el hecho de una efectividad mayor de la droga en enfermedades de base autoinmune

en las que predomina una respuesta celular como son, o se supone que son, procesos del tipo de Uveítis, Psoriasis, Diabetes tipo I y Artritis Reumatoidea (Bach, 1981). Esta influencia positiva de la CSA se ha observado también en modelos experimentales en los que la inmunidad celular tiene un papel fundamental como es el caso de la EAE (Bolton et al., 1982; Hinrichs et al., 1983), sugiriéndose que la CSA puede actuar sobre la población celular T si su administración se produce antes de que ocurra la activación celular, tal como se observa en nuestro modelo en el grupo IV-C en el que la droga se administraba en el día 14 postinmunización, momento en el que ya se ha producido la activación T. Del estudio de este mismo grupo podría deducirse una menor sensibilidad a la droga por parte de la inmunidad de base humoral, condicionada por el hecho de la presencia de depósitos inmunofluorescentes en MBT, que no obstante, son incapaces de desarrollar daño a nivel tisular.

No parece ofrecer dudas el hecho de que la IL-2 es uno de los principales reguladores de la respuesta inmune. La IL-2 es una citoquina de peso molecular 15.000 que es producida como conse-

cuencia de la interacción del antígeno, previamente procesado por el macrófago, con receptores de la célula T (Dinarello, Mier, 1987). El antígeno es presentado por el macrófago asociado a moléculas de Clase II uniéndose a la subunidad T<sub>i</sub> del receptor T, funcionando la subunidad T<sub>3</sub> (CD<sub>3</sub>) de este receptor como transdutora de la señal funcional generada (Royer y Reinherz, 1987). La proliferación de células T ocurrirá como consecuencia de las interacciones entre el receptor de la célula T, la IL-2 y el receptor de IL-2 (Smith et al., 1980; Meuer et al., 1984).

Aunque las células T en reposo no expresan receptores para IL-2 tienen un número máximo de receptores de antígeno (Royer y Reinherz, 1987), en los que al producirse la unión de éste, condicionan la inducción de receptores de IL-2. Esta activación también permite la inducción endógena de la IL-2, secreción de la sustancia y subsiguiente unión a los receptores de IL-2 en las mismas células precursoras de células T citolíticas y tal vez sobre células T supresoras (Lancet, 1985).

Cuando un número crítico de receptores de IL-2 se unen con IL-2 se

produce una síntesis de DNA entrando la célula en mitosis. Si la estimulación antigénica cesa se produce una reducción en el número de receptores de IL-2 y un aumento del complejo Ti-T<sub>3</sub> en la superficie celular (Royer y Reinherz, 1987)

Se ha especulado que la CSA interaccionaría con linfocitos T a través de la existencia de un receptor específico para la droga. Con el empleo de CSA marcada con iodo radiactivo (que no es biológicamente activa) no se observa un incremento en su unión a la superficie linfocitaria (Leoni et al., 1978). Sin embargo, tras el empleo de Dihidro-CSA tritiada, que sí es biológicamente activa, se puede observar un patrón de unión específico (Ryffel et al., 1980) con una marcada avidez por linfocitos T-cooperadores (Khan et al., 1982) a diferencia de lo que sucede en células supresoras y células B que muestran menos avidez sin que exista un punto de saturación detectable.

Sin embargo, Le Groc et al., 1983, han postulado la teoría de que los efectos de la CSA derivarían de la acción de esta droga sobre la membrana celular, sin la participación de un receptor específico, a través de una partición de la doble capa fosfolipídica.

Los efectos de la CSA sobre los distintos subtipos celulares, por tanto, y específicamente sobre la liberación de IL-2 por células T-cooperadoras, pueden deberse a una disrupción selectiva en la función de la membrana celular relacionada con el flujo iónico y de lípidos. La especificidad de la CSA en la modulación de factores precoces en la activación celular podría desarrollarse a partir de diferencias en los mecanismos electroquímicos utilizados por varias poblaciones linfocitarias y no sobre la unión específica de la droga. Esto podría explicar la aparente resistencia de células T supresoras, células NK, células B y células T efectoras maduras a la acción de la CSA.

En cualquier caso, pueden plantearse dos hipótesis en cuanto a los mecanismos de acción de la CSA a nivel subcelular:

#### 1 - Inhibición de la activación

Larsson, 1980, sugiere que la CSA actuaría inhibiendo la expresión

del receptor de IL-2. Esto parece estar confirmado por Palacios y Moller, 1981, al no detectar expresión de Ia sobre la superficie de las células T activadas inhibidas por CSA. El hecho también de que células T expuestas a CSA no unen el anticuerpo monoclonal OKT-3, que tiene afinidad por el complejo T3 del receptor antigénico del linfocito T (Schwartz, 1985), sugeriría que la CSA actúa sobre este receptor o sobre una zona íntimamente relacionada con él (Britton y Palacios, 1982).

## 2 - Inhibición de la segunda señal

La CSA no afectaría la activación de células T sino que actuaría ejerciendo un efecto inhibitorio selectivo sobre la secreción y/o producción de IL-2 (Bunjes et al., 1982). Esta inhibición no sería debida a una acción de la droga sobre la célula macrofágica secretante de IL-1, sino a una deficiencia en la expresión o función de la población T que induce al macrófago a segregar dicha IL-1 (Mizel, 1982). Esto ha sido comprobado experimentalmente con la adición de IL-2, la cual es capaz de reconvertir parcialmente el efecto inhibitorio de la CSA, hecho que no es posible conseguir

al añadir IL-1 (Kronke et al., 1984).

La serie de modificaciones del metabolismo celular que van a conducir en última instancia a un déficit de secreción de IL-2 pueden estar en relación con la presencia de receptores citosólicos para CSA, en forma de proteínas del tipo de la ciclofilina y calmodulina (Truffa-Bachi, 1987) y con la inhibición de la transcripción genética de células T a través del ARNm para IL-2 (Ryffel et al., 1988).

El empleo de CSA puede suponer una toxicidad, condicionando ésto un factor limitante en su uso (Shevach, 1985; Murray, 1986). A dosis bajas la función inmunosupresora de la droga se acompaña de una reducción de la función renal que muestra un carácter de reversibilidad sin que se traduzca en alteraciones morfológicas, o bien apareciendo como vacuolización isométrica en células del epitelio tubular, megamitocondrias y microcalcificaciones.

Sin embargo, a concentraciones más altas la CSA causa una inhibición del crecimiento y citotoxicidad de las células de origen linfoide y no linfoide, que no es IL-2 dependiente y que

probablemente esté en relación con una inhibición de la síntesis proteica (Ryffel et al., 1988).

En nuestro modelo, la CSA utilizada a dosis relativamente bajas (20 mg/kg/día) no parece inducir efectos tóxicos al no revelar los exámenes histológicos realizadas alteraciones tanto en los animales tratados con CSA y sin inmunizar del Grupo II, utilizados como controles, ni en el resto de las ratas en las que la droga se utilizó como tratamiento de la NTI en ratas inmunizadas.

La toxicidad funcional que aparece tras la administración a dosis bajas parece ser debida a fenómenos de vasoconstricción condicionados por alteración en la síntesis de prostaglandinas (Murray et al., 1985), incremento de la actividad renina-angiotensina (Murray et al., 1985; Siegel y Ryffel, 1982) o incremento en el estímulo nervioso renal (Moss et al., 1985); mientras que la nefrotoxicidad condicionada por el empleo de dosis más altas podría estar en relación con la acción directa de la droga sobre el endotelio vascular y células musculares lisas de los vasos, llegando a producir una fibrosis intersticial focal y una disminución en el número de elementos funcionales renales (Ryffel et al., 1988).

6. CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

1º - La CSA ejerce un efecto supresor sobre la inmunidad de base humoral responsable del inicio de la NTI en ratas BN.

2º - La CSA inhibe la respuesta inmunológica mediada por células, responsable de la progresión de la enfermedad.

3º - La acción de la CSA sobre la inmunidad de base celular es de mayor entidad que la acción sobre la inmunidad de base humoral.

4º - El empleo de CSA parece demostrar que la falta de producción de anticuerpos anti-idiotipo en la NTI en ratas BN no parece ser debida a la existencia de una célula T supresora. Esto podría poner de manifiesto que la proliferación de células T no es en todos los casos IL-2 dependiente, pudiendo existir otras citoquinas o factores solubles que no son inhibidos por la CSA.

5º - Un ciclo de tratamiento de 7 días de duración con CSA, comenzando el día previo a la inmunización, suprime el desarrollo de la respuesta humoral.

6º - El retraso en el inicio del tratamiento con CSA hasta el día 10 postinmunización, una vez que la respuesta humoral está establecida, reduce los niveles de anticuerpos anti-MBT circulantes con ausencia de infiltrados inflamatorios intersticiales.

7º - Si la CSA es administrada en el día 14, una vez que la enfermedad está establecida activamente, no se produce ninguna modificación en los niveles de anticuerpos anti-MBT séricos, depósitos en MBT y daño inflamatorio intersticial.

8º - Utilizada a dosis de 20 mg/kg/día la CSA no parece inducir efectos nefrotóxicos desde el punto de vista histológico.

9º - La CSA utilizada subcutáneamente evita los efectos adversos derivados de factores tan lábiles como apetito o absorción

intestinal permitiendo un dosaje más exacto de la droga.

10° - En definitiva, el empleo de la CSA en un modelo experimental de NTI autoinmune en ratas BN tiene un efecto terapéutico en el inicio y desarrollo de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, AK.; Corson, JM.; Carpenter, CB. et al. (1974):

Immunologic enhancement of rat renal allografts. II Am. J. Pathol. 75, 271.

- Agus, D.; Mann, R.; Cohn, D. et al. (1985):

Inhibitory role of dietary protein restriction on the development and expression of immune mediated anti-tubular basement membrane induced tubulointerstitial nephritis in rats. J. Clin. Invest. 76, 930.

- Allam, Br.; Tillman, JE.; Thomson, TJ. et al. (1987):

Effective intravenous cyclosporin therapy in a patient with severe Crohn's disease on parenteral nutrition. Gut 28, 1166.

- Allison, MC.; Pounder, RE. (1987):

Cyclosporin for Crohn disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 1, 39.

- Andrés, GA.; Szymanski, C.; Albini, B. et al. (1979)

Structural observations on epithelioid and giant cells in experimental autoimmune tubulointerstitial nephritis in guinea pigs. Am. J. Pathol. 96, 21.

- Assan, R.; Feutren, G.; Debray Sachs, M. et al. (1985):

Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type I diabetes mellitus. *Lancet* I, 67.

- Atkinson, K.; Boland, J.; Britton, K. (1983):

Blood and tissue distribution of Cyclosporine in humans and mice. *Transplant. Proc.* 15, 2430.

- Bach, JF. (1988):

Cyclosporine in Autoimmunity. *Transplant. Proc.* 20 (3), Suppl. 4., 379.

- Bannister, KM.; Wilson, CB. (1986):

Transfer of tubulointerstitial nephritis in the Brown Norway rat with anti-tubular basement membrane antibody: quantitation and Kinetics of binding and effect of de complementation. *J. Immunol.* 135, 3911.

- Baran, D.; Vendeville, B.; Viol, MC. et al. (1986):

Effect of Cyclosporina A on mercury-induced autoimmune glomerulonephritis in the Brown Norway rat. *Clin. Nephrol.* 25, Suppl. 1, 175.

- Barrett, A.J.; Kendra, J.R.; Lucas, C.F. et al. (1982):

Cyclosporina A as prophylaxis against graft-versus-host disease in 36 patients. Br. Med. J. 285, 162.

- Bendtzen, K.; Tvede, N.; Andersen, V.; Bendixen, G. (1984):

Cyclosporin for polymyositis. Lancet I, 792.

- Benkers, R.; Scholm, S.W. (1987):

Effect of cyclosporine and Cyclosporine+Prednisone in primary biliary Cirrhosis. Abstracts II International Congress of Cyclosporin, Washington, 101.

- Bird, A.G.; McLachlan, S.M.; Britton, S. (1980):

Cyclosporin A promotes spontaneous outgrowth in vitro of EB virus induced V cell lines. Nature 289, 300.

- Bolton, C.; Allsopp, G.; Cuzner, M. (1982):

The effect of cyclosporin A on the adoptive transfer of experimental

allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. Clin. Exp. Immunol. 47, 127.

- Boitard, C.; Debray Sachs, M.; Chatenoud, L.; Bach, JF. (1988):

The effect of Cyclosporine A on humoral and cellular immunity in Insulin-dependent (Type I) Diabetes Mellitus. Transplant. Proc. 20 (3) Suppl. 4, 193.

- Borel, JF. (1983):

Cyclosporine: Historical perspectives. Transplant. Proc. 15 (1), Suppl. 1, 2219.

- Borel, JF.; Feurer, C.; Maguee, C.; Staheling, H. (1977):

Effects of the new anti-lymphocytic peptide Cyclosporin A in animals. Immunology 32, 1017.

- Britton, S.; Palacios, R. (1982):

Cyclosporin A: usefulness, risks and mechanism of action. Immunol. Rev 65, 5.

- Brodehl, J.; Hoyer, PF.; Oemar, BS.; Woingeit, K. (1987):

Cyclosporine treatment of nephrotic syndromes in children. Abstracts II  
International Congress of Cyclosporin. Washington, 74.

- Brown, CA.; Carey, K.; Colnin, RB. (1979):

Inhibition of autoimmune tubulointerstitial nephritis in guinea pigs by  
heterologous antisera containing antiidiotypic antibodies. J. Immunol.  
123, 2102.

- Bunjes, D.; Hardt, C.; Solbach, W. et al. (1982):

Studies on the mechanism of the action of Cyclosporin A in the murine  
and human T cell response in vitro. In: Cyclosporin A, Ed. White, DJG.;  
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 261.

- Calne, RY.; Rolles, K.; White, DJG. et al. (1979):

Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients  
of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreas and 2 livers. Lancet 2,  
1033.

- Calne, RY.; White, DJG.; Evan, DB. (1981):

Cyclosporin A in cadaver organ transplantation. Br. J. Med. 282, 934.

- Calne, RY.; White, DJG.; Retlow, BD. et al. (1979):

Cyclosporin A: Preliminary observations in dogs with pancreatic duodenal allografts and patients with cadaveric renal transplant. Transplant. Proc. 11, 860.

- Calne, RY.; White, DJG.; Thiru, S. et al. (1978):

Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet 2, 1323.

- Canadian Multicentre Transplant Study Group. (1983):

A randomized clinical trial of cyclosporin in clinical renal transplantation. N. Engl. J. Med. 309, 809.

- Devineni, R.; Mc Kenzie, N.; Duplan, J. et al. (1983):

Renal effects of cyclosporine: Clinical and experimental observations.

Transplant. Proc. 15, Suppl. 1, 2695.

- Dieperink, H.; Starklint, H.; Leyssac, PP. (1983):

Nephrotoxicity of Cyclosporine - An Animal model: Study of the nephrotoxic effect of Cyclosporine on overall renal and tubular function in conscious rats. Transplant. Proc. 15, Suppl. 1, 2736.

- Dinarello, ChA.; Mier, JW.; (1987):

Lymphokines. N. Engl. J. Med. 317 (15), 940.

- Drachman, DB.; Adams, RN.; Mc Intosh, K.; Peitronk, A. (1985):

Treatment of experimental myasthenia gravis with Cyclosporin A. Clin. Immunol. Immunopathol. 34, 174.

- Dreyffus, M.; Härrri, E.; Hofmann, H. et al. (1976):

Cyclosporin A and C. New metabolites from *Trichoderma polysporum* Rifai. Europ. J. Appl. Microbiol. 3, 125.

- Ellis, CN.; Gorsulowsky, DC.; Hamilton, TA. et al. (1986):

Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *J. Am. Med. Assoc.* 256, 3110.

- Erard, D.; Moulonguet-Doleris, D.; Anffredon, MT. et al. (1979):

Specificity of autoantibodies to heterologous glomerular and tubular basement membranes in BALB/c mice. *Clin. Exp. Immunol.* 38 (2), 259.

- European Multicentre Trial Group. (1983):

Cyclosporine in cadaveric renal transplantation: One year follow-up of multicentre trial. *Lancet* 2, 986.

- Ferguson, RM.; Rynasicwicz, JJ.; Sutherland, DE. (1982):

Cyclosporin A in renal transplantation: a prospective randomized trial. *Surgery* 92 (2), 175.

- Feutren, G.; Assan, R.; Karsenty, G. et al. (1986):

Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. *Lancet* II, 119.

- Feutren, G.; Querin, S.; Tron, F. et al. (1986):

The effect of cyclosporin in patients with systemic lupus. *Transplant. Proc.* 18, 643.

- Flechner, S.M.; Payne, W.D.; Van Buren, C.T. (1983):

The effect of Cyclosporine on early graft function in human renal transplantation. *Transplantation* 36, 268.

- Foley, R.J.; Van Buren, C.T.; Hammer, R.; Weinmann, E.J. (1983):

Cyclosporine-Associated hyperkalemia. *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 2726.

- French Constant, C.; Wolman, R.; Geraint, J.D. (1983):

Cyclosporin in Behçet's disease. *Lancet* II, 454.

- Graffenried, B.V. (1987):

Guidelines for use of Sandimmun (Cyclosporin) in patients with autoimmune disease. Sandoz Ltd., Basle Clinical Research, April.

- Gunn, HC.; Ryffel, B. (1986):

Glomerulonephritis in NZB/W mice: Therapeutic effect of cyclosporine.  
Clin. Nephrol. 25, Suppl. 1, 5189.

- Hardesty, RL.; Griffith, BP.; Debski, RF.; Bahnson, HT. (1983):

Experience with cyclosporine in cardiac transplantation. Transplant.  
Proc. 15, 2553.

- Heinrichs, DJ.; Wegmann, KW.; Peters, BA. (1983a):

The influence of Cyclosporin A on the development of actively induced  
and passively transferred experimental allergic Encephalomyelitis.  
Cellular Immunol. 77, 202.

- Heinrichs, DJ.; Wegmann, KW.; Peters, BA (1983b):

The influence of Cyclosporin A on the development of actively induced  
and passively transferred experimental allergic Encephalomyelitis.  
Cellular Immunol, 77, 202.

- Henle, F.; Van Joost, T.; Benkers, R. (1986):

Cyclosporin in the treatment of lupus erythematosus. Arch. Dermatol.  
122, 973.

- Hess, AD.; Donnenberg, AD.; Engel, P. et al. (1983):

Suppressor-cell amplification circuitry in Cyclosporine treated MLR  
cultures. transpl. Proc. 15, Suppl. 1, 2343.

- Hows, JM.; Smith, JM.; Banghan, A.; Gordon-Smith, EC. (1983):

Nephrotoxicity in marrow graft recipients treated with Cyclosporine.  
Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2708.

- Hunt, SA. (1983):

Complications of heart transplantation. Heart Transplant. 3, 70.

- Hyman, LR.; Steinberg, AD.; Calvin, RB.; Bernard, EF. (1976):

Immunopathogenesis of autoimmune tubulointerstitial nephritis. II. Role

of an immune response gene linked to the mayor histocompatibility locus. *I. Immununol.* 117, 1894.

- Isenberg, DA.; Swaith, ML.; Morrow, WJW. (1981):

Cyclosporine A for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Int. J. Immunopharmacol.* 3, 163.

- Kahan, BD.; Kerman, RH.; Agostino, G. et al. (1982):

The action of Cyclosporin A on human lymphocytes. In: *Cyclosporin A*, Ed. White, DJG.; Elsinier Biomedical Press, Amsterdam, p. 281.

- Khan, BB.; Van Buren, CT.; Lin, SN. et al. (1982):

Pharmacokinetics of Cyclosporin A in renal allograft recipients. In: *Cyclosporin A*, Ed. White, DJG.; Elsenier Biomedical Press, Amsterdam, p. 413.

- Klintmalm, GB.; Iwastuki, S.; Starzl, TE. (1981):

Cyclosporin A hepatotoxicity in 66 renal allograft recipients. *Transplantation* 32, 488.

- Klintmalm, GB.; Ringden, O.; Groth, CG. (1983):

Clinical and laboratory signs in nephrotoxicity and rejection in Cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 2815.

- Kobrenski, JE.; (1983):

The nephrotoxicity of Cyclosporine *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 3157.

- Kreiger, A.; Thoenes, GH.; Gunther, E. (1981):

Genetic control of autoimmune tubulointerstitial nephritis in rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 21, 301.

- Kronke, M.; Leonard, WS.; Depper, JM. et al. (1984):

Cyclosporin A inhibits T cell growth factor gene expression at the level of a RNA transcription. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* 81, 3209.

- Kunkel, A.; Klaus, GGB. (1980):

Selective effects of Cyclosporin A on functional B cell subsets in the

mouse. J. Immunol. 125, 2526.

- Larsson, EL. (1980):

Cyclosporin A and Dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting at distant sites of the triggering process. J. Immunol. 124, 2828.

- Leapman, SB.; Filo, RS.; Smith, EJ. et al. (1980):

Effects of Cyclosporin A on the generation of primed lymphocytes in vitro. Transplant. Proc. 13, 405.

- Le Groc, SJ.; Friedman, AW. Kahan, BD. (1983):

Lack of evidence for a Cyclosporine receptor on human lymphocyte membranes. Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2259.

- Lehman, DH.; Marquardt, J.; Wilson, CB.; Dixon, FJ. (1974):

Specificity of auto-antibodies to tubular and glomerular basement membrane induced in guinea pigs. J. Immunol. 12, 241.

- Lehman, DH.; Wilson, CB. (1976):

Role of sensitized cells in antitubular basement membrane interstitial nephritis. *Int. Arch. Allergyc Appl. Immunol.* 51, 168.

- Lehman, DH.; Wilson, CB.; Dixon, FJ. (1974):

Interstitial nephritis in rats immunized with heterologous tubular basement membrane. *Kidney Int.* 5, 187.

- Leoni, P.; García, RC.; Allison, AC. (1978):

Effects of Cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *J. Clin. Lab. Immunol.* I, 67.

- Luidor, KD.; Wiesner, RU.; Katzman, JA.; Homburger HA. (1986):

Selective activation of suppressor T lymphocytes by Cyclosporin A in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Transplant. Proc.* 18, 893.

- Mampaso, F.; Wilson, CB. (1983):

Characterization of inflammatory cells in autoimmune tubulointerstitial nephritis in rats. *Kidney Int.* 23, 448.

- Melzer, JS.; Feduska, NJ.; Amend, WJ. et al. (1985):

Use of Cyclosporine and ATGAM in the early postoperative treatment of cadaver transplant recipients. (Abstract) American Society of Transplant Surgeons.

- Merión, RM.; White, DJ.; Thiru, S. et al. (1984):

Cyclosporine: Five years experience in cadaveric renal transplantation  
N. Engl. J. Med. 310, 148.

- Meuer, SC.; Hussey, RE.; Cantrell, DA. et al. (1984):

Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin-2 dependent autocrine pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1509.

- Meyrier, A.; Simon, P.; Condamin, MC. (1987):

Remission with Cyclosporine of cortico-and immunosuppressor resistant nephrosis in the adult. Abstracts II International Congress of Cyclosporin, Washington, 71.

- Mihatsh, MJ.; Thiel, G.; Spichtin, HP: et al. (1983):

Morphological findings in kidney transplants after treatment with Cyclosporine. Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2821.

- Mizel, SB. (1982):

Interleukin 1 and T cell activation. Immunol. Rev. 63, 51.

- Moulonguet-Doleris, D.; Erard, D.; Anffredom, MT et al. (1981):

Specificity of antibodies to heterologous glomerular and tubular basement membranes in various strains of mice with different H-2 types. Clin. Exp. Immunol. 46 (1), 35.

- Morales, J.; Andrés, A.; Prieto, C. et al. (1987):

Usefulness of fractional excretion of sodium as index of Cyclosporine nephrotoxicity in renal transplantation. Abstracts II International Congress of Cyclosporin, Washington, 246.

- Moss, NG.; Powell, SL.; Folk, RJ. (1985):

Intravenous Cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated Kidneys in rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 8222.

- Murray, BM. (1986):

Cyclosporine nephrotoxicity. The Kindney 19 (2), 5.

- Murray, BM.; Paller, MS.; Ferris, TF. (1985):

Effect of Cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rat. Kidney Int. 28, 767.

- Neild, GH.; Ivory, K.; Hiramatsu, M. et al. (1983):

Cyclosporin inhibits acute serum sickness in rabbits. Clin. Exp. Immunol. 52, 586.

- Neild, GH.; Ivory, K.; Williams, DG. (1986):

Effect of Cyclosporine on proteinuria in chronic serum sickness in rats. Clin. Nephrol. 25, Suppl. 1. 5186.

- Neilson, EG.; Gasser, DI.; Mc Cafferty, E. et al. (1983):

Polymorphism of genes involved in antitubular basement membrane disease in rats. *Immunogenetics* 17, 55.

- Neilson, EG.; Jiménez, SA.; Phillips, SM. (1980):

Cell mediated immunity in interstitial nephritis. III. T Lymphocyte mediated fibroblast proliferation and collagen synthesis: An immune mechanism for renal fibrogenesis. *J. Immunol.* 125 (4), 1708.

- Neilson EG.; Mc Cafferty, E.; Mann, R. et al. (1985a):

Tubular antigen-derivatized cells induce a disease-protective, antigen-specific an idiotype-specific suppressor T cell network K restricted by I-J and Igh-V in mice with experimental interstitial nephritis. *J. Exp. Med.* 162, 215.

- Neilson, E.G.; Mc Cafferty, E.; Mann, R. et al. (1985b):

III. The selection of phenotypic (Lyt and L3T4) and idiotypic (RE-Id) T cell preferences by genes in Igh-1 and H-2K characterizes the cell

mediated potential for disease expression: Suceptible mice provide a unique effector T cell repertoire in response to tubular antigen. J. Immunol. 134, 2375.

- Neilson, EG.; Mc Cafferty, E.; Phillips, SM. (1984):

Antiidiotypic immunity in interstitial nephritis. II. Rats developing anti-tubular basement membrane disease fail to make an antiidiotypic regulatory response: The modulatory role of an RT7.1<sup>+</sup>, OX8<sup>-</sup> suppressor T cell mechanism. J. Exp. Med. 159, 1009.

- Neilson, EG.; Phillips, SM. (1979):

Cell mediated immunity in interstitial nephritis. I. T lymphocyte systems in nephritic ginea pigs: The natural history and diversity of the immune response. J. Immunol. 128, 2373.

- Neilson, EG.; Phillips, SM. (1979):

Cell mediated immunity in interstitital nephritis: II - T lymphocyte effector mechanism in nephritic guinea pigs: Analysis of the renotropic migration and cytotoxic response. J. Immunol. 123 (5), 2381.

- Neilson, EG.; Phillips, SM. (1981):

Cell-mediated immunity in interstitial nephritis. IV-Anti-tubular basement membrane antibodies can function in antibody dependent cellular cytotoxicity reactions: Observations on a nephritogenic effector mechanism acting as an informational bridge between the humoral and cellular immune response. J. Immunol. 126, 1990.

- Neilson, EG.; Phillips, SM. (1982a):

Suppression of interstitial nephritis by auto-anti-idiotypic immunity. J. Exp. Med. 155 (4), 179.

- Neilson, EG.; Phillips, SM. (1982b):

Murine interstitial nephritis. I. J. Exp. Med. 155 (4), 1075.

- Niandet, P.; Habib, E.; Broyer, M. (1987):

Cyclosporine for treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. Abstracts II International Congress of Cyclosporin, Washington, 73.

- Norman, A.; Sasaki, MS.; Ottoman, RE.; Fingerhut, RC. (1965):

Lymphocyte lifetime in women. Science 147, 745.

- Nuseenblatt, RB.; Rodrigues, MM.; Salinas-Carmona, MC. et al. (1982):

Modulation of experimental autoimmune uveitis with Ciclosporin A. Arch. Ophthalmol. 100, 1146.

- Opelz, G. (1985):

For the collaborative transplant study: Current relevance of the transfusion effect in renal transplantation. Transplant. Proc. 17, 1015.

- Oyer, PE.; Stinson, EB.; Jamieson, SW. et al. (1983):

Cyclosporine in cardiac transplantation: a 2 ½ year follow-up. Transplant. Proc. 15, 2546.

- Palacios, R.; Moller, G. (1981):

Cyclosporin A blocks receptor for HLA-DR antigens on T cells. Nature 190, 792.

- Petcher, T.J.; Weber, H.P.; Rügger, A. (1976):

Crystal and molecular structure of an iodo derivate of the cyclic undecapeptide Cyclosporin A. Helv. Chim. Acta 59, 1480.

- Pichlmayr, R.; Brotsch, C. Nerhans, P. et al. (1983):

Report on 68 human orthotopic liver transplantations with special reference to rejection phenomena. Transplan. Proc. 15, 1279.

- Powles, R.L.; Barrett, A.J.; Clink, H. et al. (1978):

Cyclosporine A for the treatment of graft-versus-host disease in man. Lancet 2, 1327.

- Powles, R.L.; Morgenstern, G.R.; Kay, H.E. et al. (1983):

Mismatched family donors for bone marrow transplantation as treatment for acute leukemia. Lancet I, 612.

- Ried, M.; Gibbon, S.; Kwok, D. (1983):

Cyclosporine levels in human tissues of patients treated for one week to one year. Transplant. Proc. 15, 2434.

- Rodger, RSC.; Turney, J.; Haines, I. et al. (1983):

Cyclosporine and liver function in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 2754.

- Rogers, AJ.; Kahan, BB. (1984):

Mechanism of action and clinical application of cyclosporine in organ transplantation. *Clin. Immunol. Allergy* 4, 217.

- Royer, HD.; Reinherz, EL. (1987):

T Lymphocytes: Ontogeny, function and relevance to clinical disorders. *N. Engl. J. Med.* 317 (18), 1136.

- Rudofsky, VH. (1980):

Spontaneous and induced autoantibodies to renal and non renal basement membranes in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15 (2), 200.

- Rudofsky, VH.; Esposito, LL.; Dilwith, RZ.; Pollara, B. (1977):

Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune renal tubulo-in-

terstitial disease in guinea pigs. Deposition of C3 PA on the tubular basement membranes. Clin. Immunol. Immunopathol. 8, 467.

- Rudofsky, VH.; Pollera, B. (1976):

Studies on the pathogenesis of experimental autoimmune renal tubulointerstitial disease in guinea pigs: II. Passive transfer of renal lesions by anti-tubular basement membrane autoantibody and nonimmune bone marrow cells to leukocyte-depleted recipients. Clin. Immunol. Immunopathol. 6 (1) 107.

- Rudofsky, VH.; Steblay, RW.; Pollara, B. (1975):

Inhibition of experimental autoimmune renal tubulointerstitial disease in guinea pigs by depletion of complement with cobra venom factor. Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 396.

- Rügger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H. et al. (1976):

Cyclosporin A ein immunsuppressiv wirksamer peptid metabolit aus Trichoderma Polysporum (Link ex Pers) Rifai. Helv. Chim. Acta 59 (4), 1075.

- Ryffel, B.; Donatsch, P.; Cotz, V.; Tschopp, M. (1980):  
Cyclosporin receptor on mouse lymphocytes. *Immunology* 41, 913.
  
- Ryffel, B.; Foxwel, BM.; Gee, A. et al. (1988):  
Cyclosporine relationship of side effects to mode of action. *Transplantation* 46 (Suppl.), 905.
  
- Schade, RR.; Guglielmi, A.; Van Thiel, DH. et al. (1983):  
Cholestasis in heart transplant recipients treated with Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 2757.
  
- Schreiner, GF.; Unanue, ER. (1984):  
Origin of the mesangial phagocyte and its expression of the leukocyte common antigen. *Lab. Invest.* 51, 513.
  
- Schrijver, G.; Wetzels, JEM; Assman, KJM. et al. (1987):  
Inhibition of proteinuria by Cyclosporine in passive anti-glomerular basement membrane nephritis in the mouse. Abstracts II International Congress of Cyclosporine, Washington, 83.

- Schwartz, RH. (1985):

T lymphocyte recognition of antigens in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* 3, 237.

- Shevach, EM. (1985):

The effects of ciclosporin A on the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 3, 392.

- Sibley, RK.; Ferguson, RM.; Sutherland, DER. et al. (1983):

Morphology of cyclosporine nephrotoxicity and of acute rejection in cyclosporine-prednisone immunosuppressed renal allograft rejections. *Transplant. Proc.* 15 (4), Suppl. 1, 2836.

- Siegel, H.; Ryffel, R. (1982):

Effect of Cyclosporin on renin-angiotensin-aldosterone system. *Lancet* 2, 1274.

- Sin autores (1985):

Cyclosporin in autoimmune disease. Editorial *Lancet*, April 20, 909.

- Smith, KA.; Baker, PE.; Gillis, S.; Ruscetti, FW. (1980):

Functional and molecular characteristics of T-cell growth factor. Mol. Immunol. 17, 579.

- Speck, B.; Gratwohl, A.; Osterwalder, B. et al. (1983):

Allogenic bone transplantation: The basel trial with cyclosporine  
Transplant. Proc. 15, 2617.

- Starzl, TE.; Hakala, TR.; Rosenthal, JT. et al. (1983):

The Colorado-Pittsburgh cadaveric renal transplantation study with  
Cyclosporine. Transplant. Proc. 15, 2459.

- Starzl, TE.; Iwatsuki, S.; Van Thiel, DH. et al. (1983):

Report of Colorado-Pittsburgh liver transplantation studies. Transplant  
Proc. 15, 2582.

- Steblay, RW.; Rudofsky, U. (1971):

Spontaneous renal lesions and glomerular deposits of IgG and complement  
in guinea pigs. J. Immunol. 107, 1192.

- Steblay, W.; Rudofsky, U. (1973):

Transfer of experimental autoimmune renal cortical tubular and interstitial disease in guinea pigs by serum. Science 180, 966.

- Storb, R.; Deeg, HJ.; Thomas, ED. et al. (1983):

Preliminary results of prospective randomized trials comparing methotrexate and Cyclosporine for prophylaxis of graft-versus-host disease after HLA-identical marrow transplantation. Transplant. Proc. 15, 2620.

- Sugisaki, T.; Klassen, J.; Milgrom, F. et al. (1973):

Immunopathologic study of an autoimmune tubular and interstitial renal disease in Brown-Norway rats. Lab. Invest. 28, 658.

- Sutherland, DE. (1983):

Pancreas transplantation: overview and current status of cases reported to the registry through 1982. Transplant. Proc. 15, 2597.

- Sutherland, DER.; Chinn, PL.; Goetz, FC. et al. (1983):

Experience with cyclosporine versus azathioprine for pancreas transplantation. Transplant. Proc. 15, 2606.

- Talal, N. (1988):

Cyclosporine as an immunosuppressive agent for autoimmune disease: Theoretical concepts and therapeutic strategies. *Transplant. Proc.* 20 (3), Suppl. 4, 11.

- Thaiss, F.; Mihatsch, M.J.; Batsford, S. et al. (1986):

Effect of Cyclosporine on in situ immune complex glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 25, Suppl. 1, 5181.

- Tipping, P.G.; Holdsworth, S.R. (1985):

Effect of Cyclosporine A on antibody induced experimental glomerulonephritis. *Nephron* 40, 201.

- Tipping, P.G.; Neale, T.J.; Holdsworth, S.R. (1985):

T lymphocyte participation in antibody induced experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 27, 530.

- Tonnesen, A.S.; Hamner, R.W.; Weinmann, E.J. (1983):

Cyclosporine and sodium and potassium excretion in the rat. *Transplant. Proc.* 15 (4), 2730.

- Truffa-Bachi, P. (1987):

Mode of action of Cyclosporin A. Anr-Immunol. (Institut Pasteur) 138, 605.

- Tutschka, PJ.; Hess, AD.; Beschorner, WE.; Santos, AD. (1981):

Suppressor cells in transplantation tolerance. Transplantation 32, 203.

- Ulich, TR.; Bannister, KM.; Wilson, CB. (1985):

Tubulointerstitial nephritis induced in the Brown Norway rat with chaotropically solubilized bovine tubular basement membrane: The model and the humoral and cellular responses. Clin. Immunol. Immunopathol. 36, 187.

- Van Buren, CT. (1986):

Cyclosporine: Progress, problems and perspectives. Surgical Clinic of North America 66 (3), 435.

- Van Buren, CT.; Flechner, SM.; Kerman, RH. et al. (1984):

Cyclosporine improves outcome in high risk cadaveric renal allograft

- recipients. *Transplant. Proc.* 16, 1162.
- Van Joost, T.; Bos, J.D.; Henle, F.; Meinardi MMHM. (1988):  
Low-dose cyclosporin A in severe psoriasis. A double-blind study. *B. J. Dermatol.* 118, 183.
- Van Zweiten, M.J.; Leber, P.D.; Bhan, A.K.; Mc Cluskey, R.T. (1977):  
Experimental cell mediated interstitial nephritis induced with exogenous antigens. *J. Immunol.* 118, 589.
- Von Willebrand, E.; Häyry, P. (1983):  
Demonstration of Cyclosporine in renal transplants by fine needle aspiration biopsy. *Transplant. Proc.* 15, Suppl. 1, 2716.
- Wagner, H.; Hardt, C.; Bartlett, R. et al. (1981):  
Frequency analysis of cytotoxic T lymphocyte precursors in chimeric mice. Evidence for intrathymic maturation of clonally distinct self major histocompatibility complex and allo-major histocompatibility complex restricted virus-specific T cells. *J. Exp. Med.* 153, 1517.

- Walwork, J.; Cory-Pearce, R.; English, TA. (1983):

Cyclosporine for cardiac transplantation: The United Kingdom trial.  
Transplant. Proc. 15, 2559.

- Wenger, R. (1982):

Chemistry of Cyclosporin. In: Cyclosporin A. Ed. White, DJD.; Elsevier  
Biomedical Press, Amsterdam, 19.

- Wenger, R. (1983):

Synthesis of Cyclosporine and analogues: Structure, activity, relationships of new cyclosporine derivatives. Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2230.

- Wood, AJ.; Maurer, G.; Niederberg, W.; Beneridge, T. (1983):

Cyclosporine: Pharmacokinetics, metabolism and drug interactions.  
Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2409.

- Yoshimura, N.; Oka, T.; Ohmori, Y. et al. (1983):

Induction of suppressor T lymphocytes in mice treated with Cyclosporine  
Transplant. Proc. 15 (4), Suppl. 1, 2334.

- Zakheim, B.; Mc Cafferty, E.; Phillips, SM. et al. (1984):

Murine interstitial nephritis II. The adoptive transfer of disease with  
immune T lymphocytes produces a phenotypically complex interstitial  
lesion. J. Immunol. 133, 234.

- Zanetti, M.; Mampaso, F.; Wilson, CB. (1983):

Antiidiotype as proven in the analysis of autoimmune tubulointerstitial  
nephritis in the Brown Norway rats. J. Immunol. 131, 1268.

- Zanetti, M.; Wilson, CB. (1983):

Characterization of anti-tubular basement membrane antibodies in rats.  
J. Immunol 130, 2173.