

PRIMER PREMIO DE TRABAJOS DE INVESTIGACION DEL XI CONGRESO ARGENTINO DE UROLOGIA

Academia Nacional de Medicina
Fundación Pombo de Rodríguez

Rev. Arg. Urol.-Nefrol. Tomo 40, 1971
XI Congreso Argentino de Urología

INVESTIGACIONES REALIZADAS EN NEFROPATIAS INMUNOLOGICAS HUMANAS Y EXPERIMENTALES

Autores: AMADA SEGAL, NORMA ZANETTI, MARTHA MORO, CHARALAMBOS
CHARALAMBOPOULOS, RUBEN PEDRO LAGUENS y VICTOR RAUL MIATELLO
Asesor Estadístico: Ing. ELVIO UBERTONE

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el terreno de la clínica humana y de la experimentación animal mediante la aplicación a las nefropatías inmunológicas de diversos métodos de investigación y procedimientos terapéuticos. Los estudios fueron realizados en colaboración entre el Servicio de Nefrología del Hospital Instituto de Cardiología, Fundación Hermenegilda Pombo de Rodríguez, Academia Nacional de Medicina y la Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires.

Estos resultados son la concreción de una tarea de varios años, destinada a adquirir los conocimientos inmunológicos y a dominar las técnicas especiales para la práctica de estos estudios, y el trabajo que los resume describe lo logrado hasta la fecha.

La obra se divide en siete capítulos. Los dos primeros se refieren a los hallazgos obtenidos mediante la aplicación a las nefropatías humanas y experimentales de los métodos inmunohistoquímicos más modernos desarrollados a nivel ultraestructural; su discusión permite valorar las teorías actuales acerca de los mecanismos patogénicos desencadenada por procesos de heterosensibilidad, homosensibilidad o autosensibilidad. El tercer capítulo describe el más reciente de nuestros trabajos referente a la investigación de anticuerpos anti-riñón circulantes en enfermos afectados por nefropatías o sometidos a transplante; así se logra establecer la probable importancia de los mecanismos autoinmunes en la perpetuación de las nefropatías crónicas y en la nueva enfermedad del riñón sano transplantado. El capítulo comprende los resultados logrados al aplicar métodos para detectar la calidad de la proteinuria en las nefropatías inmunológicas humanas: el carácter selectivo o no selectivo de dicha proteinuria permitirá a veces instituir la terapéutica inmunodepresora evitando el uso inútil de corticoides. Los capítulos quinto y sexto se refieren a nuestra experiencia personal en el empleo de agentes inmunodepresores en pacientes o animales con nefropatías inmunológicas, respectivamente. Finalmente en el capítulo séptimo se describen experiencias novedosas tendientes a demostrar la existencia de sustancias inmunológicamente activas en las paredes de los capilares cutáneos, en coincidencia con una situación similar de los capilares glomerulares renales, en pacientes con nefropatías inmunológicas; se discute también la relación de este hecho con la presencia de edemas en algunos pacientes.

Las ilustraciones son todas originales y se ha procurado mencionar las citas bibliográficas con la mayor actualización posible. En los casos que lo han

requerido se ha realizado el debido estudio estadístico que fue desarrollado por el ingeniero Elvio Ubertone.

Se desea dejar constancia de nuestro agradecimiento a la señorita Nélida Alarcón, quien ha colaborado con dedicación y afecto a la corrección y transcripción de los originales.

INMUNOHISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL APLICADA AL ESTUDIO DE LAS NEFROPATIAS HUMANAS

La mayoría de los estudios inmunohistoquímicos referidos a las nefropatías humanas fueron realizados a nivel estructural mediante el microscopio de luz. Los únicos estudios realizados con métodos inmunohistoquímicos ultraestructurales emplean anticuerpos marcados con ferritina (¹⁻²). Esta técnica no es muy precisa, y debido al gran tamaño de los conjugados anticuerpo-ferritina, solamente permite revelar antígenos con una ubicación extracelular. El desarrollo reciente de técnicas inmunohistoquímicas que usan anticuerpos marcados con enzimas (³) permite una localización más real de los antígenos en los tejidos y los resultados son reproducibles.

En este capítulo se procura demostrar la presencia a nivel ultraestructural de gamma globulina autóloga portadora de anticuerpos en riñones humanos afectados por nefropatías de supuesta patogenia inmunológica. Se estudiaron las biopsias efectuadas a 50 pacientes con glomerulonefritis crónica, nefritis del lupus eritematoso sistémico, glomerulitis membranosa y nefrosis lipoidea genuina. Como procedimiento inmunohistoquímico aplicable a la microscopía electrónica se usó la técnica de Nakane y Pierce (³), conjugando los anticuerpos antigamma globulina humana con fosfatasa ácida, que después se exteriorizan por métodos inmunohistoquímicos. Esto permite profundizar los estudios inmunohistoquímicos de acuerdo con el criterio actual que tiende a discriminar los cuadros inmunopatológicos originados por autoanticuerpos de aquellos que depende de la acción flogógena de complejos antígeno- anticuerpo circulantes depositados en los tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se seleccionaron 50 enfermos considerados con nefropatías de carácter inmunológico. El diagnóstico clínico se complementó con los siguientes exámenes de laboratorio: depuración de la creatinina endógena, prueba de concentración renal, recuento de Addis, determinación de las proteínas séricas cualitativa y cuantitativamente.

El estudio de las proteínas séricas y urinarias se efectuó mediante disociación electroforética en gel de acrilamida; inmunoelectroforesis; titulación del complemento sérico, de la AEO y de anticuerpos antinucleares y estudios alergológicos para establecer la existencia de reagentes.

A cada enfermo se le realizaron dos tomas biópsicas de riñón, con aguja de Vim-Silverman-Franklin, con procedimiento transcutáneo o a cielo abierto. Con una de las muestras uno de los autores estudió la histología mediante el microscopio óptico ignorando los resultados posteriores. La otra muestra se seccionó en dos trozos, uno de ellos se procesó para la observación directa con el microscopio electrónico y el otro para el estudio inmunohistoquímico ultraestructural, realizados ambos por otro de los autores que ignoraba los resultados del examen clínico e histológico. La técnica usada para el estudio inmunohistoquímico ultraestructural fue la siguiente: fijación en solución de formaldehído al 10 % en buffer fosfato pH 7,4, durante 4 horas y a 4°C, lavado repetido en solución buffer fosfato y sección con micrótomo de congelación en cortes de

50 u de espesor. Los cortes se incubaron 4 días a 4°C con los anticuerpos antigamma globulina humana marcados con fosfatasa ácida —según se explicará más adelante— agitándose suavemente dos veces por día. Para demostrar la fosfatasa ácida en las secciones ya marcadas, previo lavado en solución buffer acetato pH 5-0.05 M, durante dos horas se incubaron una hora en medio de Gomori.

Después de un nuevo lavado en buffer acetato, se fijaron en soluciones de tetróxido de osmio al 1 % en buffer fosfato pH 7.4 y se incluyeron en Araldita para su procesamiento destinado a la observación con el microscopio electrónico.

Conjugación de los anticuerpos: Se usaron anticuerpos de cabra anti-gamma-globulina humana (Sylvania Products Inc., Los Angeles, Calif.) y su pureza fue determinada mediante inmunolectroforesis. Estos anticuerpos fueron conjugados con fosfatasa ácida de germen de trigo (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.), usando como agente copulante el cloruro de 1-etil-3-dimetil amino propil) carbónico (The Otto Chemical Co., Muskegon, Michigan), de acuerdo con el método de Nakane y Pierce (3) escasamente modificado.

Una vez conjugadas las globulinas se atravesaron por una columna de Sephadex G.50 y las fracciones se recogieron de acuerdo a su absorción ultravioleta determinada por un equipo registrador Uvicord (LKB); por lo general se observaron tres picos de absorción y el máximo de actividad de los anticuerpos marcados con la enzima estaba presente en la primera porción de acuerdo con los resultados histoquímicos.

Controles efectuados: En las micrografías electrónicas los sitios antigénicos reaccionantes que se combinan con los anticuerpos marcados, se ven como precipitados de sales de plomo en forma de gránulos electrodensos. Deben considerarse posibles causas de error: una de ellas consiste en la preexistencia de fosfatasa ácida en organoides como los lisosomas, que naturalmente la poseen; la otra puede deberse a una precipitación no específica de la fosfatasa ácida. Estos dos artificios pueden descartarse con controles apropiados realizados simultáneamente. La presencia de fosfatasa preexistente se descartó incubando los cortes de tejido con anticuerpos heterólogos antiinmunoglobulina humana no marcados y realizando después la reacción histoquímica para demostrar fosfatasa ácida. Si el precipitado plúmbico se observa solamente en los cortes incubados con anticuerpos marcados, puede descartarse la existencia de fosfatasa natural en las células. Por otro lado, los anticuerpos marcados se combinan generalmente con antígenos ubicados en lugares que no contienen fosfatasa, como es la membrana basal. La incubación con anticuerpos marcados, con el objeto de bloquear los sitios antigénicos reaccionantes, fue un control necesario para descartar la posibilidad de un depósito no específico del anticuerpo marcado. Además se trataron otras secciones de tejido con anticuerpos contra globulinas de rata también conjugados con fosfatasa, que pondría de manifiesto precipitaciones inespecíficas. Si estos controles son realizados en forma rutinaria, puede asumirse que el método es considerablemente seguro.

RESULTADOS

Una vez estudiado todo el material, y dada la complejidad y la multiplicidad de los métodos empleados, se desecharon aquellos casos en los que alguna investigación había fracasado por causas técnicas; biopsias con mal material, alteraciones en los tejidos por fijación defectuosa y sospecha de envejecimiento de los anticuerpos heterólogos marcados.

Se seleccionó el material comparable proveniente de 42 enfermos (CUADRO I) que padecían las siguientes nefropatías: 28 glomerulonefritis crónica,

5 nefritis lúpica, 5 glomerulitis membranosa, 3 nefrosis lipoidea genuina y 1 proteinuria aislada por alteración de la sensibilidad; 4 de los mismos pacientes se consideraron clínicamente curados como resultado de un tratamiento con drogas inmunodepresoras; 2 tenían glomerulonefritis crónica, 1 glomerulitis membranosa y 1 nefrosis lipoidea genuina. En ese material se efectuaron las observaciones que se expresan a continuación referidas según la nefropatía estudiada.

Glomerulonefritis crónica: De los 28 pacientes con glomerulonefritis crónica, 12 tenían gamma globulina autóloga en sus tejidos y 16 no. En los primeros, predominaban las lesiones de tipo fibroepitelial; en los 16 con inmunohistoquímica negativa ellas habían sido calificadas como lesiones leves o subagudas, de tipo proliferativo o lobulillar. De los 12 casos positivos, en 11, la actividad fosfatásica, índice de la presencia de Ig G, fue hallada en la membrana basal del capilar glomerular y su distribución fue siempre difusa, en la totalidad del espesor de la membrana y sin localización preferencial (Fig. 1); la presencia de inmunoglobulinas no coexistió, por lo común, con la comprobación de depósitos electrodensos en la microscopía electrónica directa que, por el contrario, en la mayoría de los casos no existía.

Un hallazgo insospechado en dos pacientes con glomerulonefritis crónica consistió en la aparición de inmunoglobulinas autólogas a nivel de la membrana basal de los tubos proximales, en forma de un precipitado difuso de gránulos pequeños; en los otros túbulos no se halló actividad fosfatásica. En uno de estos casos la gamma globulina autóloga se evidenció en las membranas basales del glomérulo y del tubo proximal, y en el otro sólo en el túbulo.

Nefritis lúpica: Los pacientes con nefritis lúpica, en número de 5, presentaron gamma globulina autóloga en sus lesiones renales, independientemente de la intensidad del cuadro clínico y de la existencia actual de crisis lúpica. El precipitado granular se observó en forma de acúmulos distribuidos dentro de la basal sin localización preferente, aunque en la mayoría estaba por debajo del epitelio (Fig. 2); dichos acúmulos coincidían con los depósitos electrodensos observados con las técnicas comunes, de electrónica.

Glomerulitis membranosa: De los 5 pacientes con glomerulitis membranosa, en 2 la inmunohistoquímica fue positiva y en 3 no. En los primeros la gamma globulina autóloga se presentaba en forma de acúmulos, coincidentes con los depósitos electrodensos localizados en la vertiente epitelial de la membrana basal del capilar glomerular; deformaban la basal y eran cubiertos por pedicelos cubiertos y fusionados, y también deformados. Una pequeña cantidad de gránulos con actividad fosfatásica también existía en el citoplasma de los pedicelos.

Nefrosis lipoidea genuina: De los tres pacientes con nefrosis lipoidea genuina en dos apareció inmunoglobulina autóloga; en un caso se trataba de depósitos distribuidos en toda la basal; en el otro había gránulos difusos, a pesar de que la basal era normal del punto de vista óptico y electrónico. Ambos eran niños. No existía actividad fosfatásica.

DISCUSION:

Los resultados merecen discutirse desde tres puntos de vista, en relación con los conocimientos actuales: 1) la existencia y distribución de gamma globulina autóloga en las lesiones de las nefropatías humanas consideradas; 2) Algunas deducciones particulares de este trabajo, y 3) las ventajas de la técnica de inmunohistoquímica ultraestructural utilizada aplicada a la patología humana.

1) En cuanto a la frecuencia en la aparición y la distribución de la gamma globulina autóloga portadora de anticuerpos en las lesiones correspondientes a nefropatías supuestamente inmunológicas, los resultados referidos están de



FIG. 1. — *Glomerulonefritis crónica humana*. Inmunohistoquímica ultraestructural. Se observa una zona de un glomérulo obsoleto en la que se ve un engrosamiento de la membrana basal con un precipitado difuso granular (g) distribuido en forma homogénea y sin localización preferencial. Mag. x 12.000.

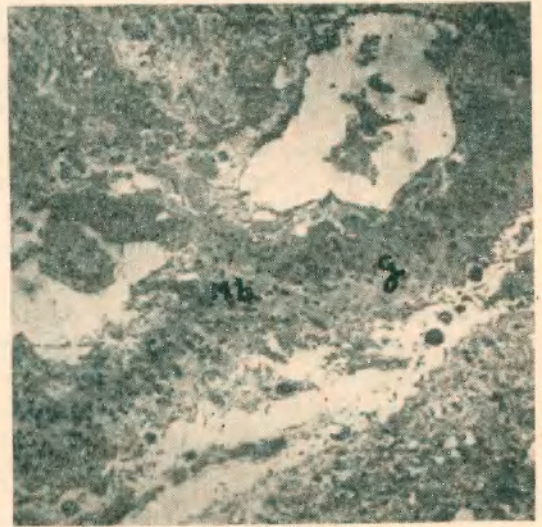


FIG. 2. — *Nefritis lúpica humana*. Inmunohistoquímica ultraestructural. Engrosamiento difuso de la membrana basal (mb) con gránulos que denotan la presencia de fosfatasa ácida (g), los granulos se disponen en masas que coinciden con los depósitos electrodensos. Mag. x 7.000.



FIG. 3. — *Proteinuria aislada debida a alteración de la sensibilidad en el ser humano*. Inmunohistoquímica ultraestructural. Se observan gránulos indicadores de la presencia de inmunoglobulina autóloga (g), que predominan en la vertiente epitelial de la membrana basal del capilar glomerular (Mb); los pedículos y el citoplasma endotelial fenestrado son normales, así como el resto de los caracteres de la membrana basal. Mag. x 6.000.

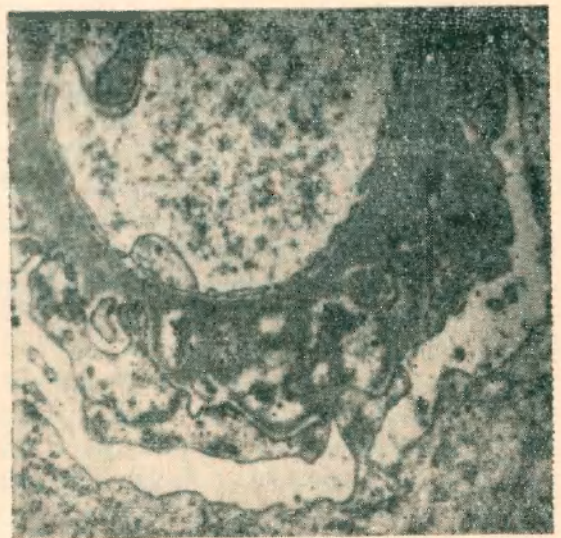


FIG. 4. — *Nefritis experimental por complejos autólogos-rata*. Microscopía electrónica. Se observan los depósitos subepiteliales electrodensos en la membrana basal del capilar glomerular. Halo claro rodeando algunos de esos depósitos. Mag. x 9.000.

acuerdo en general con los hallazgos descritos por otros autores mediante inmunofluorescencia.

Esto ocurre sobre todo en la *nefritis lúpica* (4-6), donde se confirma la presencia de gamma globulina autóloga en la basal y por debajo del epitelio, que exterioriza complejos constituidos por autoanticuerpos atrapados a ese nivel.

En los casos afectados de *glomerulonefritis crónica*, la comprobación de un precipitado granular de inmunoglobulina autóloga no es constante; cuando existe, aparece distribuido en la basal en forma difusa y se confirma la hipótesis de que se trataría de autoanticuerpos antibasal. Del análisis de las muestras con glomerulonefritis estudiadas en este trabajo, parecería deducirse que aquellos enfermos con lesiones leves o subagudas, de tipo proliferativo o lobulillar, son los que presentan inmunohistoquímica negativa y en cambio, existirían con más frecuencia autoanticuerpos en las lesiones crónicas fibroepiteliales.

Por lo que se refiere a los enfermos con *glomerulitis membranosa*, la presencia de gamma globulina autóloga es inconstante (9-12, 14); esto confirmaría la patogenia variable de estas lesiones, cuyo común denominador sería el aspecto morfológico determinado por el engrosamiento de la membrana basal, en forma más o menos difusa, en la microscopía óptica (15).

Resulta interesante el análisis de los 3 enfermos con *nefrosis lipodea genuina*, a pesar de lo escaso de las muestras. Si bien en esta afección siempre se sospechó una patogenia inmunológica, no se había logrado demostrar la presencia de globulinas autólogas mediante inmunohistoquímica (16); sin embargo últimamente se sostuvo que ello era posible utilizando anticuerpos heterólogos potentes. Nuestros resultados positivos en dos casos confirman esta última idea y también las ventajas de este método al usar sueros hiperinmunes marcados con enzimas. El caso con inmunohistoquímica negativa correspondió a un adulto, y a esta edad las características clínicas y evolutivas de la nefrosis genuina son peculiares.

Finalmente en los 4 pacientes considerados *clínicamente curados*, después de un tratamiento con drogas inmunodepresoras, no se halló gamma globulina autóloga. Esto apoyaría la idea de que las inmunopatías glomerulares pueden curar con una restitución funcional y morfológica integral, cuando las sustancias inmunológicamente activas depositadas en los capilares glomerulares son eliminadas, a medida que se renueva la membrana basal por acción de las células mesangiales y podocitos.

2) Dos observaciones son de particular interés. Una es el hallazgo de *gamma globulina autóloga en las basales de los tubos contorneados proximales*; como se descartó todo tipo de artificio mediante los controles realizados pueden emitirse las siguientes hipótesis. Podría tratarse de que las inmunoglobulinas autólogas dependieran de anticuerpos específicamente dirigidos contra la membrana basal tubular porque ésta tuviera antígenos diferentes del de las basales glomerulares. Pero es más probable que las inmunoglobulinas autólogas, después de atravesar la basal de los glomérulos sean captadas por los pedicelos, en cuyo citoplasma también se demostraron depósitos, pasen luego al espacio urinario y sean absorbidos por el tubo contorneado proximal hasta quedar finalmente atrapadas en la basal de las células proximales, donde resultan nuevamente visibles. Suponemos que su ubicación allí puede originar perturbaciones en la función tubular que trataremos de establecer en futuras investigaciones.

La otra observación se refiere al aserto de que las *inmunoglobulinas autólogas*, ya sean *autoanticuerpos* o *complejos inmunes*, son visibles con el *microscopio electrónico común* bajo la forma de *depósitos electrodensos*. Esto resultaría confirmado en este trabajo, pero también quedaría demostrado que la relación inversa no se cumple y que pueden encontrarse globulinas autólogas mediante la inmunohistoquímica en lesiones donde se observan depósitos electrodensos por medio de la microscopía electrónica común. En efecto, la técnica

inmunohistoquímica empleada permitiría la apreciación de pequeñas cantidades de inmunoglobulinas autólogas; así lo demuestra la observación en la que se ven gránulos en un paciente con nefrosis lipoidea genuina en el que no existía ninguna lesión ostensible con el microscopio óptico, ni aun con el electrónico. Esto explicaría también el hallazgo de gamma globulina autóloga en los dos niños con nefrosis lipoidea genuina, circunstancia en la cual, según ya se mencionó, fue negativa la demostración intentada por otros autores.

3) En cuanto a la técnica de Nakane y Pierce para el estudio inmunológico ultraestructural de biopsias renales humanas, parece cumplir con todas las premisas que se requieren (¹⁻¹⁸⁻¹⁹); a) buena preservación de las estructuras de los tejidos con el fin de permitir el diagnóstico patológico, que es la finalidad primordial de la biopsia renal; b) conjugación sencilla y reproducible de los anticuerpos con el marcador; c) posibilidad de almacenar el anticuerpo marcado durante un tiempo razonable sin que pierda sus propiedades combinantes; d) posibilidad de revelar pequeñas cantidades de gammaglobulina y logro de resultados constantes y reproducibles.

II

INMUNOHISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL APLICADA AL ESTUDIO DE LA NEFRITIS EXPERIMENTAL POR COMPLEJOS INMUNES AUTOLOGOS

Esta enfermedad es producida por la inmunización mediante antígeno tubular incorporado en adyuvante de Freund y se manifiesta clínicamente por proteinuria, hiperlipemia e hipoalbuminemia. Es la forma ideada por Heymann y colaboradores (²⁰⁻²²) y que produce un síndrome nefrótico semejante al de la especie humana. Los hallazgos de microscopía e inmunohistoquímica óptica fueron estudiados en 1963; sin embargo es escaso el material bibliográfico existente en lo referente a los hallazgos de la nefritis experimental ideada por Heymann con el microscopio electrónico.

En este capítulo se presenta un exhaustivo estudio y descripción de la ultraestructura del glomérulo y de los túbulos en la nefritis experimental por complejos inmunes autólogos obtenida por inmunización con antígeno tubular, y se detallan hallazgos de inmunohistoquímica a nivel ultraestructural capaces de explicar el mecanismo patogénico, en especial en lo referente al daño de la membrana basal.

MÉTODOS Y ELEMENTOS UTILIZADOS:

Se utilizaron 30 ratas blancas, Wistar, cuyo peso osciló al iniciar la experiencia, entre 180 y 200 gramos; se les inyectó cada quince días una emulsión constituida por adyuvante de Freund completo y antígeno tubular renal, siguiendo la técnica de Heymann. Los animales en experiencia se mantuvieron en jaulas individuales, alimentados con alimentos balanceados y ración acuosa libre. Con el reactivo de Exton se determinó semanalmente la proteinuria y las inyecciones se suspendieron cuando dicha proteinuria era elevada y sostenida. Se totalizaron en general 10 inyecciones que fueron suficientes, si bien en algunos casos la proteinuria comenzó después de la sexta inyección. Una vez efectuada la décima inyección, 17 de las 24 ratas vivas presentaban proteinuria acentuada, por lo cual se sacrificaron mediante éter y se extrajeron los riñones.

Procesamiento del tejido: Trozos de corteza renal se seccionaron en pequeños cubos, que se fijaron en solución de tetróxido de osmio al 1 % en buffer fosfato a pH 7.4, durante dos horas (²³) y después fueron embebidos

en Araldita (²⁴). La coloración se efectuó con citrato de plomo (²⁵) o bien permanganato de potasio (²⁶). Los preparadros se observaron en el microscopio electrónico Phillips 200. Para los estudios de inmunohistoquímica se fijó un trozo de tejido en formol tamponado en buffer fosfato salino 0,05 M y luego se procesó como se mencionará en el párrafo siguiente. El tejido restante se fijó en Bouin para microscopía de luz clásica.

Inmunohistoquímica: Se practicó la conjugación de anticuerpos anti beta 1 C' y gamma globulina de rata, de pureza comprobada por análisis inmunoelectroforético, con fosfatasa ácida, usando carbodiimida, método de Nakane y Pierce (³). Después se filtró la globulina conjugada por una columna de Sephadex G-50, recogiendo las fracciones de acuerdo a su absorción ultravioleta. Siempre aparecieron tres picos, siendo el primero de mayor actividad, de acuerdo a los resultados obtenidos. Los trozos de tejidos fijados por una noche en formol tamponado, al día siguiente se enjuagaron 12 horas en buffer fosfato salino y se cortaron en láminas de 50 micrones de espesor con el micrótopo de congelación. Los cortes se incubaron a 4°C durante 4 días con el anticuerpo marcado con fosfatasa ácida, agitando suavemente dos veces diarias y luego fueron lavados durante 12 horas con buffer fosfato salino. Entonces se introdujeron en un baño de 2 horas en buffer acetato 0,05 M y se incubaron durante 60 minutos en reactivo de Gomori para fosfatasas. Nuevamente se enjuagó en buffer acetato y se fijaron en solución de Millonig, o sea tetróxido de osmio, al 1 % en buffer y se imbibieron en Araldita para su estudio ultraestructural. Como testigo, se trataron algunos cortes alternadamente con anticuerpos anti-globulina humana, o bien con anti-globulina de rata sin marcar, para bloquear así los sitios antigénicamente activos.

RESULTADOS

Glomérulos: En los animales enfermos con acentuada proteinuria, los hallazgos con el microscopio de luz no fueron constantes; en cambio al observar los preparadros mediante el microscopio electrónico las alteraciones fueron bien manifiestas. Presentaron un engrosamiento irregular de la membrana basal determinada por depósitos de elevada densidad electrónica, de aspecto granular y de tamaño variable, localizados en la vertiente epitelial de la membrana (Figs. 4 y 5). En algunos sitios estaban rodeados por un halo claro de escasa densidad electrónica; esto se observó en los lugares de íntima relación entre los depósitos membranosos y los pedicelos. (Fig. 4). A veces, había membrana basal entre los pedicelos y los depósitos. En cambio, otras, las masas de densidad elevada estaban contra la membrana plasmática de los pedicelos, sugiriendo continuidad entre los materiales depositados en la membrana basal y los similares del citoplasma de los pedicelos. (Fig. 5). Si bien los pedicelos demostraban una membrana bien delimitada, en algunos sitios aquélla estaba interrumpida y determinaba continuidad de grandes materiales densos. Las células del epitelio visceral evidenciaban aumento de tamaño e hipertrofia de la superficie rugosa del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi. Los pies de la membrana mostraban hipertrofia y fusión parcial, con depósitos irregulares de material denso a los electrones. El mesangio y las células endoteliales no presentaban alteraciones de acuerdo a los conceptos morfológicos aceptados. Las ratas que no manifestaron proteinuria revelaron glomérulos aparentemente normales.

Túbulos: Los organoides no revelaron alteraciones. Los lisosomas, citosomas y citosegregosomas, fueron muy abundantes. En las células del tubo proximal había muchas gotas de grasa, especialmente en la región basal de las mismas. La membrana basal aparecía engrosada con zonas de escasa densidad a los electrones. (Fig. 6). No se hallaron alteraciones en el asa de Henle, túbulos distales y colectores, cuya membrana era de espesor normal.

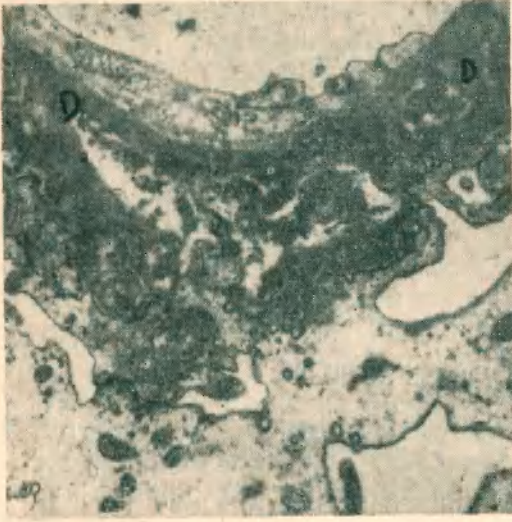


FIG. 5. — Igual que la figura 4. A mayor aumento se observan las relaciones entre los depósitos subepiteliales y los pies de podocitos. Mag. x 12.000.



FIG. 6. — Nefritis experimental por complejos autólogos rata. Microscopía electrónica. Se observa el engrosamiento difuso de la membrana basal (Mb) de un tubo contorneado proximal. Mag. x 7.000.



FIG. 7. — Nefritis experimental por complejos autólogos-rata. Inmunohistoquímica ultraestructural. Se observan gránulos de actividad fosfatásica (g) que señalan la presencia de inmunoglobulina autóloga en la membrana basal (Mb) de un tubo contorneado proximal. Mag. x 7.000.



FIG. 8. — Demostración de anticuerpos anti-riñón circulantes en seres humanos afectados por nefropatías crónicas mediante la inmunohistoquímica ultraestructural-técnica del "sandwich". Se observan gránulos con actividad fosfatásica que señalan la presencia del anticuerpo anti-riñón ubicado selectivamente en la membrana basal de los capilares glomerulares, predominando en la vertiente epitelial. Mag. x 7.000.

Resultados obtenidos con globulinas conjugadas: Utilizando las globulinas conjugadas con fosfatasa ácida, se determinó la presencia de gamma y beta 1 C' autólogas en los glomérulos y tubos proximales. En los glomérulos la actividad fosfatásica fue bien evidente en los sitios donde había depósitos densos, donde se observó precipitación de plomo. Se pudo ver asimismo actividad enzimática en los pedicelos; la actividad demostró ser más intensa con el anticuerpo anti-gammaglobulina que con I antibeta 1-C'. También había precipitación plúmbica en la membrana basal de los tubos proximales (Fig. 7). La actividad fosfatásica se manifestó en dos maneras: una difusa, en algunos túbulos, y otra en forma de áreas de escasa densidad electrónica que resultó positiva. No se observó depósito alguno en el resto de los tubos; en los cortes utilizados para control, que se trataron con globulina gamma anti-rata y beta 1 C' sin conjugar, y con antisueros humanos conjugados los glomérulos y túbulos no revelaron actividad enzimática.

DISCUSION:

Los hallazgos realizados con la inmunohistoquímica, consisten en la presencia de gammaglobulina y beta 1-C' autólogas en los depósitos electrodensos: sugieren que las alteraciones observadas son parecidas a aquéllas en las que el *daño de la membrana basal está determinado por la aparición de complejos inmunes*. Refiriéndose a la nefritis de Heymann, Glasscock y Edgington sostienen (27-30) que el daño glomerular responde a una patogenia autoinmune; los animales que ellos sensibilizaron con antígenos tubulares homólogos y heterólogos, generaron anticuerpos que reaccionaron con antígenos autólogos de origen tubular sin relación con el sitio alterado.

Es lógico pensar que las células epiteliales están comprometidas en la remoción de los depósitos glomerulares electrodensos, porque desde el punto de vista ultraestructural los materiales presentan características parecidas y por la presencia de solución de continuidad de la membrana plasmática, donde aparentemente los depósitos se continúan con los materiales densos de los pedicelos. La aparición de áreas claras alrededor de los depósitos membranosos también indicaría una resorción parcial de los complejos inmunes por las células epiteliales. Por la localización exclusiva de los depósitos en la vertiente epitelial de la membrana basal y la conservación ultraestructural de la vertiente endotelial así como de las células endoteliales, se puede intuir la posibilidad de que los depósitos son causados por el bloqueo de la función de resorción de las células epiteliales. En las ratas sanas las proteínas filtran normalmente por la pared de los capilares glomerulares; frente a un exceso de proteínas o a moléculas de mayor tamaño de complejos autoinmunes, las células epiteliales serían incapaces de remover las proteínas que se depositarían en el lado epitelial de la membrana basal. De esta forma, la presencia de fusión e hipertrofia de los podocitos sería secundaria al aumento de la función de resorción. Esto explicaría, aunque no en forma definitiva, el mecanismo por el cual, se acumularían complejos inmunes en la pared de los capilares.

Para explicar la acumulación de globulinas autólogas en la membrana basal tubular de conejos con glomerulonefritis alérgica experimental. Unanue (17) sugirió recientemente dos hipótesis. Una sería la combinación directa del anticuerpo con sitios antigénicamente activos de la membrana basal tubular. Pero parece más razonable la que admite que los complejos inmunes filtrarían por la pared del capilar glomerular y pasarían a la luz tubular donde serían reabsorbidos; en su pasaje de la luz tubular a los vasos sanguíneos, serían atrapados a nivel de la membrana basal. Esto estaría confirmado por el hecho de que en el animal sano la escasa proteína que filtra a través del glomérulo es totalmente reabsorbida a nivel del tubo proximal. Por otro lado así se explicaría también la ubicación selectiva de los complejos inmunes sólo en la membrana basal del

tubo proximal pues es difícil suponer que la membrana basal del tubo proximal sea antigénicamente diferente de las restantes partes del nefrón. El daño producido por los depósitos inmunes se presentaría sólo en los lugares que intervienen en la filtración y resorción de proteínas. Su acumulación en estos sitios sería por exceso de filtración, o quizá por la saturación de los capilares para remover proteínas de complejos inmunes de gran tamaño molecular.

PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-RIÑÓN EN EL SUERO DE PACIENTES CON DIVERSAS NEFROPATIAS

Si bien los datos experimentales indican la existencia de anticuerpos anti-glomerulares con intensa acción nefritogénica, la presencia y la responsabilidad de estos anticuerpos en las nefropatías humanas crónicas ha sido muy debatida. Mediante la técnica del látex y de la hemaglutinación se ha comprobado la presencia de dichos anticuerpos en pacientes con glomerulonefritis crónica (³¹⁻³⁷); otros han encontrado que dichos anticuerpos pueden reaccionar con antígenos de membrana basal eliminados por la crina de individuos sanos y nefrópatas (³⁴). Finalmente algunos consiguieron eluir anticuerpos anti-riñón de los órganos enfermos (³⁷⁻³⁸) y transferir mediante la inyección de dichos anticuerpos una glomerulonefritis mortal a un primate. Las observaciones referentes a la adquisición de una glomerulonefritis en riñones que fueron transplantados con éxito a pacientes que habían padecido esta enfermedad, es otro argumento en favor de la acción patógena de estos anticuerpos (³⁹⁻⁴⁰). Dilucidar la verdadera acción de estos anticuerpos anti-riñón circulantes en el plasma de estos pacientes afectados con nefropatías crónicas tendría valor no sólo para interpretar el mecanismo productor de la enfermedad, sino para conocer la verdadera importancia de la terapéutica inmunodepresora, actualmente en vigencia (ver capítulos 5 y 6).

La posibilidad de aplicar técnicas de inmunohistoquímica de elevada sensibilidad, especialmente a nivel ultraestructural (ver capítulos 1 y 2) nos indujo a intentar la demostración de anticuerpos anti-riñón en el suero de nefrópatas crónicos utilizando este método.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron 4 pacientes: 2 eran urémicos con supuestas glomerulonefritis terminales —uno mantenido con diálisis crónica y el otro que había sido sometido a transplante del riñón del padre veinte días antes, después de una nefrectomía bilateral—; los otros 2 tenían una glomerulonefritis crónica —diagnosticada por biopsia— y una trombosis de las venas renales por una probable colagenopatía que presentaba en el estudio histológico de la biopsia renal una glomerulitis membranosa.

A estos enfermos se les extrajo 120 ml de sangre y ésta se procesó para obtener gamma globulina purificada del suero mediante fraccionamiento en columna de Sephadex G 50, concentrada debidamente; dicha gammaglobulina debía contener los anticuerpos anti-riñón circulantes, en caso de que existieran. Como material de testificación se empleó riñón humano normal obtenido del polo indemne de una pieza de nefrectomía por hipernefroma polar; sectores de 1 cm de radio por 2 mm de espesor se fijaron en formaldehído al 10 % en buffer fosfato salino, pH 7,4, a 4° C. Se obtuvieron después cortes por congelación de 50 micrones de espesor, los que se trataron durante 4 días a 4° C con la gamma globulina concentrada de cada paciente. Después, los cortes se lavaron repetidas veces con buffer fosfato salino a la misma tem-

peratura, durante 12 horas, y se incubaron durante 4 días, a 4°C, con globulina de cabra antiIg-G humana, conjugada con fosfatasa ácida, de acuerdo con el procedimiento de Nakane y Pierce (3). Después de la incubación con el anticuerpo marcado anti-IgG humana, los cortes se procesaron como se describe en los capítulos 1 y 2, para evidenciar la fosfatasa a nivel ultraestructural.

RESULTADOS

En el suero de 3 de los 4 pacientes examinados se demostró la presencia de anticuerpos anti-membrana basal glomerular humana. Se hallaron en los dos pacientes urémicos —el dializado y el transplantado previa nefrectomía— y en el que padecía glomerulonefritis crónica. En cambio no se hallaron en el que tenía la trombosis de la vena renal por probable colagenopatía.

Con el método inmunohistoquímico indirecto empleado en el presente estudio, se observó una intensa actividad fosfatásica ácida a nivel de la mitad externa de la membrana basal (Fig. 8). Dicha actividad era selectiva y estaba ausente tanto en los componentes celulares del corpúsculo renal, como en la matriz mesangial y en la basal tubular. En los controles no fue posible demostrar actividad enzimática en la membrana basal glomerular.

DISCUSION:

El hallazgo categórico de anticuerpos circulantes anti-membrana basal glomerular en 27 pacientes con glomerulonefritis crónica fue comunicado hace escaso tiempo por Lerner y colaboradores (37); ellos emplearon para ese fin métodos de inmunofluorescencia que, aparentemente, son menos sensibles que las técnicas de inmunohistoquímica ultraestructural usadas en este trabajo. Esos autores hallaron anticuerpos circulantes sólo en pacientes en los que se había efectuado nefrectomía bilateral previa; pero en los que conservaban sus riñones los resultados fueron constantemente negativos. Como mencionamos al principio del trabajo, en los riñones extirpados fue posible demostrar la presencia de anticuerpos anti-membrana basal; esto indicaría que, si bien un elevado número de pacientes con glomerulonefritis crónica posee anticuerpos antibasal glomerular, éstos son rápidamente fijados por el riñón, dificultándose la pesquisa.

A pesar del escaso número de pacientes estudiados, nuestras observaciones indicarían que en algunos enfermos con glomerulonefritis crónica existen anticuerpos circulantes contra la membrana basal glomerular.

Es difícil opinar con respecto a la capacidad nefritogénica de esos anticuerpos porque su presencia puede ser sólo concomitante con la afección; si aquélla existiera debe señalarse en el caso de nuestro enfermo transplantado, la posibilidad de que dichos anticuerpos enfermen al riñón sano recibido.

Nuestros estudios serían los primeros en utilizar medios inmunohistoquímicos ultraestructurales que permiten comprobar la presencia de anticuerpos anti-membrana basal circulantes en nefrópatas crónicos portadores de sus riñones. La razón podría deberse al empleo de una técnica más elaborada y sensible.

IV

RESULTADOS DE LOS METODOS PARA DETECTAR LA CALIDAD DE LA PROTEINURIA EN LAS NEFROPATIAS INMUNOLOGICAS HUMANAS

Hasta hace pocos años se consideraba que la presencia anormal de proteínas en la orina dependía exclusivamente de la pérdida de albúmina a nivel renal, denominándose "albuminuria"; su valor como elemento de diagnóstico y de pronóstico era estrictamente cuantitativo. Sólo se diferenciaba una proteína urinaria, cuyo comportamiento especial, por acción del calor fuera descrito por Bence-Jones en el siglo pasado, que, como se supo más tarde, aparecía en los pacientes con mieloma o macroglobulinemia.

El estudio de la orina con nuevos métodos basados en principios físicos, químicos e inmunológicos, cuyo resultado puede expresarse en forma matemática, permitió reemplazar el concepto de albuminuria por el de proteinuria, y el análisis cualitativo de la misma adquirió, como dato semiológico, un valor independiente de la cantidad. Mediante esas técnicas, que son en su mayor parte laboriosas y requieren la concentración previa de la orina, algunos investigadores lograron establecer una correlación entre el tipo de proteinuria y el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las nefropatías.

Los depósitos de complejos antígeno-anticuerpo y la fijación de auto-anticuerpos condicionan las modificaciones de la membrana basal del capilar glomerular que ya fueron descritas en los capítulos 1 y 2 al referirnos a los estudios inmunohistoquímicos. El grado de dichas modificaciones puede presumirse por las características de la proteinuria. Aunque esta comprobación no permite diferenciar mecanismos patogénicos, donde sin duda adquiere más importancia es en las nefropatías de origen inmunológico: esto responde en primer lugar, a que ellas son las más numerosas —nefrosis lipoidea genuina, proteinurias o hematurias por alteración de la sensibilidad, glomerulitis membranosa, glomerulonefritis, nefritis lúpica—, y en segundo lugar, es en las nefropatías inmunológicas donde la calificación de la proteinuria puede decidir la terapéutica en favor de las drogas inmunodepresoras evitando el uso inútil de los corticoides. En nuestro trabajo al respecto⁽⁴¹⁾ se procuró demostrar que era posible la caracterización de la proteinuria mediante la sola determinación semicuantitativa del perfil electroforético de las proteínas urinarias, comparando los resultados de la disociación proteica con el cuadro clínico e histopatológico de los pacientes. Además, el método que se practica para la disociación es sencillo y no requiere ningún tratamiento previo de la orina. Lo publicado aquí es una actualización de nuestras investigaciones en ese sentido con un número total de 251 muestras analizadas.

Los cuatro tipos de proteinuria diferenciados por la electroforesis, considerados por otros autores y en este trabajo, son: *fisiológica*, caracterizada por menos del 50 % de albúmina y una meseta en la que no pueden identificarse otras fracciones; *filtración selectiva*, constituida por fracciones de peso molecular inferior a 85.000 —hasta la transferrina inclusive—; filtración no selectiva, en la que puede identificarse fácilmente la *alfa 2 macroglobulina* o aparecen todas las proteínas del suero —*suero diluido*—, por último, la *proteinuria tubular*, que se reconoce por una prealbúmina importante, alfa 1, fracción beta distinta a la transferrina y fracciones gamma lenta, sin alfa 2 macro.

MATERIAL Y MÉTODO

El procedimiento aplicado a este trabajo, consiste en la electroforesis de las proteínas urinarias sobre un soporte de gel de acrílemida, lograda *sin hacer concentrar la orina previamente* (42). En la orina que se recoge durante 24 horas, se dosa la proteína que contiene por litro y todas las muestras se llevan a una concentración uniforme de 200 mg por mil, mínimo requerido por el método. Se siembra 1 ml de la solución, reemplazando a la sacarosa en el poro grueso del gel. Completada la migración, y coloreado el gel, se leen los resultados en un espectrodensitógrafo con integrador automático.

Así se estudiaron 251 orinas en 191 pacientes cuyo diagnóstico era clínico en 111 y que tenía confirmación histológica en 80. En 47 enfermos se reiteró el estudio de la orina de 1 a 5 veces; por eso es mayor el número de muestras urinarias. 162 enfermos tenían glomerulopatías variadas, y para tipificar los datos se clasificaron en graves y leves: los primeros tenían glomerulonefritis crónica o subaguda, nefritis lúpica, arteriosclerosis renal, macroglobulina linemia o riñón diabético; los que tenían glomerulopatías leves, sufrían una nefrosis lipoidea genuina o una glomerulitis por alteración de la sensibilidad. Los pacientes con glomerulitis membranosa se consideraron aparte, porque ésta es una entidad histológica que generalmente cursa con síndrome nefrótico y cuya evolución es a veces leve y otras grave. Finalmente, los enfermos con túbulopatías tenían pielonefritis, mieloma o riñón gotoso.

La variación de la proteinuria en relación con la terapéutica y con su resultado se analizó en 40 pacientes de los que tenían estudios reiterados.

RESULTADOS

Considerando el grado de glomerulopatía: sobre 146 pacientes con lesiones graves, 132 tenían proteinuria no selectiva y 14 selectiva. De los 16 pacientes con lesiones leves, la proteinuria fue no selectiva en 4 y selectiva en 12. De los 13 pacientes con glomerulitis membranosa, 9 presentaron proteinuria no selectiva y 4 selectiva, coincidiendo esta diversidad con el pronóstico imprevisible.

El análisis estadístico de las variaciones de la proteinuria en relación con la gravedad de la glomerulopatía, se realizó expresando los datos referidos en una tabla de 2 x 2.

Carácter GRUPO	Selectiva		No selectiva		Total
	O	C	O	C	
Graves	14	23,50	132	122,5	146
Leves	12	2,5	4	13,5	16
	26	26	136	136	162

P(s): 26:162:16 (posibilidad de la presentación de la componente selectiva X2:43, mayor que X2:12; por lo tanto (p) es menor que 0,001. De esta forma el valor obtenido corresponde a una probabilidad de ocurrencia por azar de las proteinurias selectivas y no selectivas en las glomerulopatías leves y graves respectivamente, inferior al 1 por mil. Por lo tanto el resultado es altamente significativo.

Considerando la topografía de la lesión: de los 162 pacientes afectados de glomerulopatías, sólo 1 presentó proteinuria por componentes tubulares. En cambio fue tubular en 12 pacientes de un grupo de 16 afectados por túbulopatías.

El análisis estadístico de la incidencia de componentes tubulares en relación con la topografía de la lesión, se realizó aplicando el mismo criterio que en párrafos anteriores.

Ubicación GRUPO	CT		No CT		Total
	O	C	O	C	
Glomerular	1	11	161	151	162
Tubular	12	2	4	14	16
	13	13	165	165	178

P(et): 13:178:7,3 (posibilidad de presentación de la componente tubular) x2:66, mayor que x2:12; por lo tanto (p), es menor que 0,001. De esta forma el valor obtenido corresponde a una posibilidad de ocurrencia por azar inferior al 1 por mil. En consecuencia el resultado probabilístico es altamente significativo.

Con respecto a las características evolutivas de la proteinuria de los 40 pacientes con estudios reiterados durante su tratamiento, deben considerarse por separado los 19 que curaron y los 21 restantes.

De los 19 pacientes curados, 4 que tenían proteinuria selectiva mantuvieron esa característica; de los 15 cuya proteinuria era de tipo no selectivo, en 8 se modificó a selectiva y persistió sin cambios en los demás. De los 21 pacientes no curados, sólo 3 tenían proteinuria selectiva antes del tratamiento, resultando finalmente no selectiva en todos.

DISCUSION:

Según numerosas investigaciones, el carácter de la proteinuria permitiría establecer la existencia de un compromiso tubular, o la gravedad de la alteración glomerular, la conducta terapéutica y el beneficio de ésta (⁴³⁻⁴⁷). Si la proteinuria es selectiva la lesión glomerular sería leve y la enfermedad renal podría curar espontáneamente o con métodos sencillos, como los hiposensibilizantes, o bien mediante anti-inflamatorios o corticoides (⁴⁸⁻⁵⁰). El hallazgo de una proteinuria no selectiva significaría que las lesiones glomerulares son graves y se manifiestan por alteraciones visibles con el microscopio óptico; en este caso la enfermedad es, por lo general, corticoide-resistente y requiere el uso de drogas inmunodepresoras o es incurable (⁵¹). Si bien la nefropatía diabética y la arteriosclerótica cursan con proteinuria no selectiva, están afuera de la correlación terapéutica mencionada y de los fines de este trabajo. En todos los casos la evolución de la proteinuria hacia un tipo selectivo evidenciaría el curso favorable de la enfermedad (⁴⁵).

La interpretación correcta de las variaciones cualitativas de la proteinuria tiene como parámetro el espectro proteico de la orina normal, resultante de la correcta función renal.

A nivel del capilar glomerular el pasaje de las proteínas de la sangre a la orina está regido por dos mecanismos: la ultrafiltración y la difusión (⁵²). Por efecto de la primera, las proteínas atraviesan las membranas citoplasmáticas de la célula endotelial y epitelial; la difusión determina el desplazamiento de las moléculas dentro de la red molecular que constituye la membrana basal. Además, el pasaje hacia el espacio urinario está condicionado por la forma, el tamaño y la carga eléctrica de cada molécula.

En condiciones normales, el endotelio regula la filtración modificando la superficie de sus fenestraciones; las grandes moléculas son retenidas en su mayor parte a nivel de la membrana basal, pues difunden con dificultad; y a nivel de las fisuras epiteliales, se retienen las moléculas medianas y pequeñas que son captadas por las células epiteliales o mesangiales (⁵³). Por lo tanto existe un mecanismo de control de la ultrafiltración y de la difusión, que impide la pérdida de proteínas y da origen a un ultrafiltrado con una concentración proteica inferior a la del plasma y una composición en la que predominan moléculas pequeñas. A nivel del tubo contorneado proximal se producen nue-

vas modificaciones, porque la célula tubular reabsorbe proteínas, sobre todo las más pequeñas, y las metaboliza reincorporando sus productos a la sangre.

En condiciones patológicas, cuando existe alteración del filtro o de la membrana de difusión, la célula epitelial aumenta su contacto con la membrana basal —fusión de los pedículos— e incorpora a su citoplasma la mayor parte del filtrado con la finalidad de disminuir los daños ulteriores de este pasaje exagerado. Entonces aparecen evidencias de actividad metabólica aumentada que, si se prolonga, origina modificaciones regresivas. La célula mesangial acelera la depuración de la basal; las células tubulares intensifican la reabsorción al máximo, esta vez de todas las fracciones proteicas filtradas anormalmente, y las metabolizan. Por lo tanto la presencia anormal de proteínas en la orina puede deberse a una alteración del filtro, que permite el pasaje de todas las moléculas en tal cantidad que supera la reabsorción tubular máxima, o a un defecto de la función glomerular misma, pudiendo combinarse estas causas. Otra posibilidad, aparte de ésta, se plantea en el caso de la filtración aumentada de moléculas de menor tamaño, presentes en exceso en el suero, como ocurre con la proteína Bence-Jones.

Varios métodos de depuración han sido aplicados para determinar la permeabilidad glomerular de las proteínas. Si se miden las concentraciones urinarias y plasmáticas de varias proteínas por medios inmunoquímicos (⁵⁴⁻⁵⁵) o, más fácilmente, por elución a través de una columna de Sephadex (⁵⁶) que permite separarlas de acuerdo a su tamaño molecular, y se trasladan sobre un sistema de ordenadas los logaritmos de la relación entre las concentraciones de cada fracción y del tamaño molecular respectivo, se obtiene una recta cuya mayor pendiente indica menor filtración glomerular de grandes moléculas. También puede relacionarse la depuración de una proteína de alto peso molecular con la otra de bajo peso, en un mismo paciente; así se obtiene un índice que tiende a ser 1 a medida que la proteinuria es no selectiva y 0 si la selectividad es mayor. Es posible realizar determinaciones similares con moléculas inertes marcadas (⁵⁷) o no (⁵⁸⁻⁵⁹), de distinto peso molecular incorporadas al organismo mediante una sola inyección; de esta forma se investiga el umbral de eliminación de las moléculas en función de su tamaño. Se ha observado que las depuraciones de ciertas enzimas varían según el grado de congestión pasiva que se provoca en un riñón en forma experimental. El aumento de presión venosa produce aumento de la depuración de amilasa sin modificación para la tranamínasa glutámico-pirúvica; a medida que aumenta la depuración de ésta, disminuye la selectividad de la proteinuria (⁶⁰).

Deben considerarse aparte los métodos de análisis cualitativo o semicuantitativo, con la ultracentrifugación analítica (⁶¹⁻⁶²) y la electroforesis, que permiten detectar en la orina la presencia de fracciones de alto peso molecular, índice de lesión glomerular importante. La ultracentrifugación es difícil de practicar como método rutinario. Por el contrario, la electroforesis simultánea de las proteínas plasmáticas y urinarias, realizada sobre papel (⁶³⁻⁶⁴) y sobre gel de almidón (⁶⁵) o de poliacrilamida (⁶⁶) complementada por análisis inmuno-electroforético (⁶⁷); pueden practicarse como rutina y permite controlar la evolución sin molestia para el paciente. Sin embargo, se considera que la concentración previa de la orina a baja temperatura es una etapa obligada para comparar en forma semicuantitativa aceptable los trazados séricos y urinarios y para facilitar el reconocimiento de las fracciones en la orina (⁵). Fue mediante esta técnica que se diferenciaron los 4 trazados de proteinuria mencionados cuyo valor reside en la relación que guardan con el tipo de lesión.

El método que se usa en este trabajo tendría ventajas técnicas sobre los que se mencionaron: con respecto a los primeros, porque no son necesarios cálculos de la depuración de las distintas fracciones y con respecto al último porque no requiere la concentración previa de la orina. Además los trazados

obtenidos permitieron adoptar la misma clasificación de la proteinuria en 4 tipos cuya relación con la histopatología brindó resultados similares.

En conclusión: 1º El método preconizado es sencillo y útil para apreciar el grado de filtración glomerular de las proteínas y permite diferenciar la proteinuria en los cuatro tipos descritos por otros autores usando procedimientos más complejos; sólo se requiere que las muestras de orina tengan como mínimo 200 mg por mil de proteína. 2º) La correlación entre los tipos de proteinuria así determinados y la mayor o menor gravedad de una glomerulopatía o la presencia de un compromiso tubular, brinda resultados estadísticamente significativos. 3º) Por lo tanto, este método permitiría seleccionar la terapéutica apropiada evitando las esperas perjudiciales de una mejoría espontánea o el uso inútil y tal vez nocivo de corticoides en los pacientes corticoide-resistentes. 4º) La transformación de la proteinuria de no selectiva a selectiva en el momento de suspender el tratamiento coincide con la curación integral o con defecto de la enfermedad. La inversa no se cumple y puede haber curaciones con defecto en las que persiste una proteinuria selectiva. Asimismo, cuando la terapéutica no resulta efectiva, disminuye la selectividad de la proteinuria.

V

APLICACION DE AGENTES INMUNODEPRESORES EN EL TRATAMIENTO DE NEFROPATIAS HUMANAS DE PROBABLE PATOGENIA INMUNOLOGICA

GENERALIDADES

El fracaso de la terapéutica con corticoides en un alto porcentaje de pacientes con glomerulonefritis subaguda o crónica y en muchas nefritis lúpicas impuso la necesidad de intentar otros tratamientos, entre los cuales el uso de agentes inmunodepresores ocupa un lugar importante. Estos agentes comprenden un grupo heterogéneo de drogas, muchas usadas desde hace años en el tratamiento de linfomas y leucemias y, en la actualidad, también el suero antilinfocitario.

Las drogas inmunodepresoras tienen acciones farmacológicas y sus efectos tóxicos mediatos e inmediatos determinan la necesidad de un control permanente sobre los pacientes; se usan habitualmente los siguientes: *Los alquilantes* (68-69) o sustancias radiomiméticas, que tienen la propiedad de actuar sobre los centros nucleófilos, son polifuncionales; esto hace dificultoso determinar, dónde y en qué momento ejercen su acción y cuál de estas reacciones es la que condiciona su efecto inmuno depresor. De este grupo se utiliza el *clorambucil*, una mostaza aromática nitrogenada, considerada efectivamente linfocítica y cuyos efectos tóxicos son menores que los restantes del mismo tipo; también se usa la *ciclofosfamida*. Los *antimitóticos* (70), que actúan en el momento de la reproducción celular, tal como la *Actinomicina C*, que se utiliza en las crisis de rechazo. Los *antimetabolitos* inhiben las reacciones bioquímicas por competición con el metabolito natural a nivel de la enzima actuante. En algunos casos se trata de antagonistas del ácido fólico, *methotrexate*, indispensable para la síntesis de las bases pirimidicas; en otros casos los compuestos inhiben la incorporación de las bases purinas, ellos son: la 6-mercaptopurina y su derivado la azathioprina. Estas sustancias ocasionan múltiples alteraciones, tanto impidiendo la síntesis de ADN y ARN, cuanto al actuar sobre las coenzimas impidiendo su función e interfiriendo así el metabolismo celular. Hay otro grupo constituido por *Antibióticos* (71), *Antiinflamatorios* (72-75), *Anti-*

palúdicos ⁷⁶), *Antihistamínicos* ⁽⁷⁷⁾ y *Anticoagulantes* ⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾, cuya acción se produce en diferentes puntos de la cadena inmunopatológica y que no serán tratados en este trabajo.

Por último, otro de los agentes inmunodepresores, es el suero o *gamma globulina antilinfocitaria*, que se usa preferentemente en los trasplantes de órganos. Este suero heterólogo fue propuesto por Waksman ⁽⁸¹⁾ y Woodruff ⁽⁸²⁾ en 1961 y 1960 respectivamente, por su valor para mitigar el rechazo de los trasplantes de piel. Se produce en el caballo ⁽⁸³⁾ inyectando linfocitos provenientes de una fístula del conducto torácico, o linfocitos de leucémicos, de nódulos linfáticos o de bazo. Es necesaria una gran cantidad de células inyectadas una vez por semana; el título de leucoaglutinación se eleva a 1/16.000 en un tiempo variable de 20 a 75 días. La purificación del suero requiere una intensa labor porque toda su actividad se encuentra en la gamma globulina ⁽⁸⁴⁾ y deben eliminarse anticuerpos antieritrocitarios y antiplaquetarios; este suero ocasiona linfopenia; sin embargo no es necesaria una linfopenia prolongada para obtener éxito y, por otra parte, el rechazo no se produce necesariamente cuando se suspende esta terapéutica. Se puede utilizar por vía intramuscular o endovenosa. El suero antilinfocitario que utilizamos ⁽⁸⁵⁾ en el tratamiento de dos pacientes portadores de glomerulopatías y en algunos trasplantes renales, fue preparado en nuestro medio por el equipo del doctor Santiago Pavlovsky con la colaboración de uno de los autores de este trabajo.

Es muy difícil aún establecer en qué momento y bajo qué condiciones ejercen su acción los agentes inmunodepresores; esa misma acción es discutida por algunos autores que la atribuyen a un efecto antiinflamatorio potente. De todas maneras se cree que la acción del clorambucil se manifiesta en los primeros estadios del proceso formador de anticuerpos disminuyendo la población de linfocitos, mientras que la 6-mercaptapurina y la azathioprina impiden la transformación de los linfocitos en hemocitoblastos.

Es interesante consignar algunos estudios efectuados en animales cuyas conclusiones en términos generales se pueden aplicar al hombre ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Se prepararon conejos en los que el tratamiento con 6-mercaptapurina permitió que dichos animales fueran incapaces de responder a un primer estímulo antigénico, mientras que un segundo estímulo, con antígeno diferente, producía una respuesta normal; este fenómeno de tolerancia inmunológica inducida por drogas fue comprobado en varias especies animales y con drogas diferentes. Por otra parte, se observó que la respuesta formadora de anticuerpos se produce en dos etapas, siendo distinta la inmunoglobulina transportadora en cada una de ellas: en la primera sería una inmunoglobulina de alto peso molecular —la IgM o 19S—, mientras que la segunda se trataría de una de bajo peso molecular —la IgG o 7S—. Trabajando con una droga a dosis específica, es posible eliminar selectivamente la formación de IgG, con la 6-mercaptapurina, la ciclofosfamida y las radiaciones, sin alterar la formación de IgM ⁽⁸⁹⁾. Parecería que la IgM es controlada por un mecanismo de retroalimentación: el aumento de la IgG trae como consecuencia su caída. Se observó también depresión de la respuesta anamnésica y de sensibilidad retardada. Esa medicación puede tener también un efecto paradójico, aumentando la formación de anticuerpos, debido a una hiperplasia del tejido linfoide; esto se ve cuando son excesivas o si la droga es suministrada bastante tiempo antes que en antígeno. Un efecto similar puede obtenerse con las radiaciones: animales sometidos a injertos de piel bien tolerados, efectuaron un rechazo acelerado luego de la irradiación total.

A las dificultades que presenta el manejo de las drogas inmunodepresoras de acuerdo a lo comentado más arriba, se debe agregar su alto grado de toxicidad ⁽⁹⁰⁾. Sus efectos pueden presentarse rápidamente; el más común,

la depresión o hipoplasia medular severa, retrógrada en un plazo relativamente breve si se suspende la medicación. Otros efectos pueden mantenerse durante dos o tres años —efectos mediatos— y se pueden manifestar sobre un órgano aislado, ocasionando una labilidad especial a las infecciones, o bien presentando una intolerancia a medicaciones que a dosis convencionales no la tienen. La ciclofosfamida produce fibrosis pulmonar, cistitis hemorrágica, alopecia y daño hepático. El clorambucil produce amenorrea, azospermia, alteraciones hepáticas. Con la 6-mercaptopurina se presenta necrosis hepática, ulceración intestinal y, en los animales de experimentación, trastornos teratogénicos.

EXPERIENCIA PERSONAL

La selección de los pacientes que han de ser sometidos a esta terapéutica debe ser cuidadosa. En primer lugar elegimos aquellos que padecen una glomerulonefritis subaguda o crónica, nefritis lúpica o una nefrosis lipoidea genuina, esta última sólo en los casos de no ser sensibles a los corticoides. Por otra parte todos nuestros pacientes fueron corticoide-dependientes o corticoide-resistentes; sólo por excepción fueron sometidos a este tratamiento pacientes corticoide-sensibles, cuando a pesar de una buena respuesta presentaron signos de corticismo grave. En las restantes glomerulopatías no se usaron.

El estudio renal completo incluye: recuento de Addis, determinación del filtrado glomerular mediante la depuración de la creatinina endógena —consideramos valores aceptables para someterse al tratamiento hasta 30ml/minuto—, estudio de las proteínas plasmáticas y urinarias mediante la disociación electroforética en gel de poliacrilamida (ver capítulo IV) punción renal, estudiando las biopsias mediante técnicas comunes de microscopía óptica y electrónica, a las que agregamos, a partir de 1976, las técnicas de inmunohistoquímica (ver capítulo I).

El peligro potencial de infecciones graves que determina la caída de las inmunoglobulinas hace necesario un exhaustivo estudio previo en busca de focos sépticos respiratorios o urinarios.

Una vez iniciada la terapéutica son necesarios controles semanales clínicos y hematológicos, que se pueden efectuar cada dos o tres semanas al progresar el tratamiento y cuando las dosis son menores.

Desde el año 1966 hemos tratado 112 pacientes, cuyas edades oscilaron entre 2 y 56 años, con diagnóstico clínico de glomerulonefritis subaguda o crónica o vinculada a colagenopatías, con o sin síndrome nefrótico. El estudio histológico reveló lesiones correspondientes a nefrosis genuinas, glomerulitis membranosa o lobulillar, glomerulonefritis fibroepitelial o nefritis lúpica. Todos estos pacientes recibieron previamente tratamiento con corticoides a dosis altas a pesar de lo cual seguían un curso progresivo. Una vez comprobada la resistencia a los corticoides, y la ausencia de infecciones intercurrentes se indicaron las drogas inmunodepresoras.

El tratamiento se realizó siguiendo los esquemas siguientes:

- Grupo 1: Clorambucil.
- Grupo 2: Clorambucil y 6-mercaptopurina.
- Grupo 3: Clorambucil y Azathioprina.
- Grupo 4: Azathioprina.

Las dosis empleadas fueron las siguientes: Clorambucil, 0,2 mg/kg/día; 6-mercaptopurina, 2 mg/kg/día; Azathioprina, 4 mg/kg/día. Las mismas se mantuvieron de 4 a 6 semanas, para continuar con un tratamiento de sostén con la mitad de la dosis durante 1 año. En los casos que hallamos una buena respuesta continuamos con dosis mínimas durante un período de 6 meses.

En todos los casos agregamos prednisona en dosis de 5-10 mg diarios, en forma discontinua.

RESULTADOS

De este grupo de 112 pacientes, 35 abandonaron el tratamiento por intolerancia o indisciplina. Las manifestaciones de intolerancia o toxicidad inmediata que se observaron con más frecuencia fueron la depresión de la médula ósea y los trastornos del aparato digestivo. En el primer caso la hipoplasia se manifiesta en algunos de los sectores; la trombocitopenia es muy frecuente pero de rápida recuperación, y la granulocitopenia, en dos casos, fue extremadamente persistente y se prolongó durante más de un año a pesar de la suspensión inmediata de la terapéutica. La anemia se observó preponderantemente en aquellos pacientes cuya función renal se hallaba altamente deteriorada, esta es una de las razones por la que preferimos no incluir pacientes con un filtrado inferior a 30 ml.

Las alteraciones del aparato digestivo —náuseas, vómitos, inapetencia— obligaron en algunos casos a la suspensión temporaria del tratamiento. Uno de los efectos tóxicos más importantes es el que determina la disminución de la resistencia inmunológica a las infecciones; es frecuente la detención de la terapéutica por infecciones respiratorias triviales, o infecciones urinarias frecuentes, siendo necesario el control periódico para descartar la bacteriuria significativa. Es una importante guía, como dijimos con anterioridad, la determinación de las inmunoglobulinas séricas, ya que es común observar el descenso de la IgG y de la IgA con persistencia de la IgM en valores normales. Si la IgM disminuye a cifras inferiores de 0,39 mg/ml, las defensas orgánicas están muy comprometidas y la posibilidad de adquirir una infección grave obliga a suspender el tratamiento inmunodepresor y a indicar gamma globulina humana ante el menor signo de infección.

Como datos de interés debemos destacar la presentación de una poliuria de 6 litros diarios en un paciente tratado con clorambucil; se atribuyó a la droga ya que fue inmediata al suministro de la misma que era, por otra parte, la única medicación que recibía. En dos casos hemos observado tiroiditis agudas que cedieron espontáneamente en 24 horas. La inflamación aséptica de las glándulas submaxilares y sublinguales se observó en varias ocasiones. Los trastornos del ciclo menstrual y la amenorrea son más frecuentes en pacientes que son sometidas a tratamientos prolongados. La azospermia se presentó en 3 casos tratados exclusivamente con Clorambucil durante un periodo superior a 12 meses, persistiendo a pesar de la suspensión del tratamiento.

Con respecto a la gamma globulina antilinfocitaria, se trataron solamente dos pacientes. Uno con una glomerulonefritis subaguda tormentosa de Löhlein, en el que las medidas terapéuticas anteriores habían fracasado. El otro, tenía una trombosis de la vena renal y una probable colagenopatía. En ninguno de ellos se comprobó beneficio alguno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar los resultados se excluyeron los pacientes que sobrellevaron el tratamiento menos de 6 meses y aquéllos que abandonaron por intolerancia severa; resultó así un grupo de 77 pacientes.

En un trabajo anterior⁽⁹¹⁾, con motivo de un estudio estadístico, considerábamos exitosa la terapéutica sólo en aquellos pacientes que presentaron una remisión total de los síntomas clínicos y humorales, en muchos casos certificada por una nueva biopsia renal; en los restantes, incluyendo a muchos que habían obtenido una mejoría significativa, considerábamos el tratamiento fracasado. Sin embargo, luego de dos años de suspendida la medicación, mu-

chos de estos enfermos continúan oligosintomáticos, sin mostrar signos de evolutividad. Por eso en este trabajo hemos creído conveniente tomar nuevos parámetros y considerar exitosa la terapéutica en aquellos casos en que se observa una curación total —restitutio "ad-integrum" histopatológica y/o clínica— y también en aquellos grupos de pacientes estabilizados por un período superior a seis meses, que se encuentran oligosintomáticos o que cambian el tipo de proteinuria que, de no selectiva, pasa a ser selectiva o fisiológica.

En los restantes pacientes, que no presentaron cambios significativos o continuaron con evolución hacia una insuficiencia renal, el tratamiento se consideró fracasado.

Según este criterio, en nuestra casuística el resultado del uso de drogas inmunodepresoras en las glomerulopatías de probable patogenia inmunológica ha sido exitosa en 27 casos —doce totalmente curados y quince estabilizados—, y ha fracasado en 50.

Análisis estadísticos

A) Bajo hipótesis muy generales y si se admite la distribución binomial, se obtienen los siguientes guarismos:

Nº total de casos: 77.

Nº de curados: 27.

Nº de no curados: 50.

p (c); 27: 0,35:35 %; q : 0,65:65 %.

$\frac{77}{77}$

D.S.: $\sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$: $\sqrt{0,002954}$: 0,054: 5,4 %.

Intervalo de confianza de 26, o sea del 97 %

p : 35 más menos 10,8 : 45,8 % y 24,8 %.

Según esta hipótesis podemos afirmar, con el 97 % de certeza, que los resultados obtenidos son muy significativos, dentro de un intervalo de variación comprendido entre el 25 % y el 46 % de los casos, referidos estos datos a muestras del tamaño estudiado.

B) Sin hacer ninguna clase de hipótesis acerca de la distribución de la población y en el caso más general y desfavorable posible, aplicamos el teorema de Chebicheff que nos dará la probabilidad de eficacia dentro de ciertos topes de probabilidad:

p : 0,35 % 35 %.

Desv. Standard: 0,054.

Intervalo de seguridad: k / 15 % / 0,15 % (— 3 D.S.)

p f — 0,35 0,15 1: $\frac{(0,054)^2}{(0,15)^2}$:

p 0,15 f 0,50 0,876 87 %

Teniendo en cuenta la generalidad del teorema de Chebicheff podemos afirmar que en más del 87 % de las muestras de igual tamaño el tratamiento será eficaz entre límites que oscilan entre el 20 % y el 50 %.

Del cotejo de ambos análisis, resulta que los datos obtenidos son altamente significativos desde el punto de vista estadístico.

Estos resultados coinciden con los de muchos autores extranjeros (⁹²⁻¹⁰⁵) en los que se observa un porcentaje de éxitos que oscila entre el 20 y el 40 % de los casos. De todos modos es aún difícil comparar los resultados porque se toman grupos disímiles y se usan drogas, dosis y duración de tratamientos diferentes; sin embargo es fácil detectar que se observa una respuesta efectiva en aquellos pacientes con lesiones glomerulares leves. El porcentaje de pacientes en los que la terapéutica ha sido exitosa supera la probable crítica que surge de algunas publicaciones en las que se sostiene que un 18 % de enfermos afectados por nefropatías crónicas alcanzarían la curación o la estabilización en forma espontánea o imprevisible.

El tiempo mínimo de tratamiento debe ser seis meses, hecho que coincide con el tiempo de renovación de la membrana basal del capilar glomerular. En nuestra casuística se observa que la mayor parte de pacientes que alcanzaron la curación total son menores de 12 años, a pesar de que se trataba en muchos casos de glomerulitis lobulillar o glomerulonefritis proliferativa.

La casi totalidad de los pacientes tratados presentaban al principio una proteinuria no selectiva (ver capítulo 4); en algunos se halló después del tratamiento una variación de la proteinuria hacia el tipo selectivo, que coincidió con una remisión casi total de la sintomatología clínica. Los valores de estas proteinurias residuales oscilaron entre 0,05 y 0,20 gramos/24 hs.

Como es difícil determinar en qué momento es oportuno suprimir la terapéutica, en trabajos anteriores creíamos conveniente efectuar un nuevo control histopatológico. Actualmente no lo consideramos imprescindible y utilizamos el criterio de estabilización por un período de seis meses.

En resumen, creemos que el uso de drogas inmunodepresoras está indicado en ciertas glomerulopatías de probable patogenia inmunológica en las que otros tratamientos clásicos han fracasado, pero debe realizarse con todas las precauciones que surgen de su acción tóxica. También recomendamos el uso precoz de la medicación (¹⁰⁶), cuando las lesiones glomerulares no son aún muy avanzadas y permiten la recuperación total del paciente.

Como ya se mencionó al hablar de los resultados, el suero o gammo globulina antilinfocitaria, tan eficaz para prevenir el rechazo de los injertos, no parece útil para el tratamiento de las nefropatías; esta impresión coincide con la de otros autores, si bien la experiencia general al respecto es escasa.

EFECTO DE LAS DROGAS INMUNODEPRESORAS SOBRE LA PATOLOGIA DE LA NEFRITIS POR COMPLEJOS INMUNES AUTOLOGOS

A pesar del empleo extendido de agentes inmunodepresores en el tratamiento de las nefropatías humanas con patogenia inmunológica sospechada o certificada, y de los éxitos terapéuticos obtenidos (ver capítulo 5), aún no están bien aclarados los mecanismos anatómicos de remisión de esas nefropatías.

El hecho de que la nefritis experimental por complejos inmunes autólogos (ver capítulo 2) curse con una patología y clínica similar a la de algunas enfermedades renales humanas —en especial la glomerulitis membranosa, la nefritis lipoidea genuina y la nefritis del lupus eritematoso sistémico— nos indujo a contemplar la posibilidad de utilizarla para poder estudiar la acción de los agentes inmunodepresores sobre las características ultraestructurales y humorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En treinta ratas Wistar se indujo nefritis por complejos inmunes autólogos de acuerdo con la técnica descrita en el capítulo segundo. Una vez obtenida una proteinuria persistente, los animales se dividieron en tres lotes de 10 individuos cada uno. Uno de ellos se mantuvo sin tratamiento, en tanto que los dos restantes recibieron durante 30 días 12 mg/kg día de *clorambucil*, y 12,5 mg/kg/día de *6-mercaptapurina*, respectivamente. Las drogas se administraron por vía oral mediante una sonda gástrica. Antes de iniciar el tratamiento con drogas inmunodepresoras, a los animales de estos dos lotes, y cada diez días se les practicaron las siguientes determinaciones: proteinuria, nitrógeno ureico sanguíneo, proteínas totales sanguíneas y fraccionamiento electroforético de las proteínas séricas sobre papel.

Veinticuatro horas después de la última administración de agentes inmunodepresores se sacrificaron todos los animales y los riñones se procesaron como se describe en el capítulo segundo.

RESULTADOS

1) *Lote control*: Los hallazgos ultraestructurales fueron similares a los descritos en el capítulo segundo. La membrana basal glomerular apareció engrosada como consecuencia de la aposición de depósitos localizados selectivamente a nivel de la vertiente subepitelial. La luz capilar era permeable y tanto el endotelio como el mesangio no presentaban modificaciones. Del resto del nefrón, sólo el sector proximal mostró modificaciones. Las células epiteliales presentaban gotas lipídicas citoplasmáticas abundantes y un marcado aumento de lisosomas, citosomas y citosegrogosomas. Los organoides citoplasmáticos y el núcleo no presentaban modificaciones. La membrana basal tubular proximal estaba notablemente engrosada (Fig. 9) y ocasionalmente aparecía heterogénea, con zonas de mayor densidad electrónica en los sectores alejados de las células epiteliales.

2) *Lotes tratados con drogas inmunodepresoras*: Las modificaciones fueron similares en los dos lotes independientemente del agente inmunodepresor empleado —clorambucil ó 6-mercaptapurina—. Al comparar con el lote control, los glomérulos no presentaban modificaciones. El número y tamaño de los depósitos era similar en el lote control como en los tratados.

Pero en cambio existía diferencia notable a nivel de los tubos proximales. En ellos, las células epiteliales mostraron una acentuada disminución del número de gotas lipídicas, las que en la mayoría de los animales estaban ausentes. Aparentemente la disminución de lípidos citoplasmáticos era coincidente con un incremento del número de microcuerpos o peroxisomas. Estos eran especialmente abundantes en la mitad basal de las células epiteliales y aparecían vinculados en forma casi constante con cúmulos de cisternas del retículo endoplásmico liso (Fig. 10). En numerosos campos se observaron imágenes sugestivas de formación "de novo" de peroxisomas a partir de los cúmulos citados de retículo endoplásmico.

Las modificaciones más llamativas asentaron a nivel de la membrana basal tubular. La misma aparecía notablemente heterogénea y en ella era posible observar dos capas: una inmediatamente subyacente a la membrana plasmática basal de las células epiteliales, y la otra separada de la anterior por un cúmulo de elementos heterogéneos de forma esférica y rodeados de membrana plasmática. Generalmente el sector subepitelial presentaba un espesor similar al de la membrana basal, en tanto que el restante excedía mucho esta dimensión (Fig. 11). Los elementos heterogéneos que separaban ambas zonas de la membrana basal, estaban en aparente continuidad con las células epiteliales



FIG. 9. — *Nefritis experimental por complejos autólogos-rata. Acción de las drogas inmunodepresoras. Lote control no tratado. Microscopia electrónica. Se observa el aumento de espesor de la membrana basal del tubo proximal. (Mb). Mag. x 9.000.*

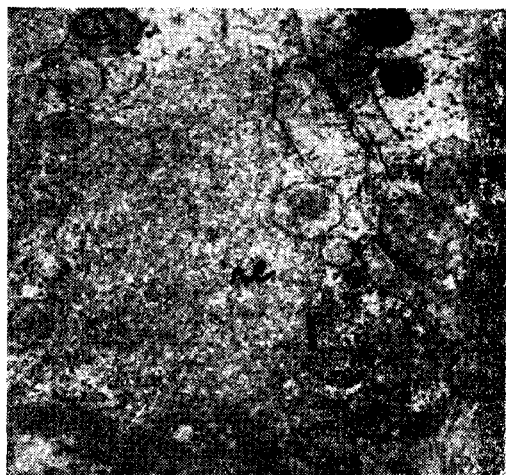


FIG. 10. — *Nefritis experimental por complejos autólogos-rata. Acción de las drogas inmunodepresoras. Lote tratado. Microscopia electrónica. Se observa el aumento en el número de peroxisomas (p) vinculados a cúmulos de cisternas de retículo endoplásmico liso (re). Mag. x 9.000.*



FIG. 11. — *Igual que la anterior. Se ve claramente la disección de la membrana basal (Mb); la lámina subepitelial es más delgada que la distal, y se observan elementos heteroféneos (h) separando ambas láminas. Mag. x 9.000.*

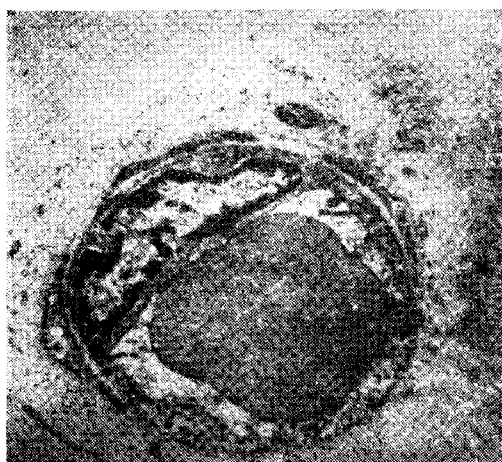


FIG. 12. — *Capilar cutáneo de un paciente con glomerulonefritis crónica. Inmunohistoquímica ultraestructural. Se observan en la pared gránulos con actividad fosfatásica que señalan la presencia de gamma globulina autóloga portadora de anticuerpos. Mag. x 3.000.*

tubulares. En cortes afortunados fue posible observar protrusiones del sector basal de dichas células que se insinuaban desecando ambos sectores de la membrana basal; esta disección no estaba extendida a toda la superficie del tubo proximal, alternando zonas de basal engrosada y homogénea con zonas de basal disecada y heterogénea.

3) *Alteraciones humorales*: Las proteinurias del lote control fueron siempre superiores a los 1.000 mg % hasta el final de la experiencia. La urea se mantuvo por encima de 480 mg % y las curvas electroforéticas evidenciaron hipoalbuminemia de alrededor de 20-25 % del total de proteínas, con aumento de alfa-2 y beta globulinas. En cambio en los lotes tratados con drogas inmunodepresoras se observó una notable disminución de la proteinuria hasta un promedio de 150 mg %, la urea descendió a un valor de 310 mg % y no se alteraron los valores porcentuales de las proteínas plasmáticas, cuyo esquema patológico se mantuvo. Esto recuerda que en pacientes con glomerulitis membranosa tratados con dichas drogas, uno de los elementos últimos en regularizarse es la curva de electroforesis proteica. Los hallazgos humorales y la evolución de las proteinurias determina que si bien las drogas inmunodepresoras disminuyen la cantidad de proteinuria excretada diariamente, no son capaces, en el tiempo que se administraron en esta experiencia, de modificar la patente proteica sérica comparada con el lote control.

DISCUSIÓN

Aparentemente la administración de drogas inmunodepresoras es capaz de modificar las lesiones existentes en la nefritis por complejos inmunes autólogos. Llama la atención que los cambios hallados asentaron a nivel de los tubos proximales. Los glomérulos no se modificaron al compararlos con los lotes controles no tratados. Esto puede ser interpretado como consecuencia del lento intercambio de los componentes de la membrana basal glomerular, la que se renovaría totalmente aproximadamente en 180 días. El menor tiempo transcurrido en nuestros experimentos, indicaría la estabilidad de los complejos inmunes ubicados en la vertiente subepitelial de la pared capilar, los que recién desaparecerían o disminuirían al ser metabolizados junto con los restantes componentes de la membrana basal.

Por otra parte, nuestras observaciones indican que los podocitos son incapaces de remover por completo los complejos inmunes en el lapso de tiempo utilizado en nuestros experimentos, persistiendo las lesiones glomerulares a pesar de suprimir la agresión inmunológica.

Las modificaciones tubulares asentaron a nivel de las células epiteliales y de la membrana basal del sector proximal del nefron. En las primeras llamó la atención la paralela disminución de gotas lipídicas y el aumento de peroxisomas. Aunque todavía no está aclarada la función de estos componentes citoplasmáticos, la existencia en los mismos de abundante cantidad de peroxidasas motiva que se los considere vinculados con la peroxidación de componentes citoplasmáticos, en especial lípidos. Esta interpretación apoyaría la hipótesis que estos lípidos acumulados en las células epiteliales serían metabolizados y eliminados por medio de esta peroxidación.

Las modificaciones halladas a nivel de la membrana basal de los tubos, son de difícil interpretación. Aparentemente en las mismas desempeñarían un papel importante las células epiteliales, las que por medio de expansiones digitiformes de la membrana plasmática y citoplasma basales, se insinúan disecando la membrana basal en dos zonas. Es conocido desde corto tiempo atrás que la membrana basal es sintetizada por las células tubulares. De acuerdo con este concepto, parece lógico suponer que las células epiteliales una vez suprimida

la agresión inmunológica sintetizarían nueva basal normal desembarazándose de la anterior patológica, mediante un proceso activo.

Aparentemente las drogas inmunodepresoras son capaces de modificar la estructura tubular en la nefritis por complejos inmunes autólogos, la que tiende a volver a la normalidad. Este hecho indicaría que la lesión tubular es consecuencia de la agresión inmunológica existente en este modelo experimental de enfermedad renal.

VI

INMUNOHISTOQUIMICA ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CAPILARES CUTANEOS EN DIVERSAS NEFROPATIAS CON Y SIN EDEMAS

En este capítulo se describen las investigaciones destinadas a estudiar, mediante la inmunohistoquímica ultraestructural, los capilares cutáneos de pacientes con diversas enfermedades renales glomerulares de patogenia inmunológica (ver capítulos 1 y 2), a los efectos de establecer la coparticipación de dichos capilares en el proceso inmunológico que afecta al riñón y también en la fisiología de los edemas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se calificó la nefropatía de 14 pacientes mediante el examen clínico y de laboratorio, determinando la proteinuria y la depuración de la creatinina endógena verdadera —método de Owen—, y practicando el recuento de Addis y la disociación de las proteínas plasmáticas y urinarias mediante electroforesis en gel de acrilamida e inmunoelectroforesis (ver capítulo 4). Además a cada paciente se le efectuó una biopsia de riñón y de piel de la zona lumbar, simultáneamente.

Cada muestra biopsica se fraccionó para realizar su estudio histológico ultraestructural e inmunohistoquímico con microscopía electrónica. Para esto último, se utilizó la técnica de Nakane y Pierce (³) y se realizaron los controles ya descritos en los capítulos 1 y 2 para evitar interpretaciones erróneas.

La dificultad para aplicar tantos métodos a cada biopsia y detectar capilares cutáneos a nivel ultraestructural, redujo el material útil a 8 enfermos: 5 tenían glomerulonefritis crónica, 2 nefritis lúpica y 1 glomerulitis membranosa. De los mismos pacientes 6 tenían edemas intensos y 2 no.

RESULTADOS

Con respecto a los hallazgos efectuados, los 4 pacientes en los que se comprobó gamma globulina autóloga portadora de anticuerpos en las paredes de los capilares glomerulares, también la tenían los capilares cutáneos. Dos de estos enfermos eran portadores de una glomerulonefritis crónica y en ellos la gamma globulina autóloga de los capilares glomerulares tenían disposición difusa, como se observa cuando se trata de anticuerpos anti-riñón; los otros tenían nefritis lúpica y la gamma autóloga tenía una disposición en acúmulos, demostrando que se trataba de complejos antígeno-anticuerpo.

En los capilares cutáneos, los gránulos con actividad fosfatásica se localizaron en la membrana basal y entre aquélla y la membrana plasmática del endotelio (Fig. 12).

En los otros 4 pacientes —3 con glomerulonefritis crónica y 1 con glomerulitis membranosa— no se halló gamma globulina autóloga en los glomérulos y tampoco en los capilares cutáneos.

En cuanto a la relación entre la presencia de esas sustancias inmunológicamente activas en los capilares cutáneos y la existencia de edemas, de los 4 pacientes con inmunohistoquímica positiva, 3 tenían grandes edemas y 1 no, pero la misma proporción existía en los 4 pacientes con inmunohistoquímica negativa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El aumento de la permeabilidad capilar puede influir en la patogenia de los edemas porque permite que pasen más proteínas plasmáticas hacia el intersticio. Al disminuir la presión oncótica del plasma y aumentar la del líquido intersticial, se producirían leves edemas; por otra parte la hipovolemia movilizaría otros factores —aldosterona, tercer factor— que determinan el balance positivo del sodio.

Algunos autores midieron las variaciones en la concentración de las proteínas intravasculares e intersticiales y no pudieron establecer diferencias en favor de este factor patogénico. A pesar de ello, en la actualidad se estudia la vinculación que podría tener, con el origen de ciertos edemas, la ubicación de complejos antígeno-anticuerpo circulantes solubles, en las paredes de los vasos sistémicos; este mecanismo podría aumentar la permeabilidad capilar en algunas inmunopatías.

Algunos trabajos demostraron que los complejos inmunes pueden ubicarse en las paredes vasculares por debajo del endotelio y por dentro de la basal (¹⁰⁷⁻¹¹⁰); ello ocurriría más fácilmente si los complejos son grandes —mayores de 19 S— y si su concentración en el plasma supera los 15 microgramos en nitrógeno por ml de plasma (¹⁰⁹⁻¹¹¹). Pero tal ubicación sería más bien una consecuencia del aumento de permeabilidad vascular originado por la acción previa de sustancias vasoactivas —histamina—, que una causa de dicha permeabilización. El daño vascular, que sería un epifenómeno que requiere la presencia de complemento (²⁷) y de polinucleares, se manifestaría por proliferación endotelial, trombosis y necrosis. Según estos hechos, el secuestro vascular de complejos inmunes no tendría relación directa con la patogenia de los edemas. Sin embargo dichas investigaciones distan de ser definitivas porque se usaron complejos preformados y métodos inmunológicos indirectos para deducir la ubicación ultraestructural de los complejos.

Por lo tanto, a pesar del pequeño número de casos por nosotros estudiado en este capítulo, resultan muy interesantes las conclusiones que de ellos pueden extraerse y que se refieren a continuación:

1) Cuando se encuentra gamma globulina autóloga portadora de anticuerpo en los capilares de los glomérulos afectados por glomerulonefritis crónica o nefritis lúpica, dicha sustancia también aparece en los capilares cutáneos.

En los capilares de la piel esa sustancia se ubica en la membrana basal y entre ésta y la membrana plasmática, y no se observan diferencias cualquiera que sea su apariencia en los capilares renales: ya sea que se trate de auto-anticuerpo distribuido debajo del endotelio en disposición lineal o de acúmulos subepiteliales de complejos antígeno-anticuerpo.

3) No parecería existir relación entre la presencia de gamma globulina portadora de anticuerpo en los capilares cutáneos y la existencia o no de grandes edemas.

4) Si observaciones posteriores confirmaran que siempre que hay glome-

ropatías inmunológicas también existe gamma globulina autóloga en los capilares cutáneos, las biopsias de piel —muy sencillas e inocuas— serían útiles para diagnosticar esas enfermedades y tratarlas con los modernos métodos inmunodepresores.

BIBLIOGRAFIA

- 1 *Andres, G. A.; Accini, L.; Hsu, K. C.; Zabriskie, J. B. and Seegal, B. C.*: J. Exp. Med., 123: 399, 1966
- 2 *Seegal, B. C.; Andres, G. A.; Hsu, K. C. and Zabriskie, J. B.*: Fed. Proc., 24: 100, 1965.
- 3 *Nakane, P. K. and Pierce, G. B. Jr.*: J. Cell Biol., 33: 307, 1967.
- 4 *Eyquem, A. et De Saint Martin, J.*: Transfusion (Paris), 10: 313, 1967.
- 5 *Grichman, E.; Perush, J. C.; Rosen, S. M. and Churg, J.*: Lab. Invest., 16: 717, 1967.
- 6 *Hadley, W. K. and Rosenau, W.*: Arch. Path., 83: 342, 1967.
- 7 *Koffler, D.; Agnello, V.; Carr, R. I. and Kunkel, A. G.*: IVth International Congress of Nephrology. Abstracts. General Sessions-Sympesia, 38 Stockholm, June 22-27, 1969.
- 8 *Svec, K. H.; Blair, J. D. and Kaplan, M. H.*: J. Clin. Invest., 46: 558, 1967.
- 9 *Vernier, R. L.; Tinglof, B.; Urizar, R.; Litman, N. and Smith, F. Jr.*: IIIrd. International Congress of Nephrology. Clinical Nephrology, 3: 83. Washington, September 25-30, 1966.
- 10 *Dixon, F.*: First Meeting of the American Society of Nephrology. Cit. in Nephron, 5: 157, 1968.
- 11 *Lerner, R. A.; Glasscock, R. J. and Dixon, F. J.*: J. Exp. Med., 126: 989, 1967.
- 12 *Good, R. A.; Michael, A. F.; Herdman, R. C.; Gewurz, H.; Pickering J.; Drumond, K. N.; Fish, A. J. and Vernier, R. L.*: IIIrd. International Congress of Nephrology. Abstracts I. General Sessions-Symposia, 118 Washington, 25-30, 1966.
- 13 *Mellors, R. C. and Ortega, L. G.*: Am. J. Path., 32: 455, 1956.
- 14 *Steiner, J. W.; Slater, R. J. and Movat, H. Z.*: Lab. Invest., 10: 763, 1961.
- 15 *Oshima, K. and Hatano, M.*: IVth International Congress of Nephrology. Abstracts I. Free Communications, 43 Stockholm, June 22-27, 1969.
- 16 *Forland, M. and Spargo, B. H.*: Nephron, 6: 498, 1969.
- 17 *Unanue, E. R.; Dixon F. J. and Feldman, J. D.*: J. Exp. Med., 125: 163, 1967.
- 18 *Laquens, R. and Segal A.*: Exp. Mol. Path., 11: 89, 1969.
- 19 *Miatello, V. R.; Laquens, R. y Bozzola, C. J.*: "Inmunopatología y transplante de órganos. Su aplicación a la Nefrología", 1ª edición. López Libreros Editores, Buenos Aires, 1969.
- 20 *Heymann, W.; Hackel, D. B.; Harwood, S.; Wilson, S. G. F. and Hunter J. L. P.*: Proc. Soc. Exptl. Biol., 100: 660, 1959.
- 21 *Heymann, W.; Kmetec, E. P.; Wilson, S. G. F.; Hunter, J. L. D.; Hackel, D. B. and Cuppage F.*: Third. Int. Symp. Immunopathol., 240, 1963.
- 22 *Heymann, W.; Kmetec, E. P.; Wilson, S. G. F.; Hunter, J. D. L.; Hackel, D. B.; Okuda, R. and Cuppage, F.*: Ann. N. Y. Acad. Sci., 124: 310, 1965.
- 23 *Millonig, G.*: Fifth Intern. Congr. Electron. Microscopy, 2: 8, 1962.
- 24 *Luft, J.*: J. Biophys. Cytol., 9: 409, 1961.
- 25 *Reynolds, E. S.*: J. Cell. Biol., 17: 208, 1963.
- 26 *Lawn, A. M.*: J. Biophys. Biochem. Cytol., 7: 197, 1960.
- 27 *Edgington, T. S.; Glasscock, R. J. y Dixon, F. J.*: J. Exptl. Med., 126: 555, 1968.
- 28 *Glasscock, R. J.; Edgington, T. S.; Watson, J. L. y Dixon, F. J.*: J. Exptl. Med., 127: 573, 1968.
- 29 *Feldman, J. D.*: Third Intern. Sym. Immunopathol., 263, 1963.
- 30 *Hess, E. V.; Ashworth, C. T. y Ziff, M.*: Ann. N. Y. Acad. Sci., 124: 323, 1965.
- 31 *Lange, K.; Wachstein, M.; Treser, G. y Mc Pherson, S. E.*: en Autoimmunity Experimental and Clinical Aspects. P. I. Ed. Whipple H. E., Am. N. Y. Acad. Sci., 124: 329, 1965.
- 32 *Liu, T. C. y McCrory, W. W.*: J. Immunol., 81: 492, 1958.
- 33 *Biswas, S. K.; Sengupta, K. P. y Basu; Mallick, K. G.*: J. Indian. Med. Ass., 47: 1, 1966.

- ³⁴ Kasukawa, R.; Anthone, R.; Abeyounis, C. J. y Milgrom, F.: *Int. Arch. Allergy*, Basilea, 32: 563, 1967.
- ³⁵ Kasukawa, R.; Abeyounis, C. J.; Ray, D. K. y Migrom, F.: *Int. Arch. Allergy*
- ³⁵ Kasukawa, R.; Abeyounis, C. J.; Ray, D. K. y Milgrom, F.: *Int. Arch. Allergy*, Basilea, 32 490, 1967.
- ³⁶ Ciurdarú, P.; Gherman, G. y Podut, A.: *Med. Interna (Buc)*, 20: 215, 1968.
- ³⁷ Lerner, R. A.; Glasscock, R. J. y Dixon, F. J.: *J. Exp. Med.*, 126: 989, 1967.
- ³⁸ Dixon, F.: *Nephron*, 5: 157, 1968.
- ³⁹ Merrill, J. P.: en *Proceedings of the First International Congress of Nephrology*. Ginebra. Ed. S. Karger, Basilea, 1961.
- ⁴⁰ Peterse, V. P.; Olsen, S.; Kissmeyer-Nielsen, F. y Fieldborg, O.: *N. Engl. J. Med.*, 275: 1969.
- ⁴¹ Zanetti, N.; Miatello, V. R.; Gargiulo, J. y Roldán, I.: *Pren. Méd. Argen.*, 56: 205, 1969.
- ⁴² Marchissio, A.: citado en *Electroforesis en Poliacrilamida*. Buenos Aires, F. Crudo Caamaño, 1966.
- ⁴³ Traeger, J.; Creyssel, R.; Fries, D.; Manuel, Y. y Revillard, J.: *Actualite Nephrol. de l'Hopital Necker*. Paris. Ed. Medicales Flammarion, 1966.
- ⁴³ Hamburger, J.; Richet, G.; Crosnier, J.; Furck-Brentano, J.-L.; Antoine, B.; Ducrot, H.; Mery, J.-P. y de Montera, H.: "Nephrologie". Paris. Ed. Medicales Flammarion, 1966.
- ⁴⁵ Traeger, J.; Manuel, Y.; Revillard, J. P. y Fries, D.: *J. d'Urol. et Nephrol.*, 73: 327, 1967.
- ⁴⁶ Harrison, J. F.; Lunt, G. S.; Scott, P. y Blainei, J. D.: *Lancet*, 1/7539: 371, 1968.
- ⁴⁶ Harrison, J. F.; Lunt, G. S.; Scott, P. y Blainey, J. D.: *Lancet*, 1/7539: 371, 1968.
- ⁴⁷ Hardwicke, J.; Blainey, J. D.; Brewer, D. B y Soothill, J. F.: en *Proc. 3rd Inter. Congr. Nephrol.* Washington, 1966, Vol. 3, P. 69. Ed. S. Karger, Baseel, New York, 1967.
- ⁴⁸ Michielsen, P. y Lambert, P. P.: *J. d'Urol. et Nephrol.*, 73: 340, 1967.
- ⁴⁹ Roldán, I.; Miatello, V. R.; Bozzola, C. y Zanetti, N.: *Comunicación en la Reunión Extraordinaria de la Sociedad Argentina de Nefrología, A.M.A.* Buenos Aires, 6/XII/1968.
- ⁵⁰ Vere, D. W. y Walduck, A.: *Clin. Sci.*, 30: 315, 1966.
- ⁵¹ Miatello, V. R. y Moro, A.: *Abstracts I. Free Communications. IV Int. Congr. of Nephrology*. Estocolmo, Suecia, Junio 22-27, 1969.
- ⁵² Maiorca, R. y Scarpioni I.: "Le proteinurie", Roma. Ed. Il Pensiero Scientifico, 1968.
- ⁵³ Karnovsky, M. J.; Venkatachalam, M. A.; Graham, R. C. (Jr.) y Cetran, R. S.: en *Abstracts General Sessions-Symposia. 4th. International Congress of Nephrology*. Estocolmo, Suecia, Junio 22-27, 1969.
- ⁵⁴ Soothill, J. F.: *J. Lab. Clin. Med.*, 59: 859, 1962.
- ⁵⁵ *Idem*: en *Abstracts General Sessions-Symposia. 4th. International Congress of Nephrology*. Estocolmo, Suecia, Junio 22-27, 1969.
- ⁵⁶ Hardwicke, J.: *Clin. Cim. Acta*, 12: 89, 1965.
- ⁵⁷ Hulme, B. y Hardwicke, J.: *Proc. Roy. Soc. Med.*, 59, 509, 1966.
- ⁵⁸ Petrie, J. J. B.; Mac Lean, P. R. y Robson, J. S.: *J. Clin. Sci.*, 34: 83, 1968.
- ⁵⁹ Diaz Rubio M.: *Nefrosis y Síndrome Nefrótico*, Madrid Editorial, Paz Montalvo, 1959.
- ⁶⁰ Cohen, A. M. y Walker, W. G.: *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 571, 1967.
- ⁶¹ Creeth, J. M.; Kerwick, R. A.; Flynn, F. V.; Harris, H. y Robson, E. B.: *Clin. Chim. Acta*, 8: 406, 1963.
- ⁶² Maiorca, R. y Scarpioni, I.: *Clin. Chim. Acta*, 8: 710, 1963.
- ⁶³ Luetscher, J. A.: *J. Clin. Invest.*, 19: 313, 1940.
- ⁶⁴ Blackman, S. S.; Goodwin, E. W. (Jr.) y Buell, M. V.: *Bull. Johns Hopk Hops.*, 69: 397, 1941.
- ⁶⁵ Smithies, O.: *Advanc. Protein. Chem.*, 14: 65, 1959.
- ⁶⁶ Hammack, W. J.; Moore, M. y Albert, B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 437, 1964.
- ⁶⁷ Milliez, P.; Hartmann, L. y Lagrue, G.: *J. d'Urol. et Néphrol.*, 65: 248, 195.
- ⁶⁸ Wheeler, G. P.: *Fed. Proc.*, 26: 885, 1967.
- ⁶⁹ Berenbaum, M. C.: *Brit. Med. Bull.*, 21. 140, 1965.
- ⁷⁰ Elion, Gertrude B.: *Fed. Proc.*, 26: 898, 1967.
- ⁷¹ Weisberg, A. S.; Moore, R. D. y Schoenberg, M.: *J. Lab. Clin. Med.*, 67: 58, 1966.
- ⁷² Michielsen, P. y Lambert, P. P.: *J. Urol. Nephrol.*, 73: 341, 1967 .

- 73 *Michielsen, D.; Verberckmoes, R.; Desmet, V. y Hemerijckz, W.*: en IVth Intern. Cong. Nephrol. Abstracts. Estocolmo, 22-27 Jun., 1969.
- 74 *Ross, E. J.*: Ibid.
- 75 *Conte, J.; Suc, J. M. y Mignon-Conte, R.*: J. Urol. Nephrol., 73: 850, 1967.
- 76 *Winkolman, R. K.; Merwin, C. F. y Brunsting, L. A.*: Ann. Intern. Med., 55: 772, 1961.
- 77 *Reubi, F.*: "Néphrologie Clinique", Paris, Masson y Cie., 1961.
- 78 *Kaiser, E. y Raab, W.*: Z. Immun. Forsch. Allergie. Klin. Immunol., 134 :167, 1967.
- 79 *Heidman, R. C.; Michael, A. F. y Good, R. A.*: en IVth Intern. Cong. Nephrol. Abstracts. Estocolmo, 22-27 Jun., 1969.
- 80 *Spooner, G.; Quesada, A.; Pickering, M.; Hackett, R. y Cade, R.*: Ibid.
- 81 *Waksman, B. H.; Arbouys, S. y Arnason, B. G.*: J. Exptl. Med., 114: 997, 1961.
- 82 *Woodruff, M. F. A.*: The transplantation of Tissues and Organs. Springfield III: Thomas, 1960.
- 83 *Starzl, E. T.; Marchioso, T. L. y Imasaki, Y.*: Fed. Proc., 26: 944, 1967.
- 84 *Pavlovsky, S.; Sanguinetti, E. A.; Pachman, A. E. y Pavlovsky, A.*: XIII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Corrientes. 31 Oct., 4 Nov., 1968. Medicina, 28: 370, 1968.
- 85 *Peuchot, Ch.; Sanguinetti, E. A.; Pavlovsky, S.; Duhart, E.; Charalambopoulos, C. y Bachman, A. E.*: Idem, p. 369.
- 86 *Schwartz, R. y Dameshek, W.*: "Nature", 183: 1628, 1959.
- 87 *Santos, G. W.*: Fed. Proc., 26: 907, 1967.
- 88 *Schwartz, R.*: Idem, p. 914.
- 89 *Swanson, M. A. y Schawartz, R.*: New Eng., J. Med., 277: 163, 1967.
- 90 *Karnofsky, D.*: Fed. Proc., 26: 925, 1967.
- 91 *Moro, M. E. y Miatello, V. R.*: XII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Corrientes. 31 Oct., 4 Nov., 1968. Medicina, 28: 385, 1960.
- 92 *Lagrue, G.; Mariéty, J. y Milliez, D.*: en Actualités Néphrologiques de l'Hospital Necker. Paris. Ed. Med. Flammarion, 1964.
- 93 *White, R. H. R.; Cameron, J. S. y Trounce, J. R.*: Brit. Med. J., 2: 853, 1966
- 94 *Dorhout Mees, E. J. y Kooiker, C. J.*: "Nephron", 4: 60, 1967.
- 95 *Bariéty, J.; Lagrue, G. y Milliez, P.*: en International Congress of Nephrology. Abstracts II, Free Communications. Washington, Sep. 25-30, 1966.
- 96 *Van Pelt, W.*: Ibid.
- 97 *Pearl, M. A.; Oelsner, Th. y Burch, R. R.*: Ibid.
- 98 *Campanacci, L.; Castellani, A.; Gambari, P.; Pidutti, F. y Magalini, M.*: en IVth Intern. Cong. Nephrol. Abstracts I, Free Communications. Estocolmo, 22-27 Jun., 1969.
- 99 *Drinkard, J.; Dornfeld, L.; Adams, D.; Barnett, E. y Gonick, H.*: Ibid
- 100 *Lagrue, G. y Bariéty, J.*: Ibid., 101.
- 101 *Brun, C.; Baslov, J. T.; Jorgensen, F.; Jorgensen, H. E.; Lorenzen, I. y Thomsen, A. C.*: Ibid.
- 102 *Bianchessi, M.; Bianchi Porro, G. y Tagliabue, M.*: Ibid.
- 103 *Shoeppe, W.; Shoeppe, B.; Lapp, H.; Koch, K.; Mondorf, W. y Nemetz, U.*: Ibid.
- 104 *Tareev, E.; Poliantzava, L.; Muchin, N. y Tareeva, I.*: Ibid.
- 105 *Fries, D.; Bruna Blanc, N.; Bassillon, N.*: J. Urol. Nephrol., 74: 1012, 1968.
- 106 *Lagrue, G. y Bariéty, J.*: en X Congreso Internacional de Terapéutica. Paris, 2-4 Octubre, 1969.
- 107 *Kochrane, Ch. G.*: J. Exper. Med., 118: 498, 1963.
- 108 *Idem*, pág. 503.
- 109 *Kniker, W. T. y Kochrane, Ch. G.*: Ibid., 127: 119, 1968.
- 110 *Kochrane, Ch. G. y Hawkins, D.*: Ibid., pág. 137.
- 111 *Hawkins, D. G.*: Fed. Proc., 25: 473, 1966.