

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**EFFECTOS INMUNODEPRESORES Y ANTI –
INFLAMATORIOS DEL MOFETIL MICOFENOLATO EN
LA NEFRITIS EXPERIMENTAL AUTOINMUNE INDUCIDA
POR MERCURIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Nieto Rubio

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Mampaso Martín – Buitrago
Guillermo Pérez de Lema Holweg

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1708-X

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología III

**EFFECTOS INMUNOSUPRESORES Y ANTI-INFLAMATORIOS
DEL MOFETIL MICOFENOLATO EN LA NEFRITIS
EXPERIMENTAL AUTOINMUNE INDUCIDA POR MERCURIO**

**Tesis para optar al Grado de Doctor
presentada por Elena Nieto Rubio
Servicio de Anatomía Patológica, Sección de Inmunopatología,
Hospital Ramón y Cajal, Madrid.
Septiembre, 2002**

A mi madre
A Juan Hernanz

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años he tenido la gran suerte de poder contar con la ayuda y el apoyo de muchas personas. A todos ellos les estoy enormemente agradecida. Sin vosotros, hubiese sido imposible. En especial, deseo mostrar mi agradecimiento:

A los directores de esta tesis: al Dr. Francisco Mampaso por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por confiar en que pudiese sacar este trabajo adelante y por darme libertad que necesitaba para trabajar, y al Dr. Guillermo Pérez de Lema por haber estimulado mi curiosidad científica en épocas de escepticismo, por ofrecerme la posibilidad de trabajar con él en Munich y por el apoyo personal que me ha dado durante estos últimos años.

A mis tutores, a la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea y al Dr. José Ramón Regueiro, por aceptar la tutoría de esta tesis, con toda la burocracia que ello conlleva, así como por prestarme su ayuda siempre que la necesité.

Al Dr. Fernando González Palacios, jefe del servicio de Anatomía Patológica, por haber hecho posible la realización de esta tesis.

A las que fueron mis primeras compañeras, a Ana Martín y a Esther Escudero, que aunque dejaron el grupo siempre han estado muy cerca. Ellas me dieron la mejor acogida que se puede esperar cuando llegué al laboratorio, me enseñaron la mayor parte del trabajo experimental que entraña esta tesis, hicieron del sitio de trabajo un buen lugar para la convivencia y me ayudaron en todo momento. Sin embargo, y aunque mucho, esto no ha sido lo más importante. Gracias a ellas y a Elena Navarro, Rebeca R. Pena, Belén Huerta, y a M^a del Carmen Varela, que llegaron después, he llegado hasta aquí. Porque no dejaron que me rindiera nunca y, además de compartir alegrías y triunfos, estuvieron junto a mí en los peores momentos demostrándome su amistad incondicional. Este trabajo es suyo también.

Además de con ellas, he pasado muchas horas al día con el personal del Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal, sobre todo con el de la sección de Autoinmunidad, al que quiero agradecer su compañía y buena predisposición en todo

momento y el que hayan estado cerca de mí no sólo espacialmente. Los residentes y becarios que fueron rotando durante este tiempo me ofrecieron su apoyo, tanto científico como personal (Sara, Manuel, Andrés, Carmen, Jose, José Antonio,...). En especial, Paco León, con el que compartí hipótesis y cafés (menos de los que nos hubiesen gustado), que creía en mí y fue dándome empujoncitos todo el tiempo para que acabase la tesis y que casi nunca me dejaba sola en el laboratorio porque siempre se iba el último...hasta que emigró a las Américas.

Al grupo del “café o té”: Laura Sánchez, Noelia Villarrubia, Jorge Mata, Cruz Sádaba, Mercedes, José Campos y María García, con los que he pasado tan buenos ratos durante este último tramo (interminable, ellos lo saben) de la tesis, que sacaban mi sonrisa cada mañana y hacían que las tardes fuesen más cortas. Así daba gusto venir a trabajar. Y al Dr. Claudio Pérez-Díaz por “adoptarme” en su grupo este último mes a la hora de la comida y compartir conmigo viajes, literatura y buen humor.

A los recién doctorados: Óscar Gómez, que desde que le conocí en la facultad me ha regalado su confianza, su cariño y su valiosa amistad, y a Miriam, que es para mí un ejemplo de fortaleza y templanza. Es una suerte haberlos encontrado de nuevo en el hospital y, aunque nunca tuviésemos mucho tiempo, un minuto con vosotros tiene un valor incalculable. Además, a Esther, buena compañera de la Facultad, y a Paula, por los cafés y horas de risas y distensión, tan necesarias, que hemos pasado juntas (¡las siguientes sois vosotras!), y a Maria Eugenia, por su ayuda con las ratitas y su simpatía hacia mí.

Al Dr. Detlef Schlöndorff, jefe del Instituto de Bioquímica Clínica del Hospital Policlínico de Munich, por permitir que se realizase allí una parte de esta Tesis, por facilitarme todo lo que necesité, y por su afectuosidad. Así como al Dr. Bruno Luckow, jefe del laboratorio de Bioquímica, por su atención y explicaciones sobre el RPA, a Frau Sylvia Chilla, que tanto puso de su parte para que nos entendiésemos y para que pudiese acabar el último experimento, y a Ana Belen Vicente, con la que me reencontré allí y me ayudó a pasar los días dentro y fuera del laboratorio. No puedo olvidarme del Dr. Holger Maier y de la Dra. Sabinne Fessele (y sus animalitos), su ayuda profesional y personal fue indispensable para mí en mi primera estancia en Munich. Y, a Blanca Bello, por su paciencia, su hospitalidad y su cariño que hicieron que Munich fuese menos frío en invierno.

A mis nuevas compañeras de laboratorio: a la Dra. Laura García-Bermejo, por el interés puesto en mí, su ayuda con las correcciones, su buen humor y sus consejos, tan necesarios y útiles en estos últimos días de confusión. A la Dra. Ana Molina, que hizo el gran esfuerzo de poner a punto el modelo experimental que tanto trabajo nos ha dado luego, por eso y por las correcciones y buenas sugerencias de última hora. A María Escribese, que tomará el relevo, y que ha tenido que sufrirme estos meses sin alterar su buen talante, ¡suerte!.

A mis amigos de la facultad, especialmente a Paco, que me acompañó a mi primera entrevista en este hospital y cuando se enteró de que iba a empezar a trabajar aquí lo celebró conmigo y al día siguiente me regaló el “Fausto” de Goethe.

Y, en último lugar (y la lista no sigue un orden, ¿eh?) quiero dar las gracias a las personas ajenas al trabajo, pero imprescindibles en mi vida:

A mi familia: a Lucía, mi madre, que necesitaría un libro entero para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, a María, mi hermana, que me quiere por lo que soy y no por lo que hago, a mi abuela, que aunque ya no pueda verme, se pondría tan contenta...y a los que a su manera, han tratado de ayudarme.

A Juan Hernanz, por su equidad, su bondad y su confianza en mí, y a la “otra familia”, que me hace sentir una más.

A mis amigos, que hacen que los fracasos del trabajo se me olviden pronto en su compañía y que saben celebrar los triunfos como nadie...y me recuerdan lo que de verdad importa.

Y, a David Hernanz, que durante tantos años ha sido y es, además de mi amor, mi Ángel de la Guarda. Él si que ha tenido que soportar todos mis altibajos. Espero tener mucho tiempo para agradecerle toda la comprensión y la ayuda que me ha dado a lo largo de todo este tiempo.

(...)

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión del Proyecto de Investigación 00/0246 del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad.

ABREVIATURAS

A	Adenina
$A_{x\text{nm}}$	Absorbancia a x nm.
Ac(s)	Anticuerpo(s)
Ag(s)	Antígeno(s)
ADA	Adenosín deaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNc	Ácido ribonucleico complementario
ATP	Adenosín trifosfato
BH ₄	Tetrahidropteridina
BN	Brown Norway
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
Ca ²⁺	Catión cálcico
d.e.	Desviación estándar
DEPC	Dietil pirocarbonato
EAE	Endefalomiелitis alérgica experimental
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Guanosina
Gi	G inhibitoria (proteína)
GMP, GDP y GTP	Guanosín monofosfato, difosfato y trifosfato.
dGTP	Desoxiguanosín trifosfato
LES	Lupus eritematosi sistémico
HE	Hematoxilina eosina
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
Hg ⁰	Mercurio neutro
Hg ⁺	Catión mercurioso
Hg ²⁺	Catión mercúrico
HgCl ₂	Cloruro de mercurio
H ₂ Oδ	Agua destilada

H ₂ O ₂	Agua oxigenada
Ia	Determinante antigénico del MHC de clase II de rata.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
IL	Interleuquina
IMPDH	Inosín 5' monofosfato deshidrogenasa
LEW	Lewis
LFA-1	Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MBG	Membrana basal glomerular
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMF	Mofetil micofenolario
MPA	Ácido micofenólico
NO	Óxido nítrico
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
OD	Densidad óptica
OPD	Dicloro orto-fenil diamida
PAF	Factor activador de plaquetas
PAS	Ácido periódico de Schiffs
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PFC	Células formadoras de placa
PKC	Proteína quinasa C
p/v	peso/volumen
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cells expressed and secreted</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
r.p.m.	revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus</i>
T	Timina

Tc	T citotóxico (linfocito)
TCR	Receptor de la célula T
TGF	Factor transformante de crecimiento
Th	T cooperador (linfocito)
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Uracilo
u.	unidades
UI	Unidades internacionales
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VLA	Antígeno de activación tardía
v/v	volumen/volumen

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. MERCURIO: PRINCIPALES INTERACCIONES MOLECULARES Y EFECTOS SOBRE LAS CÉLULAS.....	1
2. AUTOINMUNIDAD INDUCIDA POR HgCl₂.....	3
2.1. Nefritis autoinmune inducida por mercurio en la rata Brown Norway (BN).....	4
2.2. Desarrollo de la nefritis experimental.....	7
2.3. Alteraciones en el balance Th1/Th2 en la respuesta inmunológica de la rata BN: importancia en la inducción y autorregulación de la autoinmunidad.....	8
2.3.1. Regulación en la producción de citoquinas: inducción de IL-4 y deficiencia de IFN- γ	9
2.3.2. Alteraciones en las poblaciones linfocitarias T.....	12
3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN: IMPLICACIÓN EN LA NEFRITIS AUTOINMUNE INDUCIDA POR MERCURIO.....	17
3.1. Integrinas.....	17
3.2. Integrinas VLAs: VLA-4.....	18
3.3. Vía de adhesión VLA-4/VCAM-1.....	19
3.4. Integrinas α 4 y β 1 y autoinmunidad inducida por mercurio.....	20
4. INFLAMACIÓN: MEDIADORES INFLAMATORIOS Y ENFERMEDAD RENAL.....	21
4.1. Factor de necrosis tumoral α : TNF- α	22
4.2. Proteína quimiotáctica de monocitos 1: MCP-1.....	23
4.3. Óxido nítrico: NO.....	26
5. MOFETIL MICOFENOLATO: USOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.....	27
5.1. Usos del MMF.....	30
5.2. Efectos del MMF.....	31
5.2.1. Inhibición de la proliferación celular.....	31

5.2.2. Alteración de la glicosilación de moléculas de adhesión.....	32
5.2.3. Síntesis de citoquinas.....	34
5.2.4. Producción de Acs.....	35
5.2.5. Inhibición selectiva de la iNOS.....	36
5.2.6. Síntesis de otros nucleótidos.....	37
5.2.7. Inducción de apoptosis.....	37
5.2.8. Maduración y función de células dendríticas.....	37
5.3. Toxicidad del MMF.....	37

OBJETIVOS.....38

MATERIAL Y MÉTODOS.....40

1. ANIMALES.....	40
2. ANTICUERPOS.....	40
2.1. Anticuerpos monoclonales.....	40
2.2. Anticuerpos policlonales.....	40
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41
3.1. Inducción de la enfermedad autoinmune.....	41
3.2. Dosis y administración del inmunosupresor.....	42
3.3. Grupos experimentales.....	42
4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	43
4.1. Suero.....	44
4.2. Orina.....	44
4.3. Riñón.....	44
4.3.1. Inclusión en parafina.....	44
4.3.2. Congelación.....	44
4.4. Membrana basal glomerular.....	45
4.5. Linfocitos esplénicos.....	45
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	46
5.1. Estudio bioquímico.....	46
5.1.1. Valoración de la producción de Acs séricos anti-MBG mediante ELISA.....	46
5.1.2. Valoración de la producción de Acs séricos anti-ADN _{hs} mediante ELISA.....	47

5.1.3.Cuantificación de las proteínas en orina mediante ensayo colorimétrico.....	47
5.1.4.Cuantificación de nitritos en orina por el método de Griess.....	48
5.2. Estudio de histopatología renal.....	48
5.2.1. Histología renal.....	48
5.2.2.Caracterización y cuantificación del componente inflamatorio celular intersticial	48
5.2.3. Análisis de los depósitos de IgG por inmunofluorescencia.....	49
5.3. Estudio de mediadores inflamatorios.....	50
5.3.1. TNF- α	50
5.3.1.a) Valoración del TNF- α sérico mediante ELISA.....	50
5.3.1.b) Estudio de la expresión TNF- α en tejido renal mediante ensayo de protección de ribonucleasas (RPA).....	50
* Aislamiento de ARN total.....	50
* Ensayo de protección frente a ribonucleasas (RPA).....	51
5.3.2.Estudio de MCP-1 en parénquima renal mediante inmunohistoquímica.....	53
5.3.3.Estudio de iNOS en parénquima renal mediante inmunohistoquímica.....	53
5.4. Estudio de VLA-4.....	53
5.4.1.Estudio por citometría de flujo de la expresión de VLA-4.....	53
5.4.2.Estudio de la función de VLA-4 mediante ensayo de adhesión a VCAM-1....	54
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54

RESULTADOS.....55

1. ESTUDIO BIOQUÍMICO.....	55
1.1. Niveles séricos de autoanticuerpos.....	55
1.1.1.Acs. anti-MBG.....	55
1.1.2.Acs. anti-ADN _{hs}	56
1.2. Proteinuria.....	56
1.3. Excreción de nitritos en orina.....	57
2. ESTUDIO DE HISTOPATOLOGÍA RENAL.....	62
2.1. Valoración del infiltrado celular.....	62
2.2. Caracterización y cuantificación de las células infiltrantes.....	62
2.3. Análisis de los depósitos glomerulares de IgG.....	63

3. ESTUDIO DE MEDIADORES INFLAMATORIOS.....	67
3.1. TNF- α	67
3.1.1.Cinética de la concentración de TNF- α sérico.....	67
3.1.2.Expresión renal de TNF- α	67
3.2. Estudio de MCP-1 en el parénquima renal.....	68
3.3. Estudio de iNOS en el parénquima renal.....	69
4. ESTUDIO DE VLA-4.....	79
4.1. Expresión de la integrina α 4 en la membrana plasmática.....	79
4.2. Adhesión de linfocitos a VCAM-1.....	79
DISCUSIÓN.....	82
Comentarios finales.....	100
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	104

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. MERCURIO: PRINCIPALES INTERACCIONES MOLECULARES Y EFECTOS SOBRE LAS CÉLULAS

Debido a la industrialización y a los cambios ambientales durante el siglo XX los humanos y los animales están expuestos al mercurio en sus numerosos estados químicos, entre los que se incluyen: el mercurio líquido (o metálico), el vapor de mercurio (Hg^0), compuestos inorgánicos mercuriosos (Hg^+) o mercúricos (Hg^{2+}) y compuestos orgánicos mercúricos (R-Hg^+ o R-Hg-R , siendo R un ligando inorgánico)(1).

Todas las formas de mercurio producen efectos tóxicos en distintos tejidos y órganos dependiendo de la forma química, el nivel y la vía de exposición, así como de la duración de ésta. El riñón, al igual que ocurre con otros metales pesados, es su principal órgano diana. En el riñón el mercurio es captado desde la sangre, acumulado, y es donde manifiesta su toxicidad de forma preferente (2).

Para comprender la actividad biológica de los iones de Hg^{2+} en humanos y en otros mamíferos es importante tener en cuenta las interacciones moleculares que se producen entre este metal y determinadas moléculas biológicas. Los iones de mercurio se unen a un gran número de grupos nucleofílicos en dichas moléculas mostrando una gran preferencia por unirse a átomos de azufre reducidos, en particular, a grupos tiol de proteínas de membrana o a tioles intracelulares presentes en moléculas como el glutatión, la metalotioneína y la albúmina (2, 3).

Las membranas plasmáticas contienen un gran número de proteínas con grupos sulfhidrilo críticos para su actividad enzimática y su función estructural (4). El Hg^{2+} es capaz de alterar la permeabilidad de las membranas celulares. Se ha postulado que los cambios en la permeabilidad de membranas expuestas a HgCl_2 pueden deberse a la

modificación de los grupos tioles de estas proteínas o a la peroxidación lipídica y la consiguiente activación de las fosfolipasas (5).

Entre las proteínas de membrana que regulan la permeabilidad iónica ocupa un papel destacado la ATPasa Na^+/K^+ , sobre la que el HgCl_2 es capaz de ejercer una inhibición reversible dosis-dependiente (6). Imesch y col. observaron que dicho efecto probablemente se producía impidiendo la interacción entre la subunidad α y la subunidad β de dicha ATPasa (7).

Los efectos tóxicos del mercurio se han atribuido en gran medida a la alteración que produce en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}). El Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular implicado en numerosas funciones biológicas. Cuando la homeostasis fisiológica del Ca^{2+} se altera, el incremento en la concentración del Ca^{2+} citosólico se convierte en deletéreo para las células como consecuencia de la activación mantenida de las fosfolipasas, proteinasas y endonucleasas, y de la alteración de otras funciones reguladas por este catión (8).

En el año 1981, Guktnecht demostró que a un pH fisiológico el catión Hg^{2+} forma especies neutras que le hacen altamente permeable a las membranas lipídicas (9). El Hg^{2+} , así como otros cationes, eran capaces de inducir la liberación del Ca^{2+} del retículo endoplásmico del músculo esquelético aislado (10) y de estimular la liberación de Ca^{2+} dependiente de ATP de membranas de plaquetas humanas (11). Smith y col. observaron que el Hg^{2+} al atravesar la membrana plasmática inducía un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracitoplásmico en las células tubulares epiteliales de conejo (12) y en los linfocitos esplénicos (13), fenómeno debido a la redistribución intracelular de este catión. Además, se sabe que el Hg^{2+} compite por los sitios de unión del Ca^{2+} , como la calmodulina (14) y ciertos receptores de membrana (12).

Otro de los principales efectos del mercurio descritos es la capacidad para generar radicales libres de oxígeno (15). La elevada afinidad de este metal para unirse a tioles intracelulares (especialmente al glutatión) produce, o bien predispone, a la aparición de estrés oxidativo por la disminución o depleción de tioles intracelulares y de otras moléculas antioxidantes (16, 17). Existen controversias acerca de si el mercurio produce *per se* el daño oxidativo o si, únicamente, hace más sensible a la célula epitelial renal a agentes que producen

dicho daño. Algunas consecuencias de la inducción del estrés oxidativo son la peroxidación lipídica, alteraciones en función mitocondrial (18), oxidación de las porfirinas y consiguiente alteración en el metabolismo hemo (19) e inducción de la expresión de proteínas de estrés en riñón e hígado (20, 21).

Es importante tener en cuenta que todos los efectos inductores del Hg^{2+} suceden a dosis subtóxicas o moderadamente tóxicas ya que a dosis mayores se producen daños celulares graves y se inhiben los procesos biosintéticos.

Diversos estudios en humanos y en distintos modelos animales de exposición a mercurio han coincidido en que el sitio más vulnerable a los efectos tóxicos del mercurio es la *pars recta* del túbulo proximal (22). Con dosis bajas de $HgCl_2$ (1-5 mg/Kg) se pueden observar ya cambios degenerativos microscópicos muy tempranos a las 6 u 8h tras la exposición. Algunos de los rasgos más destacables son la pérdida de microvellosidades, el aumento del retículo endoplásmico, el desprendimiento de ribosomas, la formación de vesículas, el aumento del volumen mitocondrial y la disyunción celular (22, 23).

2. AUTOINMUNIDAD INDUCIDA POR MERCURIO

Además del efecto tóxico directo sobre el riñón, el mercurio en su forma inorgánica ($HgCl_2$), al igual que ocurre con determinados fármacos, compuestos químicos, y con ciertos contaminantes ambientales, es capaz de inducir alteraciones en la regulación del sistema inmunológico en individuos susceptibles lo que puede llevar al desarrollo de enfermedades autoinmunes cuyo órgano diana, a menudo, es el riñón (24). El $HgCl_2$ ha sido estudiado ampliamente en roedores como componente "modelo" de alteración de la regulación inmunológica inducida por compuestos químicos. La administración repetida de dosis subtóxicas de $HgCl_2$ a ratas, ratones y conejos induce el desarrollo de respuestas autoinmunes que, en la mayoría de los casos, desencadenan una enfermedad (25).

Así, la exposición de las ratas Brown Norway (BN) a $HgCl_2$ induce un síndrome autoinmune parecido al lupus eritematoso sistémico (LES) en humanos, caracterizado por la activación policlonal de linfocitos B dependiente de linfocitos Th2 autorreactivos, una producción elevada de inmunoglobulinas (Igs) (IgG1 e IgE principalmente), infiltración leucocitaria en diversos órganos y desarrollo de glomerulonefritis y proteinuria (26, 27). En

1971, Bariety y col. describieron por primera vez la capacidad del HgCl_2 para inducir una glomerulonefritis por complejos inmunes en aproximadamente el 30% de ratas Wistar expuestas al metal (28). Seis años más tarde Sapin y col. repetirían el experimento, pero esta vez en ratas endogámicas de la cepa BN en las que observaron que el HgCl_2 inducía la producción de anticuerpos (Acs) dirigidos contra la membrana basal glomerular (MBG) en el 100% de las ratas tratadas. Este hecho sugería la existencia de un control genético en esta respuesta autoinmune (26) que poco después fue confirmado describiéndose por primera vez que la producción de Acs anti-MBG estaba determinada genéticamente por dos o tres genes, uno de los cuales se hallaba ligado al haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de rata H1^n (29).

Estudios posteriores demostraron que las ratas que presentaban el haplotipo RT-1^n (anteriormente denominado H1^n) eran susceptibles a la inducción de nefritis mediada por Acs anti-MBG, mientras que aquellas que presentaban el haplotipo RT-1^l eran resistentes y las que presentaban otros haplotipos ($\text{RT-1}^{\text{c,a,k,f,b}}$) mostraban una susceptibilidad intermedia (30). En ratones existen también determinados alelos de susceptibilidad a desarrollar Acs anti-fibrilarina en respuesta al HgCl_2 que mapean en la región H2A (31). Tanto en ratones como en ratas se observó que la susceptibilidad genética a la inducción de autoinmunidad por HgCl_2 está ligada a loci del MHC y a otros loci ajenos al MHC (29, 31).

La respuesta autoinmune a la administración repetida de HgCl_2 no afecta al riñón únicamente, aunque sea éste el principal órgano dañado. El síndrome autoinmune provoca también la aparición de una vasculitis necrotizante que afecta sobre todo al intestino grueso (32, 33) e induce la aparición de una poliartropatía inflamatoria (34).

2.1. NEFRITIS AUTOINMUNE INDUCIDA POR MERCURIO EN LA RATA BROWN NORWAY (BN)

El rasgo fundamental en la autoinmunidad inducida por HgCl_2 , en cualquiera de los distintos modelos animales susceptibles, es la activación policlonal de células B dependiente de células T. En la rata BN esta activación policlonal produce, entre otras patologías, el desarrollo de una nefritis mediada por Acs-anti MBG (26, 29, 35). La descripción de Sapin y col. del HgCl_2 como agente causal de una enfermedad inmunológica permitió investigar determinados mecanismos que subyacían en las enfermedades inmunológicas renales desconocidos hasta entonces.

Inicialmente, la mayoría de los estudios realizados sobre este modelo experimental de nefritis fueron dirigidos al análisis de la producción de Acs. Tras los estudios de Sapin y col. en los que se describía por primera vez la cinética de fijación de Acs anti-MBG a la pared glomerular inducidos por HgCl₂ en la rata BN (26), Hinglais y col. prosiguieron analizando la cinética de producción de dichos Acs. Los Acs anti-MBG empezaban a detectarse en la circulación entre los días 7-8 tras la primera inyección de HgCl₂, y alcanzaban valores máximos los días 13-15, tras los cuales disminuían hasta recuperar los niveles basales entre los días 20-30. El patrón de depósito glomerular comenzaba siendo lineal para convertirse en granular a partir de la 4^a o 5^a semana (36).

Pronto se descubrió que el HgCl₂ no sólo inducía la síntesis de Acs anti-MBG en las ratas BN, aunque fueran éstos los más importantes desde el punto de vista patogénico, sino que era capaz de inducir la producción de Acs que reaccionaban tanto con antígenos (Ags) propios como con Ags extraños. Hasta la fecha se han descrito múltiples Acs que incluyen: Acs anti-ADN_{hs} (37), anti-mieloperoxidasa (implicados en la aparición de vasculitis) (32), anti-fosfolípidos (38), anti-colágeno, anti-tiroglobulina (39), anti-trinitrofenol y anti-hematíes de carnero (37). En el modelo homólogo en ratones H-2^s, los Acs hallados de mayor importancia fisiopatológica son los anti-nucleolares, cuya diana principal es la fibrilarina (o proteína U3 RNP) cuya estructura es modificada por la acción directa del mercurio (40).

En la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ en la rata BN coincidiendo con los depósitos glomerulares de Acs se observaban, además, monocitos que invadían el ovillo glomerular (36), así como un infiltrado de monocitos y de células T que ocupaba, generalmente, los espacios perivasculares del intersticio renal (27). El origen de este infiltrado inflamatorio aun no está claro y existen discrepancias en su implicación en la patología renal que desarrollan estos animales.

La especificidad polirreactiva y específica de los Acs hallados, el aumento en la producción de IgE (41) y la implicación de células inmunológicas en el desarrollo de esta nefritis sugerían que la posible causa del desarrollo de la enfermedad podría ser una activación policlonal de células B inducida por el HgCl₂. Partiendo de esta hipótesis se realizaron estudios comparativos entre la cepa Lewis (LEW) resistente a la inducción de la

enfermedad y la cepa sensible BN. Mediante estos experimentos se descartó la activación policlonal B como la responsable directa de la enfermedad autoinmune, ya que en la cepa LEW se producía dicha activación y sin embargo los animales no mostraban patología alguna (37).

Sin embargo, varios estudios comenzaron a subrayar el destacado papel que ejercían las células T en la inducción y desarrollo de este modelo experimental. Uno de los primeros experimentos que puso de manifiesto la implicación de los linfocitos T fue el realizado por Sapin y col. En él se describía como ratas de la cepa Lewis (LEW) se volvían sensibles a la inducción de la enfermedad de forma similar a las ratas BN si una vez irradiadas recibían células T inmunocompetentes de los híbridos F1 LEWxBN (35). Experimentos adicionales realizados por Hirsch y col. corroboraron la necesidad de las células T para que se produjese la activación policlonal B (37). A su vez se demostró que las células T expuestas a HgCl₂, tanto *in vitro* como *in vivo*, eran capaces de inducir la proliferación de células T singénicas en presencia de células Ia⁺ (MHC de clase II) normales, siendo las células T de fenotipo W3/25⁺ (CD4) aisladas mucho más eficientes que la fracción completa de células T (42).

Teniendo en cuenta todo lo anterior se concluyó que para que se produjera la inducción de la enfermedad era necesaria una interacción T- T dependiente de MHC de clase II y, que el HgCl₂ inducía células T autorreactivas de tipo T cooperadoras (Th), implicadas en el desarrollo de esta enfermedad autoinmune (42).

Como consecuencia de la administración de HgCl₂ las poblaciones linfocitarias de las ratas BN sufrían modificaciones en su composición, que fueron descritas por primera vez por Bowman y col. Analizando dichas variaciones observaron que inicialmente se producía una disminución en las células T en sangre periférica debido, en especial de la población Th. Este hecho ocurría de manera simultánea al aumento de la población de células B como consecuencia de la activación policlonal (43). Posteriormente, el estudio de las poblaciones leucocitarias y la expresión de antígenos del MHC en órganos linfoides y no linfoides reveló un incremento de las células CD4 esplénicas seguido de una proliferación transitoria de linfocitos T CD4 y CD8, así como de linfocitos B, en órganos linfoides periféricos. La disminución de las células Th periféricas se atribuyó a la infiltración masiva que se producía en el riñón donde al menos el 70% de las células infiltrantes eran de

fenotipo CD4⁺. Además, en el riñón estaba aumentada la expresión de moléculas del MHC (27).

Un aumento en la expresión de antígenos del MHC en células no linfoides permite a éstas actuar como presentadoras de antígeno a las células T (44). Las células T autorreactivas reconocerían de esta manera el antígeno en el contexto del MHC y atacarían a las células que estuviesen efectuando dicha presentación. Anteriormente ya se había descrito cómo poblaciones T autorreactivas dirigidas contra antígenos de MHC de clase II podían inducir activación policlonal tanto *in vivo* (45) como *in vitro* (46) por lo que no se podía descartar la posibilidad de que los propios antígenos MHC fueran diana para los linfocitos T autorreactivos inducidos por el HgCl₂.

Teniendo en cuenta los hechos anteriores Aten y col. propusieron que el aumento en la expresión de antígenos MHC podría tener un papel secundario en la patogénesis de este síndrome. La mayoría de las células infiltrantes a día 13 revelaron ser monocitos y linfocitos activados que expresaban MHC de clase II, y parecía que esta positividad era adquirida al llegar a los tejidos diana que infiltraban, ya que en órganos linfoides periféricos no presentaban clase II en su membrana (27).

Finalmente, en 1988, Pelletier demostraría que la transferencia de células Th era capaz de reproducir la enfermedad en animales receptores, demostrando así que las células autorreactivas eran las responsables del desarrollo de esta enfermedad autoinmune (42).

2.2. DESARROLLO DE LA NEFRITIS EXPERIMENTAL

La nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ en la rata BN se desarrolla en dos fases:

1. **Fase de inducción** (desde el inicio de la inducción hasta los días 13-15): en ella se produce la proliferación de los clones autorreactivos de células Th anti-clase II y la expansión policlonal de células B dependiente de las células Th2 autorreactivas (42, 47). Cursa con hipergammaglobulinemia sérica con elevados niveles de IgE y producción de Acs anti-MBG y anti-ADN_{hs} entre otros ya citados. El depósito de los Acs anti-MBG en los glomérulos induce lesiones renales, que son máximas a día 13, y que afectan a la barrera de filtración glomerular (*figura 1*) con la consiguiente aparición de proteinuria de

para regular el tipo de respuesta inmune que se organiza y, en consecuencia, para el desarrollo de manifestaciones inmunopatológicas como la autoinmunidad (50, 51).

Actualmente, la respuesta inmunológica se clasifica respuesta de tipo 1 (o Th1) y respuesta de tipo 2 (o Th2). Esta subdivisión se realizó acorde con el patrón de citoquinas que producían las células Th, siendo la población Th1 la productora principalmente de IL-2, IFN- γ (implicada en las denominadas respuestas celulares), mientras que la población Th2 secreta principalmente IL-4 e IL-5 entre otras citoquinas (implicada en las denominadas respuestas humorales) (51, 52).

2.3.1. Regulación en la producción de citoquinas: inducción de IL-4 y deficiencias en la síntesis de IFN- γ

INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE IL-4

Goldman y col. describieron cómo el HgCl₂ producía un aumento en la expresión génica de la IL-4 en ratones (30). En las ratas BN se observó el mismo efecto: el HgCl₂ inducía la regulación a la alta de la expresión de la IL-4 de forma selectiva en bazo e intestino. Los niveles de expresión alcanzaban cotas máximas entre los días 4 y 10 de la enfermedad, previamente a la producción de Acs. Este hecho estaba indicando que el aumento de expresión de IL-4 era un suceso temprano en el desarrollo de la respuesta autoinmune. La regulación de la expresión de IL-4 en bazo podría estar promoviendo entonces la activación preferencial de la subpoblación de células Th2 en la rata BN (53). Casi al mismo tiempo Prigent y col. describieron como el HgCl₂ era capaz de inducir *in vitro* la expresión y síntesis de la IL-4 en células esplénicas y células T purificadas de BN, pero no en células de la cepa resistente LEW. La inducción directa ejercida por el HgCl₂ no descartaba la posibilidad de que además existiesen otras interacciones celulares que amplificasen los niveles de producción de IL-4 (54).

El posible mecanismo efector a través del cual el mercurio ejercía esta regulación fue descrito por Badou y col., los cuales demostraron que el HgCl₂ era capaz de activar directamente a una proteína quinasa C (PKC) dependiente de flujo de Ca²⁺ a través de canales de tipo L. Esta activación era la responsable del disparo en la expresión de la IL-4, por lo que el HgCl₂ actuaba directamente a nivel transcripcional (55).

Además, recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo/balance redox tiene un papel muy importante en la regulación de la expresión de IL-4. Estudios en mastocitos han evidenciado que el mercurio, mediante el aumento en la producción de radicales libres de oxígeno, genera un estrés oxidativo que sensibiliza a los mastocitos a la degranulación por un aumento en la actividad del promotor de IL-4, hecho importante para la vasculitis observada en este modelo (56). Este efecto es mimetizado por el H₂O₂ y disminuye de manera significativa con la adición de antioxidantes (57).

De todo lo anteriormente expuesto se puede inferir que el mercurio, bien por efecto directo a nivel transcripcional y/o bien por la generación de estrés oxidativo, induce un aumento en la expresión y síntesis de IL-4, lo que favorecería la polarización hacia una respuesta inmune Th2 en la autoinmunidad inducida por mercurio en la rata BN.

DEFICIENCIA EN LA SÍNTESIS DE IFN- γ

De manera simultánea a la inducción de la expresión de IL-4, el HgCl₂ induce un aumento en la expresión génica de IFN- γ en el bazo y en los ganglios linfáticos tanto en ratas sensibles BN como en ratas resistentes LEW. No obstante, el aumento en la expresión génica del IFN- γ en las ratas BN no está acompañado de un incremento en la síntesis de esta proteína (54).

En las ratas LEW se halló además el mercurio producía un aumento en la frecuencia de células T CD8 productoras de IFN- γ en el bazo. Este hecho, junto con la ausencia de efectos sobre la expresión de IL-4, podría explicar la estimulación de la respuesta Th1 (supuestamente inmunosupresora) que se produce en estos animales y que posiblemente les protege de la inducción de autoinmunidad (58).

La importancia del IFN- γ se puso de nuevo de manifiesto al analizar las causas que permitían que las ratas BN viejas (18-24 meses) fuesen resistentes a la inducción de la nefritis mediada por HgCl₂. Estas ratas mostraron un aumento en la subpoblación celular T CD4/CD45RB(RC), es decir que, las ratas con la edad adquirían un perfil más Th1 en contraste con las ratas jóvenes, las cuales mostraban un perfil preferentemente de tipo Th2. Los esplenocitos de las ratas viejas producían tres veces más IFN- γ que los procedentes de ratas jóvenes (10-14 semanas). Cuando las ratas viejas eran tratadas con Acs neutralizantes para esta citoquina previamente a la exposición al HgCl₂ se facilitaba la

inducción de la nefritis, hallándose entonces un aumento en la concentración sérica de IgE e IgG1, así como en los niveles de proteinuria (59).

Por otro lado, la administración de dosis bajas de HgCl_2 inducía una resistencia en las ratas BN a desarrollar la respuesta autoinmune al ser inyectadas de nuevo con dosis normales de HgCl_2 . La resistencia parecía estar mediada por una regulación a la alta de la expresión de $\text{IFN-}\gamma$ mientras que los niveles de IL-4 permanecían constantes. No obstante, no se observaban cambios ni en la IL-8 ni en la IL-12, pero sí que se producía un aumento de la subunidad $\beta 2$ del receptor de esta última, en la IL-10 y en el $\text{TGF-}\beta$ (60). Gillespie y col. han estudiado recientemente el papel de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ del receptor de IL-12 en la polarización de las respuestas Th1/Th2 en la rata y han encontrado diferencias en la regulación de la expresión entre ratas BN y LEW (61). Ambas cepas expresan las dos subunidades en el bazo, pero tras el tratamiento con HgCl_2 han observado, al igual que Szeto y col. (60), un drástico descenso en la subunidad $\beta 2$ en ratas BN. La reducción de la disponibilidad de subunidades $\beta 2$ del receptor de IL-12 estaría contribuyendo al viraje de la respuesta a Th2 en esta cepa de ratas

EFFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA REGULACIÓN DEL $\text{IFN-}\gamma$

Van der Meide y col. atribuyeron un papel relevante al óxido nítrico (NO), inhibidor de la síntesis de $\text{IFN-}\gamma$, en las diferencias halladas en la producción de $\text{IFN-}\gamma$ entre las ratas BN y LEW expuestas a HgCl_2 (62). En sus estudios observaron que el HgCl_2 producía un marcado aumento en la producción de NO en esplenocitos de ratas BN *ex vivo* y una supresión en la producción de $\text{IFN-}\gamma$ por parte de las células T. Mientras que los eritrocitos procedentes de ratas LEW eran capaces de secuestrar el NO inducido por el HgCl_2 , sorprendentemente, los eritrocitos esplénicos de las ratas BN no eran capaces de hacer frente al aumento en la producción de NO y, en consecuencia, se suprimía la síntesis de $\text{IFN-}\gamma$ (incluso con una expresión génica notablemente aumentada) y el incremento de la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo (62). Esta incapacidad de las ratas BN para inactivar el NO podría explicar la deficiente respuesta de $\text{IFN-}\gamma$ que se observa en esta cepa.

En cuanto al posible efecto directo del HgCl_2 , se pudo observar que parte del metal drenaba al bazo y allí era captado por los macrófagos disminuyendo en ellos de forma

drástica el umbral de estimulación para la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno (62). Además, como ya se comentó, el HgCl_2 es capaz de oxidar las porfirinas interfiriendo de esta manera en el metabolismo de los grupos hemo (19). Por ello, no se puede descartar que los cationes de Hg^{2+} puedan estar alterando la capacidad de los eritrocitos para “secuestrar” NO que en el caso de las ratas BN tendría mayor importancia, al sintetizar de forma natural mayor cantidad de NO que otras cepas .

2.3.2. Alteraciones en las poblaciones linfocitarias T

Las ratas BN y LEW se encuentran en extremos opuestos en cuanto a la polarización de la respuesta inmunológica, así como en su susceptibilidad a la inducción de enfermedades experimentales autoinmunes (63). Las ratas LEW son muy susceptibles a desarrollar enfermedades autoinmunes mediadas por una respuesta Th1, mientras que las ratas BN son resistentes (64, 65). Por el contrario, las ratas BN pero no las LEW, presentan susceptibilidad a la inducción de enfermedades autoinmunes de tipo Th2, como la mediada por HgCl_2 (54, 66). Esta susceptibilidad diferencial puede deberse a los desequilibrios que muestran ambas cepas en el cociente Th1/Th2 como se describirá a continuación.

DIFERENCIAS EN EL ÍNDICE $\text{CD45RC}^{\text{high}}/\text{CD45RC}^{\text{low}}$

Mathieson y col. analizaron el papel de las subpoblaciones celulares de células $\text{CD4/OX22}^{\text{high}}$ y $\text{CD4/OX22}^{\text{low}}$, es decir células que presentaban una alta o baja intensidad para el marcador OX22 respectivamente (67). El marcador OX22 reconoce una isoforma de alto peso molecular del marcador panleucocitario CD45RC. Se ha comprobado que la división que presentan las células CD4+ en cuanto a la intensidad de expresión de dicho marcador en la rata se corresponde con las subpoblaciones halladas también en humanos y ratones Th1 ($\text{CD4}/\text{CD45RC}^{\text{high}}$) y Th2 ($\text{CD4}/\text{CD45RC}^{\text{low}}$) (68, 69). Mathieson y col. postularon un papel regulador para la población $\text{CD4}/\text{CD45RC}^{\text{high}}$ o Th1 en la autoinmunidad inducida por HgCl_2 al hallar que la depleción de estas células usando el Ac OX22 producía una respuesta autoinmune mucho más severa que en ratas que mantenían esta población celular. La transferencia de células T vírgenes a los animales tratados con Acs OX22 tenía efectos protectores frente a la inducción, excepto cuando se eliminaban previamente las células $\text{CD45RC}^{\text{high}}$ (67).

Por otro lado, se demostró cómo con células Th1 anti-MHC de clase II propio se podía evitar la inducción de la enfermedad en ratas BN (70). Adicionalmente, en modelos

animales supuestamente producidos por respuestas de tipo Th1 el HgCl₂ protegía frente a la inducción de la enfermedad, como sucede en la uveorretinitis autoinmune (63) y en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)(70), protección probablemente mediada por la estimulación de la respuesta Th2. El modelo de HgCl₂ pasó a ser entonces un paradigma de enfermedad autoinmune mediada por una respuesta Th2. Hasta entonces, a las células Th1 eran a las que se les atribuía la inducción de fenómenos de autoinmunidad, siendo las Th2, a menudo, las reguladoras o supresoras de dichos fenómenos.

La mayoría de los experimentos que abordaban la cuestión de la regulación de la respuesta autoinmune parecían estar indicando que uno de los factores principales, no sólo para la supresión de la respuesta sino para la propia inducción de ésta, era la alteración en el balance entre mecanismos efectores de la respuesta inmunológica y mecanismos reguladores o supresores de dicha respuesta.

Pero a pesar de los numerosos estudios que apoyaron esta idea, otras investigaciones en ratones afirmaron que la causa de la susceptibilidad al HgCl₂ no depende del desequilibrio Th1/Th2. Kono y col. observaron, en contra de lo esperado, que ratones deficientes en IL-4 no mostraban resistencia al HgCl₂ mientras que los ratones B10.S deficientes en IFN- γ no presentaban lesiones histológicas y producían menor cantidad de Acs (71). Por otro lado, ratones silvestres y deficientes para la IL-4 de la cepa C57BL/6 supuestamente resistentes al HgCl₂, mostraron una alta susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad en respuesta a este metal (72). Aunque la dicotomía Th1/Th2 es un modelo útil y sencillo para definir la regulación de las células T, la causa del desarrollo de autoinmunidad debe de implicar más factores que una predisposición genética a desarrollar una respuesta de tipo Th1 o Th2.

Finalmente, las últimas investigaciones acerca del por qué la población basal de células T en ratas BN presenta un perfil tipo 2 (CD45RC^{low}), que parece ser en última instancia lo que favorece la sensibilidad a la inducción de autoinmunidad con HgCl₂ al menos en estos animales, han demostrado que es una característica intrínseca de las células hematopoyéticas de estas ratas y que factores no hematopoyéticos periféricos no contribuyen al balance en condiciones basales y homeostáticas. Además, las diferencias en el índice CD45RC^{high}/CD45RC^{low} que presentan las cepas LEW y BN están determinadas genéticamente por distintos loci presentes en los cromosomas 9, 10 y 20. Estas regiones

coinciden con las asociadas a la susceptibilidad a la inducción de autoinmunidad por sales de oro, que es similar a la inducida por HgCl₂, descritas con anterioridad (73).

CÉLULAS T CD8

Inicialmente a la población de células T CD8 se le atribuyeron propiedades inmunomoduladoras en esta enfermedad. Entre los múltiples estudios que se realizaron en torno al posible papel regulador de esta población celular se hallaron hechos tales como: que en la fase de autorregulación de la enfermedad aparecía un aumento de células T CD8 que además protegía de la inducción de la enfermedad (49); que la transferencia de células T CD4 autorreactivas a ratas BN sanas provocaba la proliferación de las células T CD8, mientras que en las ratas que recibían el HgCl₂ la proliferación éstas se inhibía; además, la depleción de la población T CD8 exacerbaba la enfermedad en las ratas previamente transfectadas con células CD4 autorreactivas (42). Sin embargo, la existencia de otros estudios posteriores en los que el tratamiento con Acs anti-CD8 no impedía la inducción de la enfermedad ni afectaba a la fase reguladora (74), pusieron en entredicho el papel supresor conferido inicialmente a estas células.

Un estudio reciente, sin embargo, ha vuelto a poner de manifiesto la implicación de la población T CD8 que ya se había perfilado hacía años. Los linfocitos T CD8 vírgenes pueden diferenciarse en al menos dos poblaciones con distinta función y distinto patrón de secreción de citoquinas en virtud, al igual que los CD4, de los niveles de expresión del marcador CD45RC: tipo I o CD8/CD45RC^{high}, con un patrón de citoquinas similar al producido por la población Th1, y tipo 2 o CD8/CD45RC^{low}, que producen citoquinas de tipo Th2 (75).

Estudiando la posible contribución de las células presentadoras de antígeno (APC), las células T CD4 y CD8, y el MHC en las ratas BN y LEW, en la polarización de la respuesta inmunológica tipo 2 y tipo 1 respectivamente, se ha hallado que la incapacidad en las ratas BN para producir una respuesta Th1 adecuada es consecuencia de defectos existentes en el compartimento de las células T. Ambas poblaciones linfocitarias, T CD4 y T CD8, están implicadas, pero la población T CD8 contribuye en mayor medida a este defecto. Este defecto parece ser independiente del MHC, y además, los productos derivados de las APC, como el NO, al contrario de lo que se pensó, no parecen estar directamente implicados en la polarización de la respuesta inmunológica. La expresión elevada de IL-4 comentada

anteriormente, además de no ser responsable directa de este defecto, ha mostrado ser necesaria para la producción de IFN- γ en células T de ratas LEW y BN (76).

En resumen, los estudios realizados sobre las diferencias entre ratas BN y LEW para organizar de forma preferente respuestas de tipo 2 o de tipo 1 respectivamente, indican que:

- i) las células T de las ratas BN producen altas cantidades de IL-4 y presentan una deficiente producción de IFN- γ , al revés de lo que sucede en las ratas LEW (53, 54);
- ii) la diferencia en el índice de células T CD45RC^{high}/CD45RC^{low} entre ratas BN y LEW es intrínseca a las células hematopoyéticas y está genéticamente controlada (cromosomas 9, 10 y 20) coincidiendo estas regiones con las descritas para la susceptibilidad a la inducción de nefritis autoinmune por sales de oro (66, 73);
- iii) la alta frecuencia en condiciones basales de células CD45RC^{low}, tanto de linfocitos T CD4 como de T CD8, hace que las ratas BN produzcan mayor cantidad de IL-4, IL-13 e IL-10 que las ratas LEW, lo que favorece el desarrollo de una respuesta inmunológica de tipo 2 e impide el correcto desarrollo de una respuesta de tipo 1. Por otro lado las ratas LEW, al tener tres veces más células T CD8, son capaces de producir 20 veces más IFN- γ que las BN, lo que promueve en esta cepa la respuesta inmunológica de tipo 1 y dificulta la de tipo 2 (73, 76, 77).

PRESENCIA DE CÉLULAS SUPRESORAS PRODUCTORAS DE FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF- β)

El TGF- β tiene un papel esencial en la regulación de la homeostasis de las células T permitiendo una respuesta inmune normal y evitando el desarrollo de respuestas autorreactivas (78).

Ya en 1992, se observó que los ratones deficientes en TGF- β desarrollaban una enfermedad inflamatoria multifocal (79), producían Acs parecidos a los hallados en el SLE y sufrían una linfoproliferación similar a la que ocurre en el síndrome de Sjögren (80). Además, existen evidencias experimentales que demuestran la implicación de esta citoquina en la

regulación o control de diversas alteraciones inflamatorias tales como la EAE (76, 81), la inflamación aguda y crónica sinovial (82) y la colitis granulomatosa en ratones (83).

Las células T autorreactivas anti-clase II pueden aumentar o suprimir las respuestas inmunológicas que ocurren en situaciones normales (84). Células similares participarían así en el control periférico de células T autorreactivas patogénicas (70). El HgCl₂ ejerce una activación policlonal de células T en ratas BN y LEW lo que, probablemente, permite la proliferación de células T autorreactivas anti-MHC de clase II a partir de precursores presentes en animales normales (85). Cuando se estudiaron los clones anti-MHC de clase II de células T procedentes de ratas LEW que proliferaban en respuesta al HgCl₂ se observó que dichos clones eran capaces de inducir resistencia a la autoinmunidad mediada por HgCl₂, de manera opuesta a lo que sucedía con los clones T autorreactivos de las ratas BN que eran los responsables de la respuesta autoinmune. El análisis de cinco líneas T procedentes de distintas ratas LEW inyectadas con HgCl₂ capaces de conferir resistencia a híbridos F1 (LEWxBN), puso de manifiesto diferencias en el patrón de citoquinas que secretaban los clones autorreactivos, atribuyéndosele al TGF-β secretado por los clones de resistencia en ratas LEW el efecto protector observado. Únicamente cuando se neutralizaba esta citoquina se eliminaba el efecto regulador de estas células transferidas a ratas sensibles al HgCl₂. Sin embargo, la neutralización de otras citoquinas no producía cambios en la susceptibilidad al mercurio (70).

Por otro lado, en la resistencia que ofrece la rata BN a la inducción de la EAE (enfermedad mediada por una respuesta de tipo 1) se ha observado que también está implicada una población celular productora de TGF-β. La respuesta reguladora en este caso mostraba ser independiente de las células T CD8, hallándose implicadas en la producción del TGF-β las células T CD4 con fenotipo CD45RC^{low} (Th2) y las plaquetas (76).

En la autoinmunidad inducida por HgCl₂ las células T que aparecían durante la fase de autorregulación no encajaban en el fenotipo Th2 (propuesto en varios modelos como regulador) puesto que, además de TGF-β, no producían IL-4 sino IL-2 e IFN-γ. Por lo que, dependiendo de la cepa de ratas estudiada, estas células T protectoras podrían producir distintas citoquinas. Así, el HgCl₂ induce la proliferación de células T reactivas frente a clase II propio que en las ratas BN producen IL-4 e inducen desórdenes mediados por respuestas Th2. Sin embargo, las células que se expanden en las ratas LEW en

respuesta al metal producen preferentemente TGF- β y son responsables de la regulación a la baja de la autoinmunidad. Por lo tanto estas poblaciones celulares presentarían un potencial regulador muy fuerte en enfermedades autoinmunes mediadas tanto por respuestas Th1 como por respuestas Th2 (70).

3. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN: IMPLICACIÓN EN LA NEFRITIS AUTOINMUNE INDUCIDA POR MERCURIO

Para que las células respondan de forma adecuada a los estímulos del medio externo, así como a las señales internas, han de comunicarse con otras células y con el exterior. Para ello poseen múltiples proteínas de membrana entre las que se hayan los receptores y las moléculas de adhesión. Las moléculas de adhesión son, en su mayoría, glicoproteínas de membrana que permiten a la célula realizar procesos biológicos de gran importancia. Dentro del contexto de la inflamación tisular intervienen en la adhesión endotelial y posterior extravasación (diapédesis) a los lugares de inflamación. Además, median las uniones célula-célula relevantes para la activación y la comunicación celular, necesarias para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Las principales moléculas de adhesión se agrupan en tres grandes familias: selectinas, inmunoglobulinas e integrinas.

3.1. INTEGRINAS

Las integrinas conforman una de las familias de adhesión celular más importantes dentro de la cual están incluidos tanto receptores de matriz extracelular como receptores implicados en la adhesión célula-célula. Todas las integrinas son heterodímeros compuestos por una subunidad α y una subunidad β que se encuentran unidas de forma no covalente. (86). Las integrinas se clasifican en función de la cadena común β : los subgrupos de integrinas β 1 (VLAs), β 2 (Leu CAMs), β 3 (citoadhesinas) y β 7 (*homing* o de reclutamiento leucocitario) son los más habituales. Las integrinas tienen la capacidad de modular su función de manera rápida y reversible mediante cambios conformacionales que aumentan la afinidad a sus ligandos. De esta forma, la expresión selectiva de determinadas integrinas y su activación específica permite una migración direccional regulada, entre otras funciones.

El nombre que reciben estas moléculas es consecuencia de su capacidad de integrar medio externo y medio interno pudiendo transmitir información en las dos direcciones (87, 88).

La activación de las integrinas, por lo tanto, puede ser consecuencia de sucesos extracelulares o de señales intracelulares. Ciertos Acs que se unen a integrinas pueden estimular la unión a su ligando probablemente mediante la estabilización de la conformación activa del receptor. Además, la unión de cationes divalentes a los dominios extracelulares de estas moléculas de adhesión es necesaria para que las integrinas reconozcan a sus ligandos y se unan a ellos (86-88).

3.2. INTEGRINAS VLAs: VLA-4

Dentro de las integrinas, la subfamilia β -1 o VLA está implicada en la adhesión celular, la organización del citoesqueleto, la migración celular, el ensamblaje a la matriz extracelular y la transducción de señales. Por todo ello tienen un destacado papel en diversos procesos biológicos que incluyen el desarrollo embrionario, la organización tisular, la diferenciación, la extravasación leucocitaria y la selección tímica de linfocitos T, entre otros (87).

Las integrinas β 1 o VLAs son moléculas clave para la migración transendotelial de linfocitos T activados a los lugares de inflamación (89-91). La integrina VLA-4 (α 4 β 1) es capaz de mediar interacciones homotípicas entre células T y heterotípicas entre células T y B, endoteliales u otras células diana (92, 93). VLA-4 tiene como ligandos a la proteína de matriz extracelular fibronectina (94) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) (95). Además de con estos ligandos, la subunidad α 4 puede interactuar directamente con α 4 β 1 o α 4 β 7, lo que permitiría las interacciones homotípicas (96). Se expresa en células T, células B, células NK, timocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y monocitos (97-101), además de en líneas celulares no hematopoyéticas de melanoma, células neurales (93) y en rhabdomyosarcoma (102).

Es de destacar que el dominio citoplásmico de la VLA-4 es capaz de transducir señales a los leucocitos participando así en la proliferación y producción de citoquinas de las células T (inducida por antiCD-3 /TCR) (103), en la activación de la célula B inducida

por el BCR, en la interacción B-T CD40/CD40L (104) y regulando la expresión de mediadores inflamatorios de monocitos como el TNF- α y la IL-1 (105).

3.3. VÍA DE ADHESIÓN VLA-4/VCAM-1

La migración celular, como ya se ha comentado antes, es de gran relevancia para muchos procesos biológicos por lo que alteraciones en los niveles de expresión o activación de las integrinas que la median se han visto frecuentemente implicadas en múltiples patologías inmunológicas e inflamatorias. De un tiempo a esta parte ha sido habitual el desarrollo de terapias basadas en el bloqueo de moléculas de adhesión con el fin de evitar la migración leucocitaria y determinados contactos celulares.

La ruta de adhesión VLA4/VCAM-1 se ha estudiado exhaustivamente y se ha descrito que es clave para procesos fisiológicos como la unión de células circulantes al endotelio (reforzando los contactos iniciales mediados las selectinas) (106), la unión de células precursoras hematopoyéticas al estroma de la médula ósea (107, 108), la unión de linfocitos B a células dendríticas en centros germinales (109) y, al menos en parte, para la interacción de linfocitos T con células dendríticas circulantes (110).

En cuanto a procesos patológicos, la interacción VLA-4/VCAM-1 está implicada en múltiples enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide (111), la EAE (89), las reacciones alérgicas cutáneas (112), las lesiones pulmonares por depósitos de Igs (113), la nefritis nefrotóxica (114) y la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ (90, 91, 115), entre otras. El uso de distintos Acs dirigidos contra la cadena α -4, Acs anti- β 1 y/o Acs anti-VCAM-1 ha mostrado un efecto protector, en mayor o menor medida, en el desarrollo de dichas enfermedades experimentales y clínicas. Existen otras aproximaciones terapéuticas menos específicas que se basan en el uso de fármacos anti-inflamatorios (p.ej., corticoides), que reducen o anulan la expresión de estas moléculas de manera no específica.

En la mayoría de los casos aun no se sabe con certeza si los efectos ejercidos por la expresión de ambas moléculas de adhesión en estas patologías son factores etiológicos de la enfermedad o alteraciones secundarias ésta.

3.4. INTEGRINAS $\alpha 4$ Y $\beta 1$ Y AUTOINMUNIDAD INDUCIDA POR MERCURIO

Existen claras evidencias de que las interacciones mediadas por las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 1$ se requieren para el desarrollo de la autoinmunidad inducida por mercurio *in vivo* (90, 91, 115). Recientemente se ha descrito que el HgCl_2 es un potente activador de la adhesión de las células T mediada por integrinas, efecto producido, muy posiblemente, a través de señales intracelulares. Esta activación no es específica sino que implica a varias integrinas y ligandos y es independiente de la presentación antigénica. Mientras que el MnCl_2 aumenta la afinidad de las integrinas por sus ligandos, el HgCl_2 parece actuar mediante una modificación de la asociación de las integrinas con las proteínas citoplásmicas, lo que resultaría en una acción similar a la producida por la citocalasina B. La disrupción que produce la citocalasina B en el citoesqueleto puede aumentar la unión de ciertas integrinas a sus ligandos probablemente mediante la inducción del agrupamiento de las integrinas en la membrana (116).

El Hg^{2+} , debido a su afinidad por los grupos tiol, puede inducir el entrecruzamiento de residuos de cisteína de las proteínas. El entrecruzamiento de proteínas de membrana de la célula T parece ser la causa de la inducción de la fosforilación de tirosinas ejercida por el HgCl_2 (117). Además, el Hg^{2+} , a través de la alteración del balance redox intracelular hacia un estado pro-oxidativo, puede disparar señales intracelulares que induzcan la expresión de moléculas de adhesión (118).

Por otro lado, se ha observado que la administración de HgCl_2 induce *in vivo* la expresión del epítipo de activación de la integrina $\beta 1$ (reconocido por el Ac HUTS-21) que se correlaciona con su función de adhesividad, y puede ser inducido por varios estímulos *in vitro* como cationes Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y ésteres de forbol (91).

Los tratamientos con Acs dirigidos contra distintos epítipos de la cadena $\alpha 4$ o contra el epítipo de activación de la cadena $\beta 1$, han mostrado la importancia de esta integrina en la nefritis autoinmune inducida por mercurio, desvelando que $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) no sólo participa en la extravasación leucocitaria al intersticio renal, sino que podría estar mediando los contactos iniciales célula-célula. Dichos contactos permiten la coestimulación celular durante

la presentación antigénica, la activación policlonal y la producción de auto-Acs de la célula B, e incluso, la regulación de la respuesta autoinmune (90, 91, 115). Referente a este último hecho, se ha observado que el Ac dirigido contra el epítipo B1 de la cadena $\alpha 4$ es capaz de inducir *in vivo* una estimulación temprana de la población CD4/CD45RC^{high} (Th1) en ratas BN inyectadas con HgCl₂ que evita que los animales desarrollen la enfermedad. El mismo efecto en el balance poblacional se observa en ratas BN sanas: una administración repetida del Ac HP2/1 produce también el aumento de la población Th1 (comunicación personal de la Dra. Escudero). Estos resultados parecen indicar que la cadena $\alpha 4$ podría estar transmitiendo señales a través de la estimulación selectiva de su epítipo B1, que favorecerían el viraje de la población CD4 hacia Th1.

4. INFLAMACIÓN: MEDIADORES INFLAMATORIOS Y ENFERMEDAD RENAL

La inflamación es el proceso fisiológico mediante el cual los tejidos vascularizados responden al daño. Durante el proceso inflamatorio tanto los mediadores solubles como los celulares actúan juntos de una forma sistemática con el fin de contener y eliminar al agente inductor del daño (119).

Los mecanismos responsables de los procesos inflamatorios son iniciados, regulados y finalmente bloqueados por las acciones de numerosas moléculas denominadas de forma general "mediadores inflamatorios". Otras sustancias son sintetizadas y/o liberadas de distintas fuentes celulares en respuesta a la acción de estas moléculas. Es muy importante que la acción de los mediadores inflamatorios se realice de una forma coordinada y altamente regulada. Aunque la inflamación es crucial para mantener la salud y la integridad de los organismos cuando sufre alteraciones en su control puede llegar a producir una destrucción tisular masiva (120).

La inducción de daño en los tejidos inicia una serie de sucesos moleculares que generan la producción de mediadores inflamatorios solubles los cuales van a promover los fenómenos característicos de la inflamación como son: el aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad vascular, la migración de leucocitos desde sangre periférica a los tejidos, la acumulación de estos leucocitos en los focos de inflamación y la activación de los leucocitos para destruir y, si es posible, eliminar la sustancia extraña. Estos mediadores

solubles incluyen sistemas de proteasas del plasma, mediadores lipídicos, péptidos proinflamatorios y citoquinas. Además, otros mediadores adicionales secretados por los leucocitos activados por las sustancias inflamatorias iniciales pueden prolongar la respuesta inflamatoria de forma directa e indirecta (atrayendo más células al lugar del daño). Si el agente responsable de la inflamación se elimina, los mediadores anti-inflamatorios frenan el proceso evitando de este modo que se produzca un daño innecesario y excesivo en los tejidos que rodean al foco inflamatorio. Si por el contrario, este proceso agudo no consigue eliminar el origen del daño tisular o lo hace de manera incompleta, el proceso inflamatorio persiste y expande su repertorio de mediadores solubles y componentes celulares en un proceso denominado inflamación crónica (119).

El estudio de los mediadores inflamatorios en modelos animales de enfermedades renales ha sido de gran utilidad para la comprensión de determinados procesos que regulan la inflamación así como para el diseño de nuevas terapias. Entre ellos, juegan un papel importante la citoquina proinflamatoria TNF- α (factor de necrosis tumoral α), la quimioquina MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) y el óxido nítrico (NO).

4.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α : TNF- α

Los macrófagos son la fuente principal de la citoquina proinflamatoria TNF- α , pero existen muchas otras células nucleadas capaces de producirlo en respuesta a determinados estímulos, entre las que se encuentran las células T, las células B, las células NK, las endoteliales vasculares, los queratinocitos, las células de músculo liso, los mastocitos, los neutrófilos, los astrocitos y las células de glía. Algunos de los agentes más estudiados que estimulan la producción de esta citoquina son diversos productos bacterianos (como el LPS), ésteres de forbol, luz ultravioleta, microorganismos (protozoos, bacterias y virus) y células B alogénicas (en células T), entre otros (121).

La producción de TNF- α puede ser además incrementada por la acción de diversas citoquinas y mediadores endógenos que incluyen al propio TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α , GM-CSF, IL-2, sustancia P y factor activador de plaquetas (PAF). Mientras que otras sustancias endógenas como las prostaglandinas, corticosteroides, IL-4, IL-6 y TGF- β , actúan inhibiendo su síntesis a nivel transcripcional o de transporte. El hecho de que existan múltiples agentes exógenos y endógenos que puedan afectar a la producción de

TNF- α refleja su intrincada y compleja regulación *in vivo*. Aunque la generación de TNF- α sea disparada inicialmente por un agente exógeno, p.ej., una infección, el proceso es controlado posteriormente por citoquinas (121, 122)

El TNF- α induce la expresión y el aumento de moléculas de adhesión en células endoteliales y, de manera inversa, la unión de las moléculas de adhesión a sus ligandos induce a su vez la expresión de esta citoquina (123, 124). Este hecho es fundamental en los procesos inflamatorios debido a que, como se expuso anteriormente, la expresión de moléculas de adhesión es un proceso clave en la inflamación puesto que estas moléculas son necesarias para la fijación al endotelio y posterior extravasación de los leucocitos a los tejidos dañados.

El importante papel del TNF- α en enfermedades autoinmunes inflamatorias como la enfermedad de Crohn, el LES, la esclerosis múltiple y varias glomerulonefritis, hacen de esta molécula una potencial diana terapéutica. De hecho, el tratamiento con anti-TNF- α ha es muy eficaz en la artritis reumatoide tal y como muestran los estudios clínicos realizados hasta el momento (125).

Además, se ha demostrado que la presencia del TNF- α es necesaria para el desarrollo de modelos experimentales tales como la nefritis nefrotóxica (114), las glomerulonefritis mediadas por Acs en ratas y conejos (126, 127), el lupus murino (128) o la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ (129).

4.2. PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA DE MONOCITOS 1: MCP-1

Las quimioquinas pertenecen a una familia de citoquinas quimiotácticas que fueron inicialmente identificadas en función de su capacidad para inducir la migración de distintos tipos celulares, sobre todo de células linfoides (130, 131). Las quimioquinas son capaces de activar a los leucocitos, modular la angiogénesis, participar en la hematopoyesis y, sobre todo, dirigir inicialmente la migración leucocitaria. Estas citoquinas actúan de forma coordinada con las selectinas y las integrinas en los focos de inflamación, permitiendo la extravasación de células linfoides a los lugares donde son requeridas (131, 132, 133, 134).

La expresión selectiva de patrones específicos de receptores de quimioquinas, dependiendo del tipo de célula y de las señales del medio extracelular, permite que un grupo de células linfoides determinado alcance, únicamente, determinados tejidos, confiriendo una gran especificidad al proceso de migración (135, 136).

Tipo celular	Inductores de MCP-1
Fibroblastos	PDGF/IL-1/TNF- α /virus/LPS/toxina del cólera
Células endoteliales	IL-1/TNF- α /IFN- γ /IL-4/PMA/extensión
Células de músculo liso	PDGF/extensión
Monocitos/macrófagos	LPS/IFN- γ /PMA
Neutrófilos	TNF- α
Células Mesangiales	TNF- α / IL-1/IFN- γ /FGF básico/LIF/IL-6/LPS

PDGF: factor de crecimiento plaquetario, LPS: lipopolisacárido bacteriano, PMA: ester de forbol acetato miristato; LIF: factor inhibidor de leucemia, FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

Tabla 1. Expresión de MCP-1: expresión de la quimioquina MCP-1 en distintos tipos celulares y principales inductores de la expresión.

Durante los procesos inflamatorios el endotelio aumenta la expresión de las estructuras dónde se unen las quimioquinas (como glucosaminglicanos) así como la expresión de ligandos de selectinas e integrinas expresadas en los leucocitos. De esta manera, el endotelio inflamado aumenta su capacidad para unir quimioquinas y facilita el proceso de rodamiento (*rolling*) y adhesión leucocitaria. Además, mediante la activación de las integrinas, las quimioquinas reafirman la adhesión de los leucocitos al endotelio (133, 137).

Las síntesis de quimioquinas se halla altamente regulada a distintos niveles celulares (138). La expresión de la mayoría de las quimioquinas proinflamatorias tales como MCP-1 y RANTES, son inducidas por las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ (139, 140).

Diversas quimioquinas pueden contribuir al daño inflamatorio tal y como se ha observado en diferentes enfermedades o modelos experimentales. La proteína

quimiotáctica de monocitos MCP-1 pertenece a la familia de las CC quimioquinas y actúa de forma primaria sobre monocitos, atrayéndolos a los focos inflamatorios. Además, es capaz de activar linfocitos, basófilos y eosinófilos (141). Su expresión puede ser inducida en diversos tipos celulares por su exposición a distintas citoquinas o moléculas nocivas resumidas en la *tabla 1*. Además, se ha observado que la proteinuria induce un aumento significativo en la expresión del mediador proinflamatorio MCP-1 en células tubulares renales (142).

AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE MCP-1
EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD RENAL

GN nefrotóxica en ratas
GN nefrotóxica en ratones
Isquemia renal en ratas
Nefritis anti-Thy-1
Nefritis lúpica en ratones MRL/lpr
Nefritis lúpica en ratones NZB/W
Nefritis tubulointerstitial en ratas
GN por complejos inmunes en ratas
Inyección de BSA en ratas
Nefritis tubulointerstitial en ratas
Nefrectomía renal de 5/6 en ratas
Nefrosis por PAN

Tabla 2. Implicación de MCP-1 en enfermedades experimentales: Aumento de la expresión de MCP-1 en modelos animales de enfermedad. Revisado en (134).

El riñón expresa de forma constitutiva cantidades muy pequeñas de MCP-1, pero la expresión renal de esta quimioquina está aumentada en múltiples modelos experimentales de enfermedad renal (ver *tabla 1*). La neutralización de esta quimioquina (143-145) o su eliminación (ratones deficientes en MCP-1) (146) tiene efectos protectores sobre varios modelos inducidos de inflamación.

A menudo se ha hallado la presencia de MCP-1 en biopsias de pacientes con enfermedades renales como la nefropatía IgA, la glomerulonefritis crioglobulinémica, la nefritis aguda intersticial (147), la granulomatosis de Wegener, la nefritis lúpica (148) y la glomerulonefritis rápidamente progresiva (149), entre otras.

La quimioquina MCP-1, por lo tanto, parece tener un importante papel en el inicio de la inflamación (mediante el reclutamiento inicial de monocitos al sitio de inflamación) y en la progresión (amplificando la respuesta inflamatoria una vez establecido el infiltrado celular) de enfermedades inflamatorias que afectan al riñón.

4.3. ÓXIDO NÍTRICO: NO

El óxido nítrico (NO) es un agente biológico multifuncional sintetizado por la familia de sintetasas del óxido nítrico (NOS) a partir del aminoácido L-arginina en las células de mamíferos (150, 151). El NO puede ser sintetizado por tres isoformas de NOS:

- NOS tipo I o NOS endotelial (eNOS) y la tipo III o NOS neuronal (nNOS), que se expresan de forma constitutiva y su actividad es dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y de NADPH (152). Estas enzimas, en general, producen poca cantidad de NO durante un corto periodo tras la estimulación;
- NOS tipo II, o NOS inducible (iNOS) cuya expresión ha de ser inducida por citoquinas tales como el IFN- γ y el TNF- α , o bien por activadores policlonales como el LPS (153). Es dependiente de tetrahidrobiopterina (BH_4)/NADPH e independiente de Ca^{2+} /calmodulina (154). La iNOS libera grandes cantidades de NO durante un largo periodo de tiempo y la inducción de esta isoforma está regulada a nivel transcripcional (151, 153).

En el riñón la liberación constitutiva de NO es necesaria para el mantenimiento del flujo sanguíneo renal (155). Sin embargo, un exceso en la producción de NO mediado por citoquinas (a través de la expresión de iNOS) en ciertas situaciones patológicas puede contribuir en gran medida a dañar el tejido renal (156-158).

En varias células renales como macrófagos activados, células vasculares, musculares, mesangiales y tubulares se puede inducir la síntesis de NO a través de la iNOS. Existen evidencias en la literatura de que la inducción de iNOS en estas células parece estar participando en la patogénesis de varias glomerulonefritis experimentales y glomerulonefritis por complejos inmunes en humanos (157, 159). No obstante, también se ha comprobado que en determinadas situaciones la inhibición de esta enzima también puede intensificar el daño y el deterioro funcional del riñón, como ocurre en la nefritis nefrotóxica experimental (158).

Las ratas BN son únicas en cuanto a la elevada expresión de iNOS y, por lo tanto, en su elevada producción de NO (160), lo que insta a investigar el papel de este mediador en el daño inflamatorio renal que se produce como consecuencia de la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ en esta cepa susceptible.

En la vasculitis necrotizante que se produce como consecuencia de la autoinmunidad inducida por HgCl₂ en las ratas BN se ha observado que la expresión exacerbada de NO contribuye en gran medida al daño tisular que se produce en intestino, pulmones y piel (161).

5. MOFETIL MICOFENOLATO: USOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

En general el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas severas se aborda con el uso de inmunosupresores. En la mayoría de los casos es un tratamiento empírico e insatisfactorio (162). Las limitaciones de la mayoría de los inmunosupresores usados en la actualidad son los importantes efectos secundarios que presentan, por lo que es necesario establecer una solución de compromiso entre el riesgo y el beneficio de usar estos fármacos.

Los efectos secundarios se pueden manifestar a corto o a largo plazo. A corto plazo, es frecuente la aparición de infecciones por herpesvirus u otros agentes infecciosos como consecuencia de la inmunosupresión generalizada o efectos específicos que producen estos agentes mientras que a largo plazo, las terapias inmunosupresoras suelen resultar a menudo en el desarrollo de linfomas u otros procesos tumorales producidos por la inducción de translocaciones cromosómicas y efectos mutagénicos y carcinogénicos que presentan varios de estos fármacos (163). Algunos de los inmunosupresores de mayor uso hoy en día se representan en la *tabla 3* junto con sus principales efectos secundarios.

Por lo tanto, es deseable y necesario el uso de inmunosupresores que permitan una rápida restauración de la respuesta inmunológica una vez retirado el fármaco, que posean una acción específica, de tal manera que afecten preferentemente a los linfocitos, y que presenten además un bajo o nulo nivel de toxicidad y de efecto mutagénico.

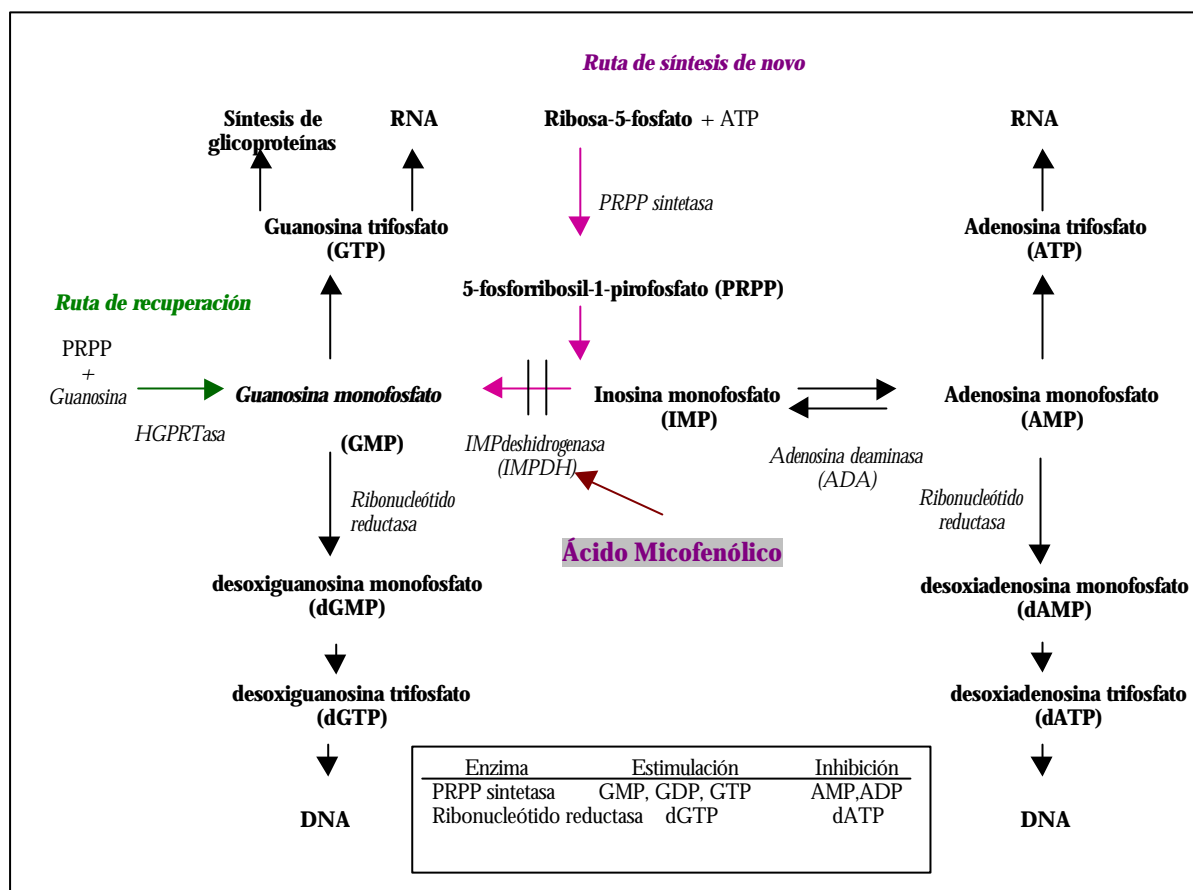


Figura 2. Rutas de biosíntesis de nucleótidos de purina El ácido micofenólico (MPA) inhibe la enzima IMPDH (| |)

El conocimiento de las bases moleculares de la respuesta inmunológica ha permitido desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para controlar reacciones inmunológicas no deseadas o anómalas como son el rechazo de órganos, las inmunodeficiencias, los fenómenos de hipersensibilidad y las respuestas autoinmunes. La creación de nuevos fármacos inmunosupresores está dirigida hacia la consecución de resultados más efectivos, específicos y seguros que los obtenidos hasta ahora (164).

Frecuentemente, el desarrollo de inmunosupresores se basa en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos interfiriendo en las rutas biosintéticas de nucleótidos de purina y pirimidina con el fin de evitar, en última instancia, la proliferación celular (164, 165). La síntesis de estos nucleótidos se puede llevar a cabo a través de dos rutas metabólicas presentes en todos los tipos celulares: la vía de síntesis *de novo* (se sintetizan a partir de precursores) y la vía *salvage* o de recuperación, como se muestra en la figura 1. No obstante, en individuos que tienen una deficiencia congénita para alguna de las enzimas clave de la ruta de síntesis *de novo*

se observan graves alteraciones linfocitarias (p.ej., deficiencia de la adenosín deaminasa, ADA). Sin embargo, cuando la deficiencia es para una enzima crítica en la ruta de recuperación las alteraciones que se observan son neurológicas, manteniéndose intacta la función linfocítica (p.ej., Síndrome de Lesch-Nyhan) (166).

Estos datos muestran que los linfocitos dependen en gran medida de la ruta metabólica *de novo* para sintetizar nucleótidos, mientras que otros tipos celulares pueden utilizar la ruta de recuperación en ausencia de la primera. Esta característica de los linfocitos ha sido punto de partida para el diseño de fármacos que afecten de forma específica a la proliferación linfocitaria. Alguno de estos fármacos que interfieren en la síntesis de nucleótidos son: la azatioprina, la mizorribina, la leflunomida, el brequinar sódico y el mofetil micofenolato (MMF) (164, 167).

El MMF es el éster morfolinoetil del ácido micofenólico (MPA) (ver *figura 2*). Este ácido es uno de los productos de fermentación de varias especies de *Penicillium*. El MPA es un potente inhibidor no competitivo y reversible de una enzima clave para la síntesis de nucleótidos *de novo* de purina, la inosín 5´ monofostato deshidrogenasa (IMPDH) (166).

Fármaco	Toxicidad
Ciclosporina	Nefrotoxicidad, hiperplasia gingival, hirsutismo, hepatotoxicidad, neurotoxicidad, hipomagnesemia, hipercalemia.
Azatioprina	Leucopenia, anemia, trombocitopenia, anemia aplásica (raramente). Hepatitis, pancreatitis, alopecia.
Prednisona	Redistribución de las grasas, hipertensión. Hiperglicemia, aumento del apetito. Retención de sodio. Sudores nocturnos, insomnio, cambios de humor. Visión borrosa, cataratas.
Tacrolimus (FK-506)	Nefrotoxicidad, hipertensión, hepatotoxicidad, pancreatitis, diabetes (raramente). Dolor de cabeza, insomnio, temblores, parestesias.
Ciclofosfamida	Depresión de la médula ósea, cistitis hemorrágica, toxicidad gonadal, fibrosis de vejiga. Cáncer y otras enfermedades malignas.
Clorambucil	(iguales a los de la ciclofosfamida)
Mofetil Micofenolato	Diarrea, vómitos, dispepsia, anemia, trombocitopenia y leucopenia.

Tabla 3. Inmunosupresores y efectos secundarios: fármacos inmunosupresores usados en enfermedades renales y trasplante junto con sus principales efectos adversos. Datos procedentes de (163).

La principal consecuencia de la inhibición de la IMPDH es la depleción del GMP intracitoplasmático (y, consecuentemente del GTP y dGTP) lo que producirá un efecto antiproliferativo en los linfocitos más potente que en otros tipos celulares (165, 166). Además, la isoforma tipo II de la IMPDH, presente en linfocitos en estado de proliferación, es cuatro veces más sensible a la inhibición por MPA que la isoforma de tipo I, expresada en la mayoría de las células (168).

5.1. USOS DEL MMF

El uso del inmunosupresor MMF fue aprobado por la *Food Drug Administration* para su utilización en humanos en 1995. La eficacia de este fármaco tanto en la prevención como en el tratamiento del rechazo en el trasplante de órganos se halla firmemente establecida en la actualidad (169).

MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES	INFORMES PRELIMINARES EN ENFERMEDADES HUMANAS
- <i>Inhibición de nefritis experimentales:</i>	- <i>Enfermedades renales:</i>
En ratas: Nefritis pasiva de Heymann Ablación renal Nefritis proliferativa mesangial	Nefropatía membranosa Enfermedad de cambios mínimos Esclerosis focal y segmentaria. Nefritis lúpica
En ratones: Nefritis lúpica en ratones NZB/W Nefritis lúpica en ratones MRL/lpr	Nefropatía IgA Vasculitis
- <i>Atenuación del daño por isquemia reperfusión</i> - <i>Inhibición de enfermedades autoinmunes y otros desórdenes inmunológicos:</i>	- <i>Otras alteraciones autoinmunes e inflamatorias:</i>
En ratas: EAE Diabetes en ratas <i>Bio-Breeding</i> (BB) Colitis Artritis inducida por adyuvante Osteopenia Uveorretinitis autoinmune	Enfermedades de la piel (psoriasis, eczema dishidrótico, pénfigo) Artritis reumatoide Inflamación ocular Anemia hemolítica autoinmune Enfermedad de injerto contra huésped Enfermedad inflamatoria intestinal <i>Myastenia gravis</i>

Tabla 4. Usos del MMF en algunos modelos experimentales animales e informes preliminares de su utilidad en enfermedades renales y autoinmunes/inflamatorias en humanos. Revisados en (169).

El tratamiento con MMF es eficaz en varios modelos experimentales de rechazo crónico y se espera que tenga el mismo efecto en humanos en un futuro. Pero la utilidad de

este inmunosupresor no se limita a la terapia en el trasplante de órganos sino que además ha demostrado ser beneficioso en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias en animales de experimentación y humanos, las cuales se resumen en la *tabla 4*.

5.2. EFECTOS DEL MMF

Los principales efectos descritos hasta ahora derivados de la depleción de nucleótidos de guanosina son: inhibición de la proliferación celular, alteración en la glicosilación de moléculas de adhesión, inducción de apoptosis tras la activación celular e inhibición de la enzima iNOS. Además de éstos existen otros efectos que se han ido revelando a lo largo de los últimos años mediante la investigación de líneas celulares, cultivos primarios, modelos en rata o ratón y análisis de pacientes que han recibido este inmunosupresor (169).

5.2.1. Inhibición de la proliferación celular

Como se mencionó anteriormente, las células más susceptibles a la inhibición producida por el MPA son los linfocitos ya que dependen exclusivamente de la ruta de síntesis *de novo* para sintetizar nucleótidos de purina. A concentraciones terapéuticas (cercasas a 10 μ M) el MPA inhibe *in vitro* la proliferación inducida por mitógenos de células T y B de sangre periférica (170) así como las respuestas citotóxicas en cultivos mixtos de linfocitos. Esta inhibición se produce 72h después de la incubación lo que sugiere que bloquea acontecimientos tardíos en la respuesta linfocitaria. El efecto inhibitorio se revierte con la adición al medio de nucleótidos de guanina (165). El MMF inhibe la proliferación de todas las múltiples líneas T y B testadas (170).

Además, aunque los mayores efectos citostáticos sean sobre linfocitos, el MPA también es capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de células de músculo liso humano (166) y de células mesangiales (171).

En múltiples estudios también se ha demostrado la capacidad de ejercer esta inhibición *in vivo* mostrando además un efecto dosis-dependiente (172). El efecto del MMF es totalmente reversible. Una vez retirado el fármaco, se recupera en pocos días la actividad normal linfocitaria como ocurre en pacientes previamente inmunosuprimidos con MMF cuyos linfocitos de sangre periférica (PBLs) responden perfectamente a estimulación mitogénica tras la retirada del inmunosupresor (166).

5.2.2. Alteración en la glicosilación de moléculas de adhesión

La glicosilación de las glicoproteínas es un hecho de alta relevancia para la expresión en membrana de diversas moléculas de adhesión y/o para su correcto funcionamiento (167). El GTP es necesario para la transferencia de fructosa y manosa mediada por GDP a las glicoproteínas (173). Por esta razón se postula que la inhibición de la IMPDH podría estar interfiriendo en los procesos de glicosilación de las moléculas de adhesión. Los estudios iniciales por citometría de flujo evidenciaron este hecho de forma indirecta, demostrando una inhibición de la expresión en superficie de oligosacáridos abundantes en residuos de manosa pertenecientes a glicoproteínas de membrana. Además se observaba como el MPA en concentraciones terapéuticas era capaz de inhibir *in vitro* la adhesión de linfocitos T activados (167).

Una alteración en la función de las moléculas de adhesión resultaría así en la inhibición del reclutamiento de células inmunes a lugares de inflamación e interferiría en el contacto celular, así como en la transmisión de señales ejercidas por muchas de estas moléculas de adhesión. Estos motivos han llevado al estudio de los efectos del MMF o MPA sobre diferentes moléculas de adhesión, tal y como se detallará en los siguientes párrafos:

El MPA es capaz de deplecionar el GTP intracelular en monocitos y en linfocitos (166). Laurent y col. teniendo en cuenta que los monocitos no son células proliferativas, estudiaron otras posibles alteraciones metabólicas resultantes de la depleción de GTP (174). El MPA añadido a monocitos circulantes en cultivo permitía que conservasen su capacidad fagocítica y citotóxica, así como la secreción de citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8). El único efecto que se observó fue una reducción en la adhesión de estas células a laminina y células endoteliales debido, posiblemente, a una reducción en la manosilación de las glicoproteínas de membrana (174).

Existen controversias respecto a la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) expuestas a MPA. El tratamiento con MPA producía una disminución de la expresión de la P-selectina (175) y la E-selectina (175, 176), así como una disminución en la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α o IFN- γ , no hallándose afectada en este caso la ICAM-1 (176). Por el contrario, Hauser y col. observaron aumentos en la E-Selectina y VCAM-1 en respuesta al MPA, en HUVEC

activadas con TNF- α . Este aumento lo atribuyeron a una mayor estabilidad de los ARNm de esta citoquina, hecho que parecía ser independiente de la inhibición de la IMPDH al no revertirse con la adición de nucleótidos de guanina al medio (171). Weigel y col., sin embargo, demostraron que el MPA inducía un aumento en la expresión de ICAM-1 y que además presentaba una actividad sinérgica con la IL-4 aumentando la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por ésta (177).

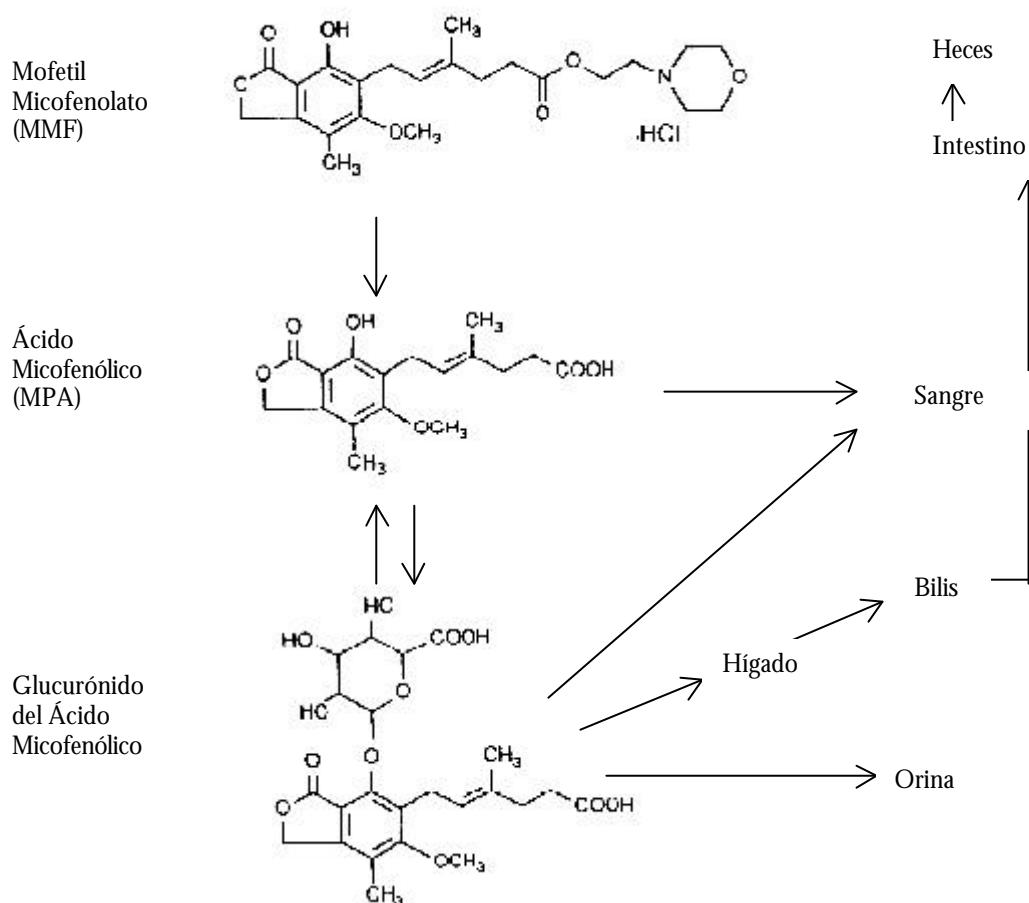


Figura 3. Estructura del éster morfolinoetil del ácido micofenólico (MMF), del MPA y de su glucurónido, y lugares de interconversión y excreción.

Jepson y cols. sorprendentemente describieron que el MPA no alteraba la glicosilación en las células T. Para ello usaron PBLs humanos, linfocitos de rata y la línea de células T CEMC7, que cultivados con concentraciones crecientes de MPA que no mostraron alteraciones en su capacidad para adherirse a residuos de fucosa y manosa específicos de lectinas presentes en las glicoproteínas (178).

No obstante, la mayoría de las evidencias experimentales indican que el MMF sí que afecta a la expresión, síntesis y/o función de ciertas moléculas de adhesión. Estudios más precisos de Blaheta y col. han demostrado que la adhesión de VLA-4, LFA-1 y PSGL-1 a sus correspondientes ligandos ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina, sí que se encontraba disminuida de manera significativa en respuesta al inmunosupresor. Además, observaron cómo el MMF impedía la acumulación de VLA-4 y PSGL-1 en pseudopodios de membrana de células T lo que afectaría a su capacidad adhesiva (179).

5.2.3. Síntesis de citoquinas

A diferencia de la ciclosporina A, el MMF no inhibe la expresión de IL-2 en linfocitos de sangre periférica activados con mitógenos (180) o en células T activadas, por lo que el MMF no inhibe respuestas tempranas en la activación sino que bloquea la síntesis de DNA en la fase S del ciclo celular (181).

El efecto del MMF sobre la síntesis de citoquinas en células mononucleares podría depender del tipo de estímulo. Inicialmente se observó que la inducción de la síntesis de múltiples citoquinas por el superantígeno SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus*) no era inhibida *in vitro* a las 24h., pero sí a las 48h. Esto corroboraría que el MMF no intervendría en eventos iniciales de activación celular, como se ya se mencionó. Sin embargo, si la respuesta era inducida por mitógenos (ionomicina y PMA), el MMF no presentaba efectos sobre la síntesis de citoquinas (182). En un estudio reciente se ha hallado que el MMF además disminuye la síntesis de TNF- α , IFN- γ e IL-10 *in vivo* en ratones que reciben la toxina SEB (183).

Por otro lado, en el modelo de endotoxemia en ratones (activación policlonal mediada por LPS), el tratamiento con MMF no presentó efectos sobre la síntesis de citoquinas inducidas. Sin embargo, en las respuestas alogénicas que presentaban estos ratones, se producía una reducción dosis-dependiente de la producción de IFN- γ así como de MHC de clase I y II (184).

Recientemente, en este mismo modelo, Durez y col. recientemente sí que han observado una modulación en la producción de citoquinas ejercida por el MMF que en esta ocasión inhibía la producción de TNF- α y NO, y aumentaba la de IL-10. Además el efecto

anti-inflamatorio sobre el TNF- α era directo y no dependía de la IL-10, hecho confirmado en ratones deficientes para esta citoquina (185).

Finalmente, se ha postulado que la disminución de TNF- α e IFN- γ hallada en modelos *in vivo* y en células T activadas por mitógenos *in vitro* no parece ser solamente consecuencia de la inhibición de la expansión clonal, como se suponía previamente, sino que podrían estar implicadas alteraciones en la señalización intracelular por la alteración en los niveles de GTP (186). El MMF, de esta manera, podría estar actuando sobre citoquinas Th1 en células T activadas disminuyendo o inhibiendo su producción como se observó que ocurría *in vivo* en un modelo de activación por superantígenos (183).

No obstante, en el modelo de nefritis de Heymann la protección ejercida por el MMF se atribuye a un efecto supresor sobre citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-6) implicadas en el desarrollo de esta enfermedad renal experimental (187).

5.2.4. Producción de Acs

El MPA inhibe la síntesis de Acs producidos por células B activadas policlonalmente *in vitro* (170), y en el rango de concentraciones entre 10^{-5} - 10^{-6} M inhibe completamente la síntesis de IgE (188).

Tanto en modelos experimentales, como en enfermedades humanas, se ha comprobado que el MMF suprime respuestas primarias de Acs de manera mucho más eficaz que respuestas secundarias, donde se manifiesta de forma muy limitada esta propiedad (169), tal y como se comentará en la discusión.

Inicialmente se observó en ratas y ratones que el MPA inhibía totalmente la síntesis de Acs contra eritrocitos de oveja, así como en respuesta a células xenogénicas (170). Sin embargo, aunque el MMF haya mostrado ser capaz de suprimir la producción de Acs frente antígenos extraños en las células B en respuestas primarias (187) si las células B han sido previamente activadas el MMF carece de efectos supresores (189).

5.2.5. Inhibición selectiva de la iNOS.

Senda y col. hallaron que el MPA inhibía la síntesis de NO inducida por citoquinas de manera dosis-dependiente en células vasculares de rata y ratón sin afectar a la producción basal de NO, hecho que atribuyeron a un bloqueo en la síntesis de tetrahidrobiopterina (BH₄) (190). La BH₄ es un cofactor de la enzima iNOS imprescindible para su actividad y su proceso biosintético requiere la participación de GTP (191). Por lo tanto, la depleción de este nucleótido que produce el MPA inhibe la síntesis de NO inducida por citoquinas, para lo que es necesario la actividad de la iNOS y de su cofactor BH₄ recién sintetizado.

Por otro lado, la posible modulación de la síntesis de citoquinas en linfocitos y monocitos (en especial del IFN- γ y TNF- α , ambos inductores de la enzima iNOS) debe de contribuir a la disminución del NO (157, 169).

La inhibición en la actividad de la iNOS, que produce el MPA, se ha puesto de manifiesto en distintos modelos animales como en el lupus en ratones MRL/lpr (157), en la isquemia-reperfusión (192) y en la ablación de 5/6 del riñón (193).

5.2.6. Síntesis de otros nucleótidos

Aunque en los estudios iniciales se afirmó que el MMF no alteraba los niveles de producción de ATP, recientemente se ha descrito que en cultivos de linfocitos T primarios humanos no estimulados se produce una reducción en los niveles de ATP de más del 50%, como consecuencia indirecta de la inhibición de la IMPDH, a la vez que aumenta el UTP. La causa de esta alteración en la síntesis de nucleótidos sería posiblemente consecuencia de: por una parte, la necesidad de GTP para una de las enzimas clave en la síntesis de pirimidinas (la adenilsuccinato sintetasa) y por otra, la falta de expansión de los nucleótidos de CTP. Esto último provocaría la acumulación de nucleótidos de UTP que ejercerían una inhibición en la ruta de recuperación de uridinas contribuyendo a su vez a la disminución del ATP (ver *figura 2*) (194). En los estudios de Raab y col. se demuestra que el efecto sobre los nucleótidos que presenta el MPA es dosis dependiente. Células activadas con TNF- α a las que se les añade MPA muestran inicialmente una disminución del GTP que no se ve acompañada de aumentos en el UTP hasta alcanzar una concentración de 20 μ M (176).

5.2.7. Inducción de apoptosis

El MPA es capaz de inducir apoptosis en linfocitos T humanos activados policlonalmente y en líneas celulares de linfocitos T humanos (181). Por lo que, además de sus efectos citostáticos, el MMF podría eliminar células activadas por antígenos a través del TCR, lo que tendría un papel importante en la inducción de tolerancia frente a aloantígenos observada en algunos modelos experimentales. La inducción de apoptosis, además, sería selectiva para monocitos/macrófagos y linfocitos (169, 195).

5.2.8. Maduración y función de células dendríticas

El MMF retarda la maduración de células dendríticas y reduce de forma dosis dependiente su capacidad para estimular la proliferación de las células T *in vitro* posiblemente a través de una reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, ICAM-1 e I-A) en las células dendríticas (196).

5.3. TOXICIDAD DEL MMF

Hoy en día los efectos tóxicos atribuibles al tratamiento con MMF son principalmente afecciones gastrointestinales, moderada leucopenia, y en ocasiones afecciones del tracto respiratorio. No se han encontrado efectos adversos clínicamente significativos como consecuencia directa del uso de MMF tales como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, o inducción de mutagénesis. De cualquier forma, ante la aparición de posibles infecciones víricas u otros efectos adversos, el fármaco puede ser retirado restableciéndose la función linfocitaria en breves días (166, 169).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El MMF ha demostrado ser beneficioso para ciertas alteraciones autoinmunes e inflamatorias. En el modelo de nefritis autoinmune inducida por HgCl_2 en la rata BN planteamos la hipótesis de que la administración de este nuevo fármaco tenga efectos moduladores tanto a nivel inmunológico como a nivel inflamatorio. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se formularon los siguientes objetivos:

A . Analizar los efectos preventivos y terapéuticos del MMF sobre la nefritis experimental autoinmune inducida por HgCl_2

- Estudiar las posibles propiedades preventivas sobre la inducción y desarrollo de esta nefritis autoinmune experimental, para lo cual el MMF se administrará desde la primera inyección de HgCl_2 , diariamente, hasta el final del experimento.
- Valorar los efectos terapéuticos del MMF sobre esta enfermedad experimental, para lo cual se administrará el inmunosupresor una vez desarrollada la respuesta autoinmune y se analizará si existen efectos supresores sobre la respuesta humoral a nivel sistémico y/o efectos anti-inflamatorios a nivel renal, que sean beneficiosos para esta nefropatía.

Para abordar estos objetivos generales se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar la cinética de producción de Acs anti-ADN y anti-MBG en suero con el fin de caracterizar las propiedades supresoras del MMF en la respuesta primaria (durante el "tratamiento preventivo") o sus efectos moduladores tras la activación de la respuesta autoinmune (durante el "tratamiento terapéutico").
- ✓ Estudiar los efectos del MMF sobre la proteinuria analizando la excreción de proteínas en orina a lo largo de la enfermedad y determinar la cinética de producción de nitritos en orina en los animales inyectados con HgCl_2 , así como los efectos de ambos tratamientos con MMF sobre ésta.

- ✓ Identificar mediante estudios histopatológicos renales las lesiones características del modelo de nefritis (infiltrado intersticial y depósitos de Igs glomerulares). Investigar si el tratamiento preventivo con MMF evita su aparición y si el tratamiento terapéutico con dicho fármaco es capaz de revertir el daño producido en el parénquima renal.
- ✓ Analizar las propiedades anti-inflamatorias del MMF mediante el estudio comparativo de la presencia de mediadores inflamatorios en parénquima renal (expresión de TNF- α y síntesis de MCP-1 e iNOS) y en suero (síntesis de TNF- α) en animales inyectados con HgCl₂ y en animales que reciben el tratamiento con MMF.

B. Debido a la importancia de la vía de adhesión VLA-4/VCAM-1 en la fase inducción y en las fases efectoras de este modelo experimental, investigar la acción del MMF sobre esta molécula en los linfocitos de rata. Para ello, se analizará la expresión en membrana de VLA-4, así como su función de adhesión a VCAM-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Para todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Brown Norway (BN) de 8 a 12 semanas de edad con pesos comprendidos entre 140 y 200g. Los animales se obtuvieron de IFFA CREDO (Paris, Francia) y se mantuvieron en condiciones estándar en el animalario del hospital con libre acceso a agua y comida. Los tratamientos que recibieron se llevaron a cabo respetando la normativa europea del 18 de Marzo de 1989.

2. ANTICUERPOS

2.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales (AcMos) usados para este trabajo se detallan en la *tabla 5*. Todos ellos son inmunoglobulinas de ratón de isotipo IgG1 excepto el Ac WT1, cuyo isotipo es IgG2a. Los AcMos HP2/1 y HP2/4 fueron cedidos ambos por el Dr. Sánchez-Madrid, TA-2 cedido por el Dr. TB Issekutz y WT.1 por el Dr. Miyasaka. Los AcM OX22, W3/25 y OX1 se obtuvieron de Serotec (Oxford, Inglaterra).

2.2. ANTICUERPOS POLICLONALES

Como Acs primarios se usaron: antisuero de conejo dirigido contra la quimioquina de ratón MCP-1, que reconoce la quimioquina MCP-1 de rata, (cedido por el Dr. Schlöndorff) (197); Ac policlonal de conejo contra la enzima murina iNOS (Chemicon, CA, USA); Ac policlonal dirigido contra las cadenas pesadas y ligeras (H+L) de la IgG total de rata conjugado con FITC y usado para inmunofluorescencia directa, (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA).

Como Acs. secundarios se usaron: antisuero de cabra peroxidado contra la IgG total de ratón (Amersham International, Inglaterra) ; antisuero de oveja peroxidado contra

la IgG total de rata (Serotec, Oxford, Inglaterra); Ac policlonal obtenido en cabra contra la IgG e IgM de conejo (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA); y, Ac policlonal de cabra conjugado con FITC, contra la IgG de ratón (AlexaFluor 488, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA).

ANTICUERPOS MONOCLONALES	ESPECIFICIDAD	ESPECIE	REFERENCIA
HP2/4	VLA-4 Subunidad $\alpha 4$ (epítipo B2)	Humano Reacción cruzada con rata*.	(97) *(90, 115)
HP2/1	VLA-4 Subunidad $\alpha 4$ (epítipo B1)	Humano Reacción cruzada con rata*	(97) *(91)
A-2	VLA-4, subunidad $\alpha 4$	Rata	(198)
WT.1	LFA-1, subunidad $\alpha 1$	Rata	(127)
OX22	CD45 RC	Rata	(68, 69)
W3/25	CD4	Rata	(199)
OX1	CD45	Rata	(200)

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. INDUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE

La enfermedad autoinmune se indujo mediante la administración de una solución de HgCl_2 (Sigma, Chemical Co., Saint Louis, MI, USA) de 1mg/g de peso en H_2O_8 según el protocolo descrito por Sapin y col. (26). Cada animal recibió 5 inyecciones subcutáneas en la región dorsal, repartidas a lo largo de 2 semanas.

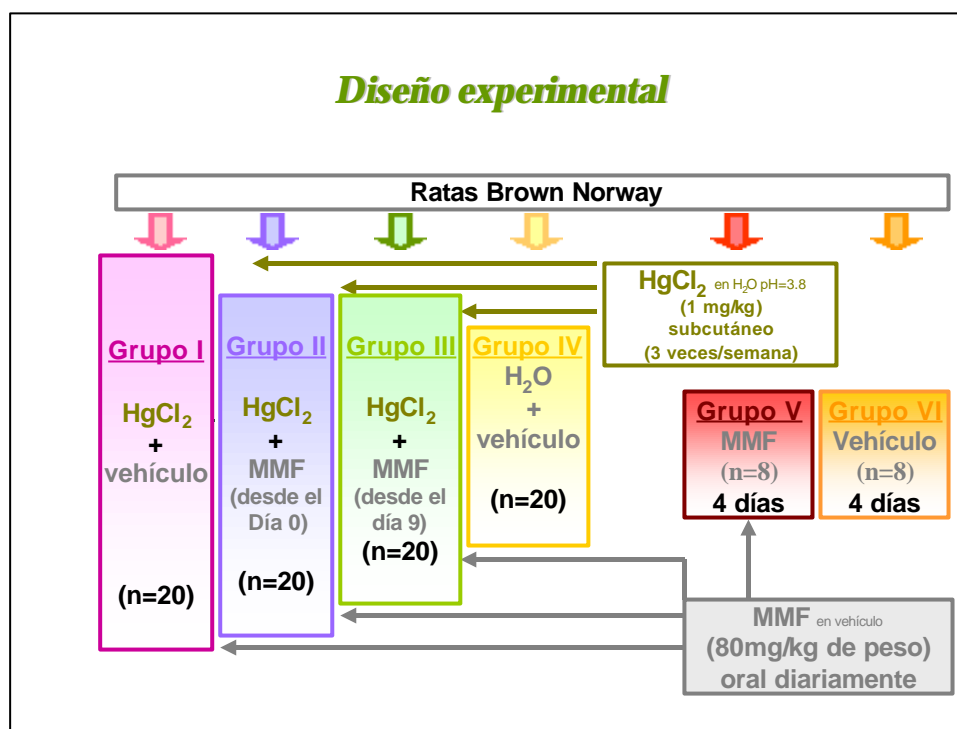


Figura 4. Diseño experimental

3.2. DOSIS Y ADMINISTRACIÓN DEL INMUNOSUPRESOR

Para encontrar la dosis adecuada de MMF, distintos grupos de ratas (n=4 por grupo) fueron tratadas con distintas concentraciones del inmunosupresor (20, 40, 80 y 100 mg/kg) de forma simultánea a la administración de HgCl_2 . Se optó por elegir la dosis con la que se consiguió bloquear completamente la producción de auto-Acs contra la MBG (80 mg/Kg Peso) (ver figura 6, apartado de Resultados) sin que las ratas presentasen signos atribuibles a toxicidad como diarrea o una pérdida considerable de peso. El MMF se administró diariamente por vía oral mediante una sonda gástrica (Cibertec, Madrid). El vehículo utilizado fue el descrito por Jonsson y col. (201) y consistió en una solución de PBS en H_2O_8 1:4 cuyo pH se ajustó a 3.6 con HCl para facilitar la solubilidad del MMF. En el experimento de ajuste de la dosis, se constató la ausencia de efectos del vehículo sobre las ratas por lo que se obvió su administración en los grupos siguientes.

3.3. GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales fueron separados en 6 grupos (I-IV). Los grupos I, II, III, IV se usaron para estudiar *in vivo* el efecto preventivo y terapéutico del MMF sobre la nefritis

experimental, mientras que los grupos V y VI se utilizaron para analizar *ex vivo* los efectos del MMF sobre la integrina VLA-4. El tratamiento que se administró cada grupo de animales se detalla a continuación (ver figura 4):

- Grupo I, n=20: Solución de HgCl₂. Fue el grupo control positivo de la enfermedad.
- Grupo II n=20: Solución de HgCl₂ y MMF desde el inicio del estudio. Fue el grupo de prevención de la enfermedad.
- Grupo III (n=20): Solución de HgCl₂ y MMF. El inmunosupresor se administró a partir del día después de la última dosis de HgCl₂ (día 9) cuando ya se ha puesto en marcha la respuesta autoinmune (aumento de auto-Acs en sangre periférica y aparición de proteinuria). Fue el grupo de tratamiento.
- Grupo IV, n=20: Solución de agua destilada con el pH 3.8, idéntico al de la solución de mercurio, siguiendo el mismo protocolo experimental que para ésta. Fue el grupo de control negativo de la enfermedad o grupo sano.
- Grupo V, n=4: MMF durante 4 días.
- Grupo VI, n=4: PBS 1:4 en H₂O₈ pH 3.6 (vehículo del MMF). Grupo de control negativo.

4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.1. SUERO

Se practicó una punción en la arteria de la cola de todos los animales (Grupos de I a IV) en días alternativos a lo largo de todo el experimento. La recogida de sangre se realizó en tubos de vidrio recubiertos de silicona en los que se dejó coagular durante 1 h. a T^a ambiente, y tras haberse retraído el coágulo, se centrifugaron a 2500 r.p.m durante 30 min. a 4^oC. para finalmente recoger el suero. Para separar las células que aun quedaban en los sueros, se ultracentrifugaron 5 min. a 10.000 r.p.m., tras lo cual se alicuotaron y congelaron a -20^oC.

4.2. ORINA

Las ratas fueron alojadas en jaulas metabólicas por un periodo de 24 horas con acceso libre a comida y bebida. La toma de muestras se realizó a intervalos regulares comenzando el día 0 (previo a la primera inyección de HgCl₂) hasta el último día del experimento. Una vez recolectadas las orinas se anotó el volumen obtenido en cada caso, se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 10 min. y se desechó el precipitado.

4.3. RIÑÓN

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso). Se perfundieron los riñones con suero fisiológico salino a 37⁰C a través de la aorta abdominal ligada por encima de las arterias renales (202). Se seccionó además la vena renal izquierda para que drenase el líquido perfundido.

Las muestras renales se obtuvieron los días 0, 9, 13, 15 y 21 y se procesaron de la siguiente manera:

4.3.1. Inclusión en parafina

Una parte de la muestra renal (medio riñón de cada rata) se fijó durante 24h. con formol-salino tamponado al 10%. A continuación se deshidrató en baños crecientes de alcohol etílico y finalmente en xilol. Una vez deshidratado el tejido se incluyó en parafina líquida a 60⁰C, que fue cambiándose cada dos horas un total de tres veces. Estas muestras tisulares se utilizaron una vez procesadas para estudios histolopatológicos.

4.3.2. Congelación

La otra mitad que quedaba de cada riñón, se incluyó en el medio preservante Tissue-Tek (Miles Inc, Elkhart, USA) y se congeló en nitrógeno líquido. El riñón restante de cada rata se introdujo en un criotubo inmediatamente a su extracción y se congeló igualmente en nitrógeno líquido para extraer el ARN total renal. Todas las muestras se conservaron en isopentano a -70⁰C hasta su uso.

4.4. MEMBRANA BASAL GLOMERULAR

La membrana basal para los ensayos de ELISA se obtuvo a partir de riñones de ratas BN sanas, que se extrajeron y decapsularon cuidadosamente. Cada uno de ellos se abrió longitudinalmente y, mediante disección microscópica, se aisló la corteza que fue desmenuzada en tampón salino (PBS) frío. Con la ayuda de una espátula la corteza se pasó a través de un tamiz de 0,106 mm de diámetro, con el objeto de separar los glomerulos renales de los elementos tisulares adyacentes. El tamizado obtenido se lavó 3 veces en PBS frío, centrifugándose a 1.000 r.p.m. durante 5 min. eliminando cada vez el sobrenadante con cuidado de no decantar el pellet de glomérulos. Tras el último lavado los glomerulos se resuspendieron en NaCl 1M y se sonicó la muestra en 6 ciclos de 1 min. cada uno, en hielo, para la disrupción de la membrana. El homogeneizado obtenido tras el sonicado se centrifugó 10 min. a 3.000 r.p.m., el precipitado se resuspendió de nuevo en NaCl 1M y se volvió a centrifugar, tras lo cual el sedimento se resuspendió en un volumen final adecuado de H₂O₈. Después la muestra se pasó por un liofilizador Virtis 10-030 (Virtis Company, Inc. Gardiner, NY, USA), se depositó en tubos de cristal de 150 ml (Afora, Madrid, España) y se congeló en acetona saturada de nieve carbónica.

4.5. LINFOCITOS ESPLÉNICOS

Se obtuvieron siguiendo el protocolo de Bricio y col. (203), para ello los animales se anestesiaron como se mencionó anteriormente y la extracción del bazo se hizo mediante una laparotomía media en condiciones de esterilidad. El tejido se recogió en solución salina fisiológica a 4°C, se desmenuzó con un bisturí y se pasó a través de un tamiz de 150 mm para obtener la suspensión celular. Una vez obtenida la muestra celular diluida en suero salino, las células mononucleares fueron separadas mediante un gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma Chemical Co.) centrifugadas a 1.800 r.p.m. durante 30 min. a 4°C. Se recogió el halo de células mononucleares cuidadosamente y la suspensión celular obtenida se lavó tres veces 10 min. a 1.200 r.p.m. a 4°C. A continuación se resuspendieron las células en un volumen deseado de medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, estreptomina 100 mg/L, penicilina 100.000 u/L. Los macrófagos fueron eliminados mediante una adherencia a frascos de cultivo de plástico (Costar, Corp, Cambridge, MA) durante 1 h. a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂. Los

linfocitos esplénicos se usaron tanto para estudio por citometría de flujo y como para ensayos de adhesión.

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1. ESTUDIO BIOQUÍMICO

5.1.1. VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE Acs SÉRICOS ANTI-MBG MEDIANTE ELISA

Los niveles séricos de Acs contra componentes antigénicos de la membrana basal glomerular (laminina principalmente) se midieron mediante ELISA aplicando el protocolo descrito por Bowman y col. modificado en algunos puntos (49). Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que se tapizaron con MBG solubilizada de rata.

Cada placa se incubó con 100 μ l/pocillo, a una concentración de 10 μ g/ml de MBG en tampón carbonato sódico 0,1M (pH=9.6) y se dejó incubar 16 horas a 4°C. Tras lavar la placa con PBS se bloqueó con PBS/BSA 1% para evitar la unión inespecífica durante 1h. a 37°C. Durante este tiempo se procedió a diluir los sueros a ensayar (1/100) en tampón de dilución (PBS con Tween 20 al 0,05% y BSA al 1%). Después de lavar la placa 3 veces se incubaron los sueros durante 1h. a 37°C. A continuación y realizando otro lavado (triple) los pocillos se cubrieron con un Ac policlonal de conejo anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa a una dilución 1/10000. Tras otro lavado la actividad peroxidasa se reveló utilizando una solución de dicloro de orto-fenilamida (OPD, Sigma) en H₂O₈ a una concentración de 1 mg/ml y 0,05% de H₂O₂. Tras desarrollar el color se paró la reacción utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3 M. A continuación la placa se leyó a 450nm. Todas las muestras se ensayaron por triplicado. Los controles negativo y positivo se obtuvieron a partir de un *pool* de sueros de ratas BN sanas y de sueros obtenidos a día 13 de ratas BN tratadas con HgCl₂ respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentajes de unión relativos al control positivo, dándosele a éste un valor del 100% de unión.

El análisis de los depósitos glomerulares de Acs anti-MBG se describe más adelante, en el apartado *Estudio de histopatología renal*, epígrafe 5.2.3.

NOTA: Para calcular la concentración de la MBG, se solubilizó y se realizaron tres diluciones diferentes a partir de ella. Tras medir la absorbancia a 230 y 260nm por triplicado se aplicó la ecuación de Kalb y Bernolhr para extractos celulares [1977]:

$$\mu\text{g proteína/ml} = 183 A_{230} - 75,8 A_{260}$$

donde A_{230} y A_{260} son las absorbancias de la solución a 230 y 260 nm, respectivamente. Se consideró la concentración final de la muestra la media de ellas.

5.1.2. VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE Acs SÉRICOS ANTI-ADN_{hs} MEDIANTE ELISA

Para cuantificar los niveles séricos de Acs anti-ADN_{hs} se realizó un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. Se tapizaron placas de 96 pocillos con fondo en U (Nunc Inc, Naperville, IL, USA) con poli-L-Lisina (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) 100 μl /pocillo a una concentración e 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS para evitar la unión inespecífica del ADN a la placa y se incubaron durante 2h. a T^a ambiente. A continuación los pocillos se cubrieron con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario tipo I de timo de ternera (Sigma) en PBS durante 16h a 4°C. Para bloquear la unión inespecífica se incubó la placa con PBS, BSA 2% y Tween 20 0,05% durante 1h. a 37°C. Los sueros se diluyeron 1/100 en tampón de dilución (PBS con Tween 20 al 0,05% y BSA al 1%) y se incubaron 1h. a 37°C. Después de esto se añadió el Ac policlonal de conejo anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa a una dilución 1/10.000. Entre cada paso se realizó un lavado de la placa con una solución de PBS con Tween 20 al 0,05 %. El revelado y la cuantificación de los valores obtenidos se realizó como en el apartado anterior.

5.1.3. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN ORINA MEDIANTE ENSAYO COLORIMÉTRICO

La concentración de proteínas en orina se determinó mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo “Bio-Rad assay” (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) según las instrucciones descritas por el fabricante, basadas en el método de Bradford (1976). Todas las muestras se analizaron por triplicado y la O.D. de cada una de ellas se leyó a $\lambda=595$ nm en un lector de placas Titertek Multi-skan Plus (Flow, Irvine, Escocia). El valor de cada

muestra se determinó a partir de una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) suministrada por el fabricante del reactivo.

5.1.4. CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS EN ORINA POR EL MÉTODO DE GRIESS.

Se utilizaron las mismas muestras de orina que para el ensayo de proteinuria, y se realizó por el método colorimétrico de Griess en placas de 96 pocillos (Nunc) con el reactivo de Griess comercial (Alexis Corporation, Nottingham, UK) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La OD. de las muestras se midió a $\lambda=540\text{nm}$ en el lector de placas multipocillo.

5.2. ESTUDIO DE HISTOPATOLOGÍA RENAL

5.2.1. HISTOLOGÍA RENAL

Se realizaron cortes de 5 μm . Del tejido renal incluido en parafina sobre los que se realizaron las siguientes tinciones tras desparafinar e hidratar los cortes:

-Hematoxilina-Eosina (H&E): los cortes se sumergieron durante 2 min. en hematoxilina de Harrys y a continuación se pasaron por un baño de Eosina alcohólica durante 30 segundos y, se lavaron con agua corriente hasta obtener la intensidad deseada.

- Ácido periódico de Schiffs (PAS): tras sumergir los cortes 5 min. en ácido peryódico al 0.5%, se lavaron con agua destilada abundantemente para su posterior tinción con el reactivo de Schiffs durante 15 min. A continuación se pasaron por bisulfito sódico al 10% 5 min. tras lo cual se lavaron con agua corriente durante 5 min. Para contrastar los núcleos se sumergieron en hematoxilina de Harrys durante 30s. y a continuación se lavaron con agua corriente abundantemente.

Todas las preparaciones se deshidrataron, aclararon y montaron en medio el medio no acuoso Dpx (Raymon Lamb, Inglaterra) para su posterior estudio histológico.

5.2.2. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL COMPONENTE INFLAMATORIO CELULAR INTERSTICIAL

Se realizó mediante inmunohistoquímica dirigida contra el antígeno panleucocitario CD45 en cortes congelados de tejido renal renal de ratas (n=10) pertenecientes a todos los

grupos experimentales. Se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta realizándola como describen Giménez y Mampaso (204) con pequeñas modificaciones. A partir del tejido renal congelado (incluido en el crioprotector OCT) se realizaron cortes de 3-5 μm que se dejaron secar durante una hora. A continuación se fijaron en acetona a -20°C durante 10 min., se lavaron tres veces en PBS durante 5 min. y a continuación se bloqueó la actividad peroxidasa endógena en metanol al 70% conteniendo 0.3% de agua oxigenada durante 15 min. a -20°C . Inicialmente se bloqueó la unión inespecífica con el suero del animal dónde se obtuvo el Ac primario diluído 1:5 durante 30 min. y tras lavar ligeramente los cortes en PBS se incubaron el AcMo OX1 (dilución 1/100) durante 1h. a T^{a} ambiente en una cámara húmeda. Se lavaron tres veces en PBS durante 5 min. y se añadió el Ac secundario anti IgG de ratón, conjugado con peroxidasa que se incubó 45 min. a T^{a} ambiente. A continuación se lavaron 4 veces en PBS durante 5 min. y la actividad peroxidasa se reveló con diaminobenzidina (DAB) disuelta en PBS (1mg/ml) conteniendo H_2O_2 al 0.0225 % hasta que los cortes adquirieron color. Se pasaron 2 veces por H_2O_8 durante 5 min., se tiñeron con hematoxilina y se montaron en medio acuoso Aquatx (Merck, Darmstadt, Alemania).

El recuento de las células infiltrantes del intersticio renal positivas para el marcador OX1 (anti-CD45) se determinó en dos cortes de tejido renal para cada una de las ratas examinándose 60 áreas al azar. Para ello se utilizó un microscopio de luz convencional empleando un objetivo 60X (Leitz) y el número de células expresado fue la media de todos los animales pertenecientes al mismo grupo.

5.2.3. ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS DE IgG POR INMUNOFLUORESCENCIA

Para la detectar los depósitos glomerulares de IgG de rata se realizó una inmunofluorescencia directa (IFD) siguiendo el protocolo descrito por Mampaso y col. (205). Las secciones se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron durante 10 min. en una solución 1:1 v/v de alcohol etílico/éter dietílico a -20°C , los cortes se lavaron con PBS tres veces y después se incubaron con un Ac policlonal de conejo anti-IgG de rata conjugado con FITC. La incubación se hizo en cámara húmeda y protegida de la luz. Los cortes se lavaron con PBS cuatro veces y se montaron glicerol tamponado al 50%. Posteriormente, fueron estudiados en un microscopio de fluorescencia Leitz con lámparas de mercurio HB-200 y filtros BG-TB, ultravioleta y barrera Leitz K-510.

5.3. ESTUDIO DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

5.3.1. TNF- α

5.3.1.a) VALORACIÓN DEL TNF- α SÉRICO MEDIANTE ELISA.

La valoración de TNF- α sérico se llevó a cabo mediante un ELISA comercial siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante (Endogen, Inc., USA). La lectura de la placa se hizo a $\lambda = 450\text{nm}$. en el lector de placas multipocillo.

5.3.1.b) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN TNF- α EN TEJIDO RENAL MEDIANTE ENSAYO DE PROTECCIÓN DE RIBONUCLEASAS (RPA)

Aislamiento del ARN total.

El ARN total renal se extrajo mediante la técnica de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo ácido (206) ligeramente modificada. El tejido renal se sumergió congelado aun en 6 mL de Solución D (isotiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25mM (pH7.0), N-laurilsarcosina 0.5% (p/v) y 2-mercaptoetanol 0.1M) en homogeneizadores Potter y tras su homogeneización, el lisado obtenido se transfirió a tubos falcon estériles. A cada tubo se le añadió 0.1 vol. de acetato sódico 2M (pH 4.0) y se agitó por inversión varias veces. A continuación se añadió 1 vol. de fenol/cloroformo/isoamílico 125:24:1 pH 4.7 (v/v) (Sigma). La mezcla se pasó por el vortex durante 1 min. y se dejó reposar 15 min. en hielo. A continuación se centrifugó para separar las fases (15 min., 4000 r.p.m. 4°C); se recogió la fase superior evitando tocar la interfase y se precipitó con 1 vol. de isopropanol al menos durante 1 h. a -20°C. y posteriormente se centrifugó a 4000 r.p.m., 30 min. a 4°C. El ARN se resuspendió de nuevo en 700 μL de Solución D y se repitió la extracción con fenol. Una vez precipitado por segunda vez el ARN se lavó con etanol-DEPC al 80% (v/v), se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de H₂O-DEPC.

La concentración de ARN se calculó a partir de la OD. de cada muestra a 260 nm (1 OD. equivale a 40 μg de ARN). Todas las muestras utilizadas presentaron una relación de absorbancias 260nm/280nm entre 1.8 y 2. Si en algún caso fue inferior, se fenolizó la muestra de nuevo para asegurar que no hubiese contaminación con proteínas.

En todos los casos 2 µg ARN se cargaron en geles de agarosa al 1% en tampón MOPS 1x (MOPS 0.1M, pH 7.0) tras incubarlas 15 min. a 65°C en tampón desnaturante (formamida 50%, formaldehído 6% y tampón MOPS 1x) y pasarlas rápidamente a hielo, y añadirles tampón de carga (glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0.25% p/v, xilen cianol 0.25% p/v y 2 µg de bromuro de etidio). Las electroforesis se realizaron 70V durante 30 min. y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta para comprobar el buen estado del ARN antes de su uso.

Ensayo de protección frente a ribonucleasas (RPA)

-Síntesis de ribosondas (sondas ARN antisentido): El RPA se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por Sambrook y col. (207). Se clonaron los fragmentos génicos la citoquina TNF-α y del gen constitutivo L32, que se detallan en la *tabla 6* en el plásmido pPMG (BD, San Diego, CA, USA) (*figura 5*):

Molécula	nº de acceso	Posición	Tamaño Sonda sin proteger	Tamaño Sonda protegida
TNF-α	X66539	151 - 310	189pb	160pb
L32	X06483	33-144	141pb	112pb

Tabla 6. Secuencias génicas de las ribosondas de TNF-α y L32

Los plásmidos se linearizaron con EcoRI, se purificaron y se transcribieron *in vitro* con las ARN polimerasa de T7 con el fin de sintetizar las sondas de ARN antisentido de cadena sencilla (ribosondas). La transcripción se llevó a cabo con α³²P-UTP (3000Ci/mMol) para la obtención de ribosondas radiactivas. Las ribosondas se resuspendieron en tampón de hibridación HYBE (PIPES 40 mM, pH 6.4, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM y Formamida 50%) a una concentración de 3000 cpm/µL.

-Hibridación: se tomaron 20 µg de cada muestra de ARN que tras secarlos mediante centrifugación en vacío se resuspendieron en 8 µL de tampón HYBE. A cada muestra se le añadió 2 µL de la solución de ribosondas. Como control negativo de la técnica, uno de los tubos contenía 20 µg de ARNt de levadura. Tras desnaturar las muestras a 90°C 10 min., la hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 56°C (entre 12 y 16 h.).

-Digestión de los híbridos ARN:ARN: las muestras se dejaron enfriar y se procedió a la digestión de los híbridos con 100 μ L de una mezcla de RNasas (Tris 10 mM pH7.6, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, RNasa A 24 ng, RNasa T1 20 (60 U.) durante 45 min. a 30°C. Una vez digeridas, se les añadió proteinasa (1.2 μ L a 10 mg/mL) en SDS al 4% (p/v) (15,6 μ L) y 1.2 μ L de ARNt de levadura (2 mg/mL). Se realizó una incubación de 15 min. a 37°C y a continuación los fragmentos protegidos se purificaron por extracción con fenol/cloroformo/isoamílico y se precipitaron con 120 μ L de acetato amónico 4 M y 650 μ L de etanol. Las muestras se lavaron con etanol al 80%, se secaron y se resuspendieron en 4 μ L tampón de carga. A continuación las muestras se analizaron en un gel de secuenciación al 5% acrilamida/urea 8,3 M. Los geles se secaron en vacío a 80°C durante dos horas y se expusieron en placas durante una semana.

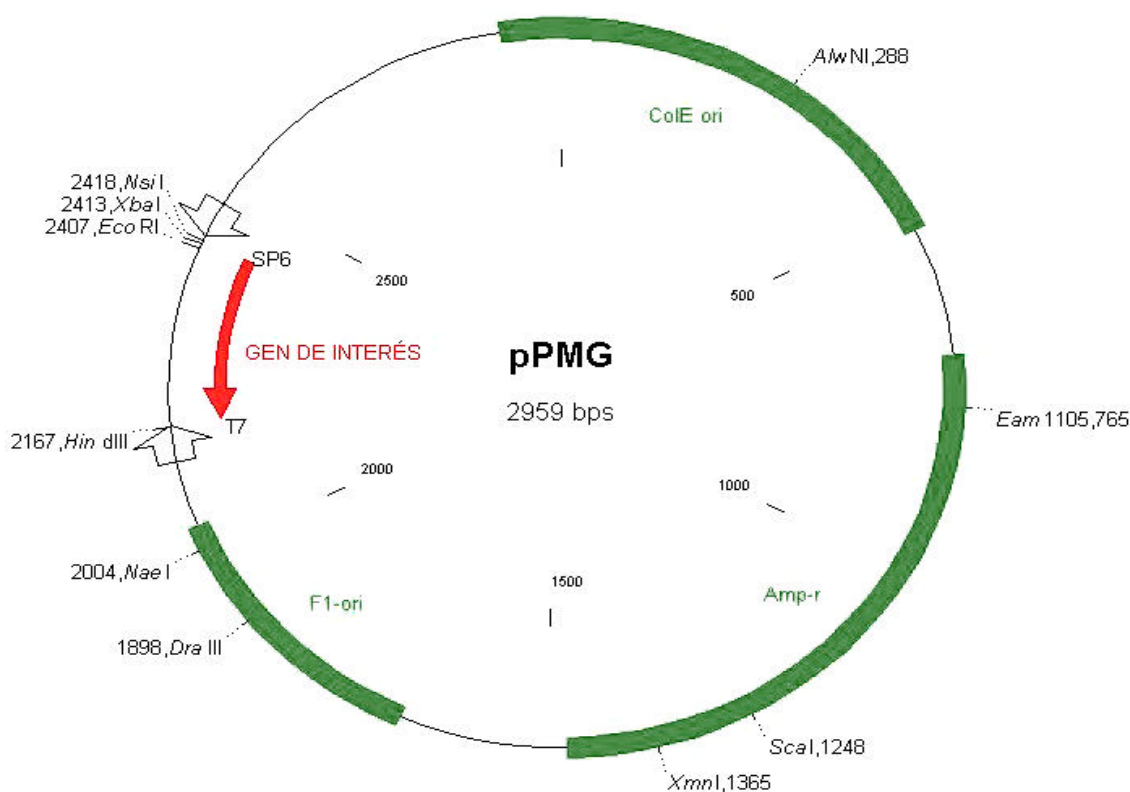


Figura 5. Plásmido circular pPMG

-Cuantificación de la proporción relativa de cada molécula: la intensidad de las bandas obtenidas en el gel de secuenciación, se analizó con un *Phosphor-Imager* (Storm 840 Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) y la cuantificación de cada una ellas se llevó a cabo usando el programa *ImageQuant* (Molecular Dynamics, Eugene, OR, USA). Los resultados obtenidos se normalizaron respecto al gen constitutivo L32 en cada caso.

5.3.2. ESTUDIO DE MCP-1 EN PARÉNQUIMA RENAL MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para lo cual se realizó una inmunohistoquímica en criocortes de tejido renal de 5 μm en los grupos I, II, III, y IV (n=8/ grupo) usando la técnica descrita en el epígrafe 5.2.2, (pág. 48) utilizando el antisuero policlonal de conejo que reconoce la molécula MCP1 murina (descrito en el apartado de Anticuerpos monoclonales, epígrafe 2.1.) a una dilución 1/75.

5.3.3. ESTUDIO DE iNOS EN PARÉNQUIMA RENAL MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

Al igual que para MCP-1, se realizó una inmnohistoquímica de forma similar en los mismos grupos de animales, usando un Ac primario policlonal dirigido contra la enzima iNOS (dilución 1/500) (descrito en el apartado de *Anticuerpos policlonales*, epígrafe 2.2).

5.4. ESTUDIO DE VLA-4

5.4.1. ESTUDIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA EXPRESIÓN DE VLA-4

Los linfocitos esplénicos de ratas pertenecientes al grupo V y VI (experimento B) resuspendidos en RPMI 1640 se incubaron con concentraciones saturantes de los AcMos HP2/1, HP2/4, TA-2 (ver *tabla 5*, pág. 40) durante 10 min. a T° ambiente. Tras lavar las células para eliminar el exceso de Ac se incubaron con un segundo Ac 30 min. a 4°C en

oscuridad. El Ac secundario utilizado estaba conjugado con FITC e iba dirigido contra IgG de ratón. Las células se resuspendieron en un volumen de 300 μ l de PBS y se analizaron en un citómetro FACScan (Becton Dickinson). Se utilizó como control positivo de la técnica el Ac WT.1 (dirigido contra LFA-1a), y la aplicación directa del segundo Ac solamente como control negativo.

5.4.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE VLA-4 MEDIANTE ENSAYO DE ADHESIÓN A VCAM-1.

Los ensayos de adhesión se hicieron siguiendo el protocolo de Yáñez-Mó y col. (208) con pequeñas modificaciones. Los linfocitos esplénicos de rata se marcaron con la sonda fluorescente BCECF-AM (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) y a continuación, se incubaron durante 10 min. A T^o ambiente con fluido ascítico diluído 1/100 de los Ac HP2/4, WT.1 y se depositaron 2.5x10⁵ células por pocillo en placas de cultivo estériles de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plates Maxisorp; Nunc, Inc., Naperville, IL, USA). Estas placas habían sido tapizadas con 2.5 μ g/ml de VCAM-1-1-4D-Fc recombinante (209) a 4^oC toda la noche y bloqueadas posteriormente con PBS/BSA al 1% durante 1h. a 37^oC. antes de que se añadiesen los células. Tras incubar durante 20 min. a 37^o C en presencia de los AcsMo, y lavar las células no adheridas mediante inversión, los linfocitos se lisaron y la intensidad de fluorescencia fue cuantificada en un lector de fluorescencia de microplacas (Bio-tek FL500). Cada muestra se ensayó por triplicado.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los ELISAs, en el estudio de proteinuria y en el ensayo de adhesión se expresan como media \pm D.E. Las comparaciones entre grupos se realizaron usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0.05$ o altamente significativas si $p < 0.001$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO BIOQUÍMICO

1.1. NIVELES SÉRICOS DE AUTOANTICUERPOS

Los niveles de Acs séricos anti-MBG y anti-ADN se analizaron mediante ELISA y los resultados están expresados como porcentaje de unión positiva como se describe en el epígrafe 5.1.1. de *Material y Métodos*. Los valores hallados para ambos tipos de auto-Acs revelaron una cinética similar .

1.1.1. Acs. ANTI-MBG

En la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂ aparece una cinética creciente de los niveles séricos de Acs-anti-MBG a partir del día 8-9 de la enfermedad, que alcanza valores máximos entre los días 13-15. A partir de este momento, se produce un rápido aclaramiento sérico y, en la tercera semana, se recuperan los niveles basales.

En la *figura 7*, se muestra como las ratas inyectadas con HgCl₂ (grupo I) presentan la cinética característica de este modelo experimental, alcanzando aumento en los niveles séricos de Acs anti-MBG, detectados mediante ELISA, máximo entre los días 13-15 y a continuación decae hasta recuperar valores basales a día 21 .

Cuando se analizó la producción de Acs anti-MBG en los grupos tratados con el inmunosupresor se observaron, en el grupo II, o de prevención, niveles basales de síntesis de Acs similares a los hallados en las ratas sanas (grupo IV) y, por consiguiente, la ausencia de depósitos glomerulares. Sin embargo, cuando el MMF se administró a partir del día 9 (grupo III) el inmunosupresor no presentó efecto bloqueante en la producción de Acs anti-MBG, no encontrándose diferencias respecto a las ratas inyectadas con mercurio.

La inhibición que ejerce el MMF en la producción de Acs mostró ser dosis dependiente. Aunque 60 mg/Kg peso indujeron una reducción significativa en la síntesis de Acs-anti MBG a día 13, hasta que la dosis no se aumentó a 80 mg/Kg de peso, no se alcanzaron los niveles basales similares a los hallados en ratas sanas (*figura 6*).

1.1.2. Acs ANTI-ADN_{hs}

Los niveles séricos de Acs anti-ADN_{hs} de los animales que recibieron únicamente HgCl₂ mostraron una cinética similar a la hallada para los anti-MBG.

En la *figura 8* se puede observar que la ratas que recibieron el tratamiento preventivo con MMF (grupo II) mantuvieron la producción de Acs anti-ADN a niveles similares a los hallados en el grupo control (grupo IV), mientras que las ratas que recibieron el MMF a partir de la última inyección de mercurio, no sufrieron modificaciones significativas en la síntesis de estos auto-Acs respecto al grupo de mercurio (grupo I).

Por lo tanto, el MMF presentó efectos supresores sobre la síntesis de Acs anti-MBG y anti-ADN_{hs} en las ratas que recibieron el inmunosupresor de manera preventiva. No obstante, cuando el fármaco se administró tras haberse iniciado la producción de auto-Acs (día 9), ésta fue similar a la hallada en animales enfermos.

1.2. PROTEINURIA

Como se observa en la *figura 9* las ratas tratadas únicamente con HgCl₂ muestran la cinética de excreción de proteínas característica de este modelo. La proteinuria ocurrió en dos fases: la primera fase, corta, que ocurre inmediatamente tras la primera inyección del mercurio, y que probablemente responde a la respuesta de las células epiteliales del túbulo renal ante del efecto tóxico del metal y, la segunda fase, que comienza entre los días 9 y 11 y presenta rango nefrótico entre los días 13-15, para posteriormente decaer de manera progresiva partir del día 16, hasta recuperar niveles cercanos a los basales llegando al día 21. Cuando los animales fueron tratados con MMF de forma preventiva (grupo II) no se observaron modificaciones en el pico inicial de proteinuria, pero se observó la ausencia de proteinuria de rango nefrótico durante el resto del tratamiento, manteniéndose siempre los valores de excreción proteica similares a los del grupo de ratas sanas (grupo IV). Sin embargo, cuando el inmunosupresor se administró después de haber inducido la enfermedad (grupo III), no se observaron cambios significativos al comparar este grupo con el de mercurio, evidenciándose una cinética de excreción de proteínas similar en ambos casos.

Por otro lado, al igual que para la síntesis de Acs, se pudo observar el efecto dosis-dependiente del MMF cuando se realizaron los experimentos preliminares para titular la dosis adecuada de inmunosupresor. Las ratas que recibieron 20 y 40 mg/Kg de MMF no mostraron cambios significativos en los niveles de proteinuria respecto a las ratas inyectadas con HgCl₂. A partir de 60 mg/Kg se empezó a apreciar una drástica reducción de la proteinuria que remitió a niveles basales cuando la dosis de MMF se aumentó a 80mg/Kg p.c. como se puede apreciar en la *figura 6*.

Por lo tanto, el MMF no presentó efectos sobre el pico tóxico inicial de proteinuria que acontece entre las 24-48h. tras la primera inyección de HgCl₂. No obstante, el tratamiento preventivo con MMF evitó la aparición de proteinuria de rango nefrótico a lo largo de todo el experimento. Por el contrario, cuando los animales eran tratados con el MMF una vez desencadenada la respuesta autoinmune, no se halló efecto protector alguno en el desarrollo de proteinuria.

1.3. EXCRECIÓN DE NITRITOS

En la *figura 10* se muestran las concentraciones de nitritos halladas en la orina de los animales (grupos I,II, III, IV) a lo largo del experimento. Las ratas inyectadas con mercurio presentan una cinética creciente de nitritos que alcanza valores máximos entre los días 13-15, y posteriormente descienden hasta que se recuperan valores próximos a los basales (día 21) mostrando una cinética similar a la hallada para la proteinuria y la producción de auto-Acs.

El tratamiento con MMF desde el inicio de la enfermedad, mantiene constantes los niveles de nitritos con valores similares a los hallados en el grupo de ratas sanas (grupo IV), mientras que la administración del inmunosupresor a modo de tratamiento (grupo III) induce una reducción notable en la presencia de estos compuestos nitrogenados en la orina, aunque sin llegar nunca a alcanzar los valores a niveles normales.

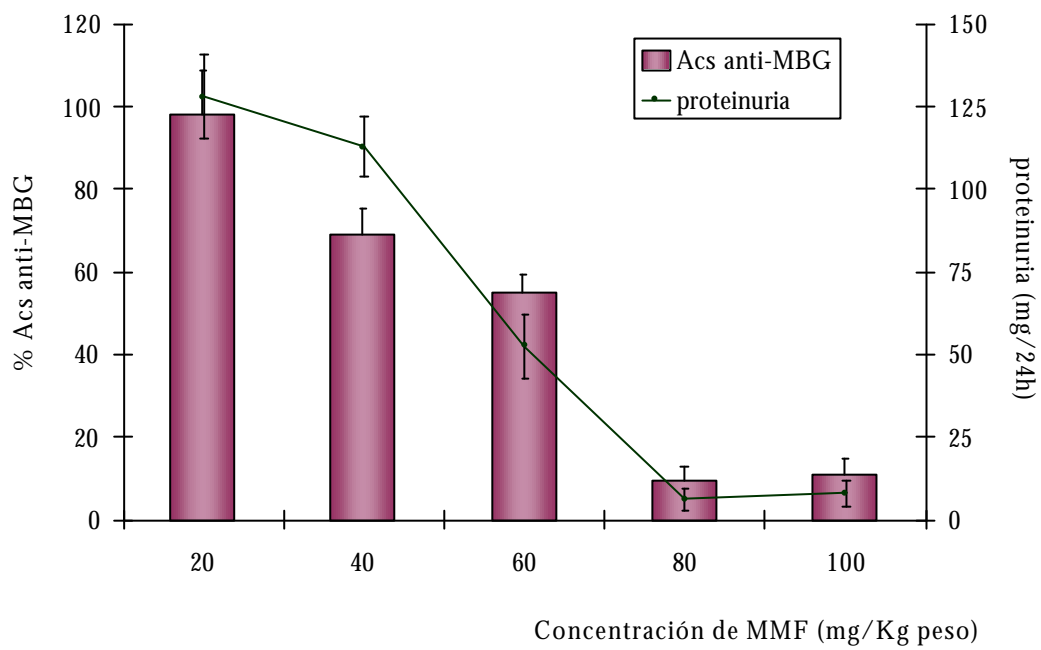


Figura 6: Efecto dosis-dependiente de MMF en los niveles séricos de Acs. Anti-MBG y la proteinuria. Los datos se expresan como media \pm d.e.

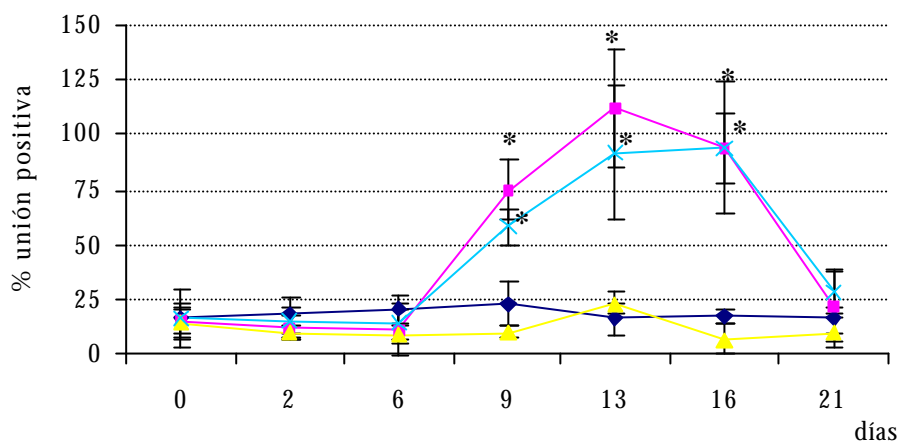


Fig 7: Niveles séricos de Acs anti-MBG. Cinética del porcentaje de adhesión de Acs anti-MBG. Los datos están expresados como media \pm d.e * $p \leq 0.001$ vs. Control.

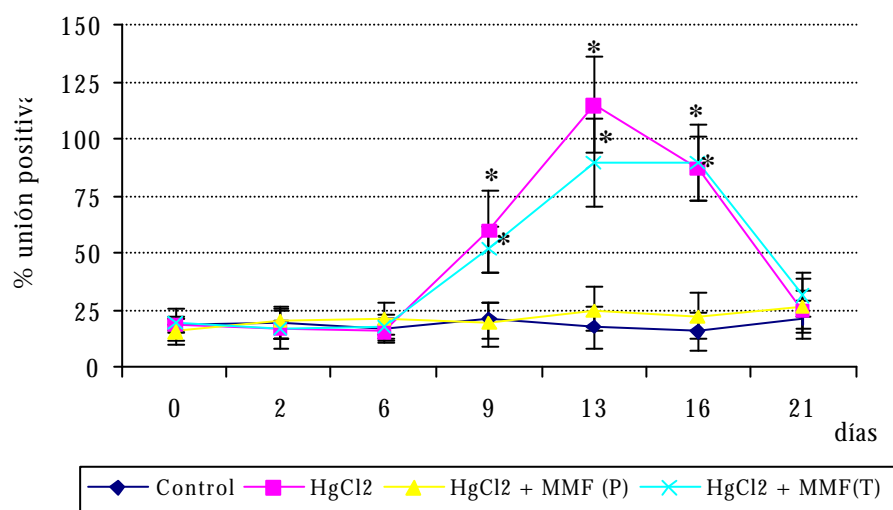


Figura 8: Niveles séricos de Acs anti-ADNhs. Cinética del porcentaje de adhesión de Acs anti-ADNhs. Los datos están expresados como media \pm d.e. * $p \leq 0.001$ vs. Control.

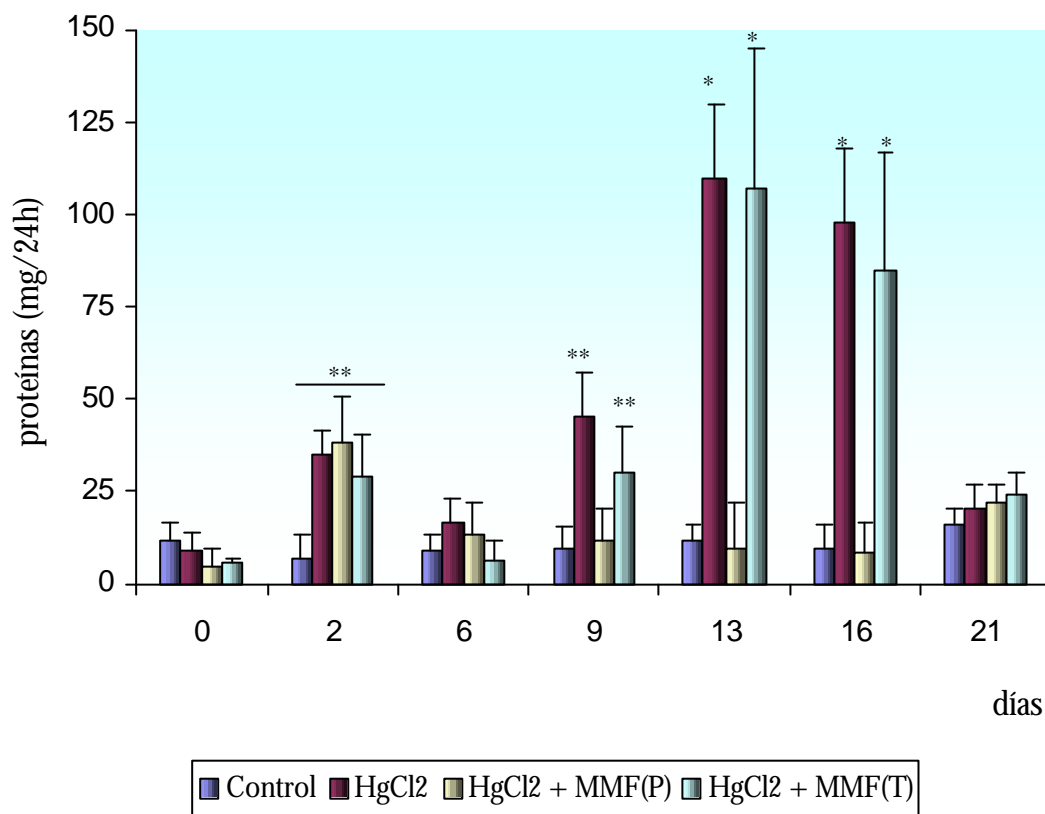


Figura 9: Cinética de la concentración de proteínas en orina. Los datos se muestran como media \pm d.e. *p \leq 0.001 y **p \leq 0.05 vs. Control

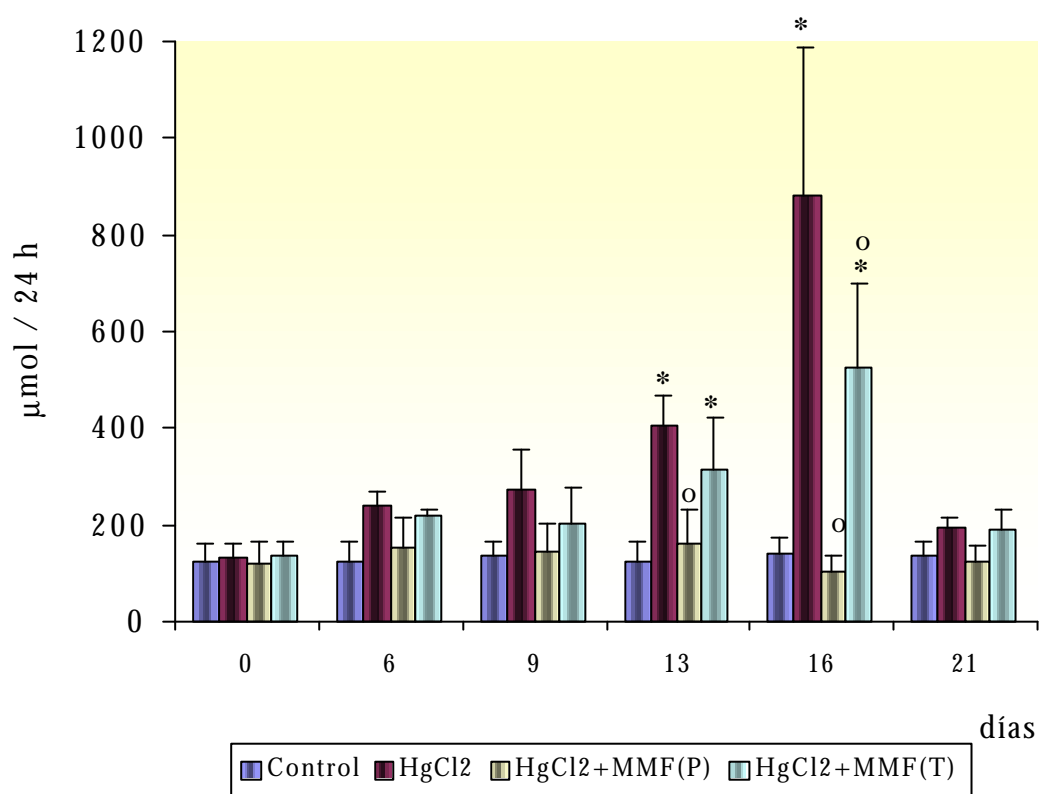


Figura 10: Cinética de excreción de nitritos en orina. Los datos se muestran como media \pm d.e. * $p \leq 0.001$ vs. Control y ^o $p \leq 0.001$ MMF(P) y MMF(T) vs. HgCl₂

2. ESTUDIO DE HISTOPATOLOGÍA RENAL

2.1. VALORACIÓN DEL INFILTRADO CELULAR

La valoración inicial de la presencia del infiltrado inflamatorio se realizó mediante examen por microscopía óptica del tejido renal procesado y teñido con HE o PAS, como se explica en la sección 5.2.1. de *Material y Métodos*.

La localización del infiltrado celular en ratas inyectadas con HgCl₂ a día 13, fue preferentemente de localización perivascular y periglomerular (*figura 11*). Además, fue frecuente observar acúmulos de células que invadían el intersticio renal. Los grupos que recibieron MMF (grupo II y III) mostraron la ausencia del infiltrado celular como se muestra en la *figura 11*.

2.2. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS INFILTRANTES

Para caracterizar el infiltrado inflamatorio renal, se realizó un marcaje mediante inmunohistoquímica con el AcMo panleucocitario OX1 (anti-CD45). Dicho marcaje, como se puede observar en la *figura 12*, reveló la positividad para este marcador de las células infiltrantes en las ratas tratadas con mercurio a día 13, y la casi total ausencia de positividad en ambos grupos de tratamiento con MMF, así como en animales sanos (*figura 12*).

Además, la inmunotinción permitió cuantificar el infiltrado celular que se detalla en la *tabla 7*. El recuento se hizo los días 13, cuando está descrito que la infiltración de células al intersticio renal es máxima, y a día 23 cuando infiltrado inflamatorio ya ha comenzado a remitir. Los grupos que recibieron el inmunosupresor MMF (grupos II y III) presentaron un recuento de células infiltrantes similar al encontrado en el grupo de ratas sanas (grupo IV), mientras que en el grupo de ratas enfermas se pudo constatar la presencia de un numeroso componente inflamatorio celular típico de este modelo experimental.

Grupo	Tratamiento	Día 13	Día 23
Grupo I n=8	HgCl ₂	45±7 *	19±5 *
Grupo II n=8	HgCl ₂ + MMF(P)	4.1±1.2 †	3.8±0.6 †
Grupo III n=8	HgCl ₂ +MMF(T)	3.7±0.8 †	2.9±0.2 †
Grupo IV n=8	H ₂ O ₈ +Vehículo	2.5±0.5	3±0.9

Tabla 7. Células OX1 positivas en tejido renal los resultados están expresados en forma de media ± d.e. *p<0.001 comparaciones entre grupos I, II y III vs. grupo IV ; †p<0.001 comparaciones entre grupos II y III vs grupo I

2.3. ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS GLOMERULARES DE IgG

Como se muestra en la *figura 13*, y de acuerdo con los resultados hallados en los niveles séricos de Acs anti-MBG, mientras que en las ratas inyectadas con HgCl₂ (grupo I) la IFD reveló la presencia de depósitos lineales de IgG en los glomérulos, en los animales que recibieron el inmunosupresor desde el inicio de la enfermedad (grupo II) dichos depósitos estaban ausentes.

Sin embargo, si el tratamiento se administraba una vez desencadenada la enfermedad (grupo III), los animales presentaban depósitos glomerulares similares a los hallados en el grupo de animales enfermos (grupo I).

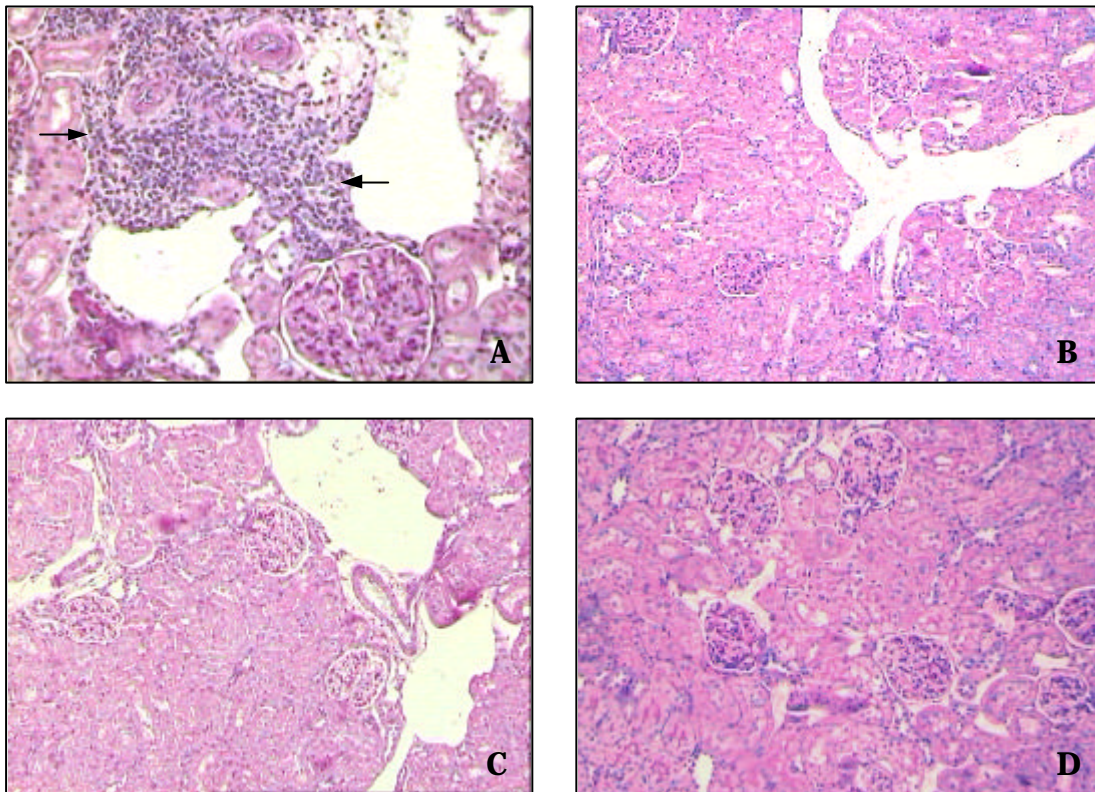


Figura 11: Estudio histológico renal (PAS). :**(A)** Tejido renal de ratas inyectadas con HgCl_2 en el que se observa un pronunciado infiltrado intersticial. **(B)** Ausencia de células infiltrantes en animales que reciben el tratamiento preventivo o **(C)** terapéutico con MMF. **(D)** Sección histológica renal procedente de animales sanos en la que no se observan infiltrados celulares.

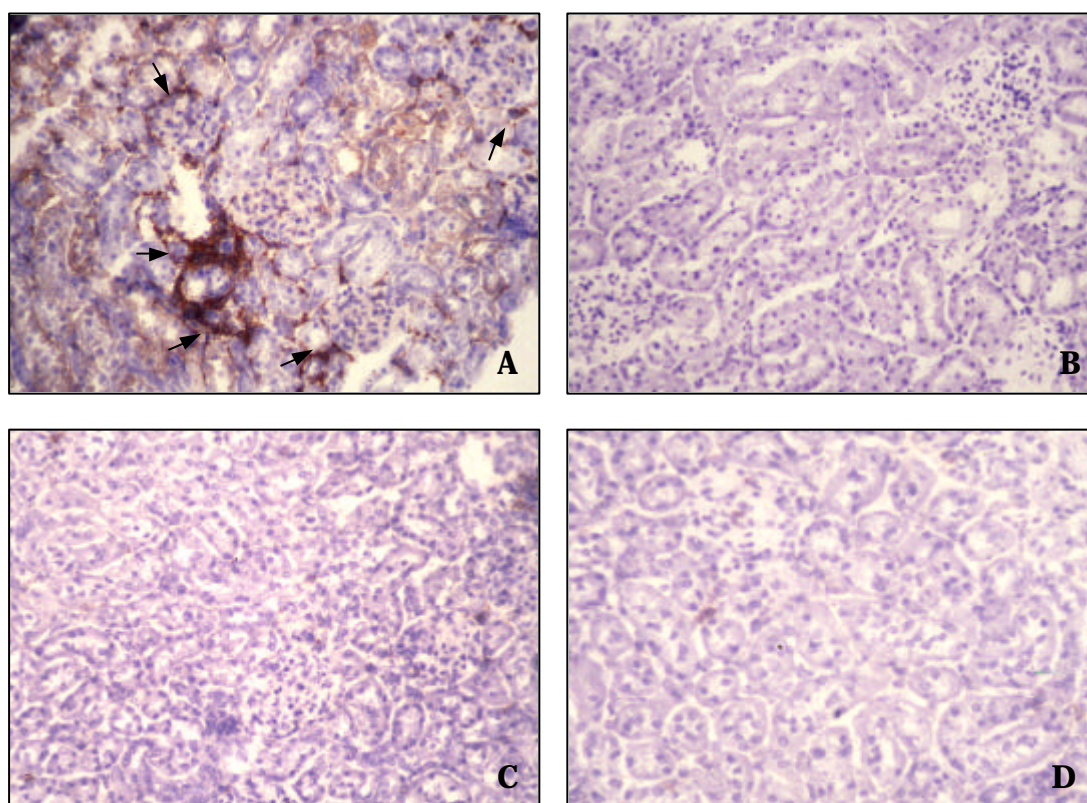


Figura 12: Inmunohistoquímica de CD45 (OX-1): (A) Infiltrado intersticial celular OX1+(anti-CD45, panleucocitario) en tejido renal de los animales inyectados con HgCl₂. (B) Prácticamente ausencia de células inflamatorias OX-1+ en los animales que reciben el tratamiento con MMF desde el día 0, (C) desde el día 9, (D) así como en animales sanos.

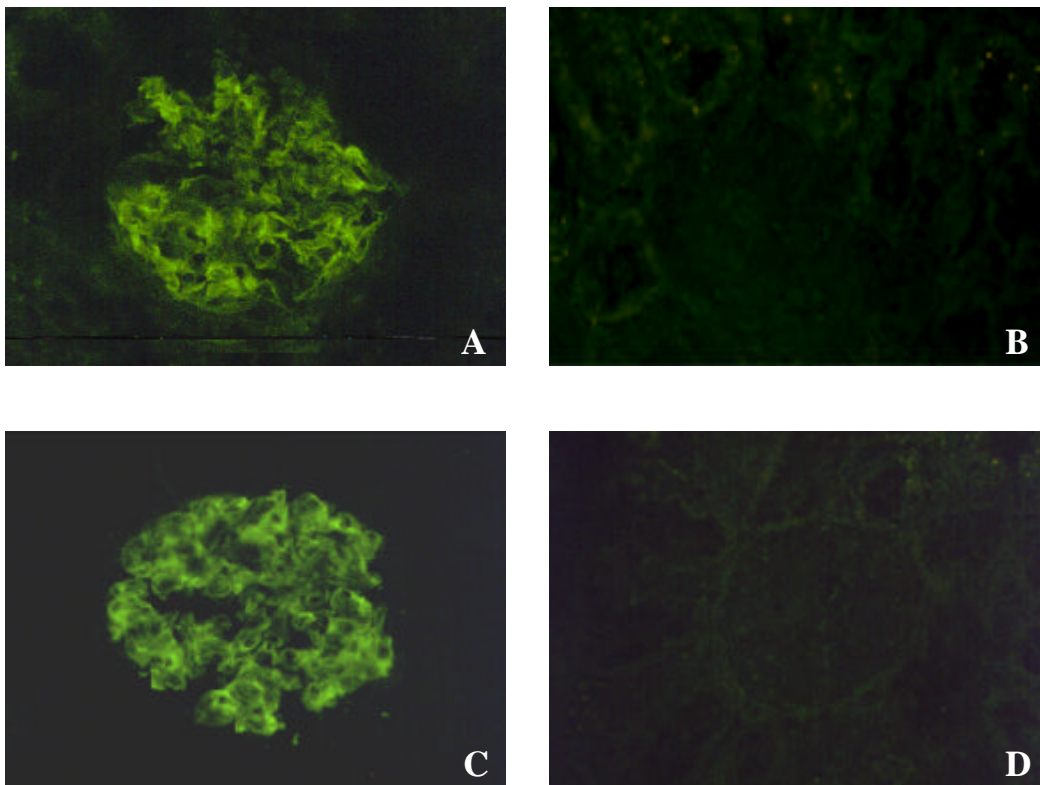


Figura 13: Depósitos glomerulares de IgG: (A) Patrón lineal de depósitos glomerulares de IgG en ratas tratadas únicamente con HgCl₂. (B) Ausencia de positividad en los animales que recibieron el tratamiento preventivo con MMF. (C) Depósito glomerular de intensidad similar a los hallados en el grupo de HgCl₂, en animales que recibieron el MMF a partir del día 9. (D) Tinción negativa presente en animales sanos.

3. ESTUDIO DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

3.1. TNF- α

3.1.1. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE TNF- α SÉRICO.

Puesto que ya se conocía la implicación de el TNF- α en esta nefritis experimental, se quiso determinar los posibles efectos del MMF sobre la concentración sérica de esta citoquina lo largo de la enfermedad. Los niveles de TNF- α sérico, elevados notablemente en ratas inyectadas con mercurio entre los días 9 y 15, sufrieron una drástica reducción en las ratas que recibieron MMF desde el inicio del experimento, y disminuyeron de forma significativa cuando el fármaco se administró una vez inducida la enfermedad, aunque sin llegar a alcanzar en ningún caso los niveles basales.

En la *figura 14* se puede observar la cinética de TNF- α sérico. Los animales que desarrollan libremente la enfermedad (grupo I) presentan un aumento significativo en los niveles de TNF- α sérico a partir de día 9 (*figura 14*) que alcanza su pico máximo a día 13 para posteriormente descender, hasta recuperar los valores basales. El tratamiento con MMF desde el inicio de la enfermedad mantuvo los niveles séricos de dicha citoquina inflamatoria próximos a los niveles basales durante todo el experimento. Una vez desencadenada la enfermedad, el tratamiento con el inmunosupresor (grupo III) indujo una reducción de los valores de TNF- α prácticamente a la mitad, al compararlos con el grupo que recibió únicamente el mercurio (* $p \leq 0.001$).

3.1.2. EXPRESIÓN RENAL DE TNF- α

Además de la concentración sérica de TNF- α , resultado de la síntesis sistémica de esta citoquina se valoró el efecto del MMF sobre la expresión de TNF- α de forma local en el riñón, para lo que se realizó un ensayo de protección frente a RNAsas (RPA) sobre el ARN total renal a día 13, día en el que la inflamación renal es máxima.

La valoración de la expresión renal de TNF- α , normalizada respecto al gen constitutivo L32, reveló que las ratas inyectadas con mercurio presentan a día 13 una expresión de esta citoquina proinflamatoria 7 veces aumentada respecto a las ratas del grupo control (IV). El tratamiento con MMF desde el inicio de la enfermedad (grupo II)

mantiene los niveles de expresión renal de TNF- α con valores similares a aquellos hallados en los riñones de ratas sanas ambos días (*figura 15*).

Cuando el MMF se administró una vez desencadenada la enfermedad, se observó que, aunque la expresión de TNF- α no remitió a niveles normales, sufrió una reducción cercana a 1/3 respecto a los valores hallados en el grupo de ratas enfermas, como se observa en la *figura 15*.

3.2. ESTUDIO DE MCP-1 EN EL PARÉNQUIMA RENAL

La quimioquina MCP-1 se valoró a las 24h. de la primera exposición HgCl₂, cuando se produce el daño tóxico directo del HgCl₂ sobre el riñón, y a día 13, cuando la inflamación renal es máxima. La inyección de HgCl₂ induce la síntesis temprana de esta quimioquina proinflamatoria (24-48h.), localizada en células de mesangio glomerular de forma segmental y difusa, y en los túbulos proximales fundamentalmente, como se muestra en las *figura 16 y 16b*. Posteriormente, los días 13-15, se incrementó la síntesis de esta quimioquina hallándose una tinción focal tubular, en células glomerulares y en alguna célula del infiltrado inflamatorio de forma aislada, preferentemente en aquellas que se hallaban cercanas al endotelio vascular (recientemente infiltradas) (*figura 17*).

Al estudiar los efectos del MMF sobre la expresión temprana de MCP-1 en parénquima renal, no pudimos evidenciar efectos moduladores en la síntesis de esta quimioquina, como se muestra en las *figuras 16 y 16b*, hallándose una inmunotinción similar en los animales que recibieron el inmunosupresor (una sola dosis) y en los animales únicamente inyectados con HgCl₂.

Sin embargo, cuando se analizó la presencia de MCP-1 a día 13, tanto los animales que recibieron el tratamiento preventivo con MMF como aquéllos a los que se les administró una vez desencadenada la enfermedad, revelaron una modulación a la baja en la síntesis de la quimioquina (*figura 18*). El índice glomerular de expresión de MCP-1 se calculó como se describe a continuación:

$$\text{Índice glomerular} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células positivas} / 2}{50 \text{ glomérulos}}$$

Se hizo un recuento de células positivas para MCP-1⁺ glomerulares en dos secciones renales de cada rata (n=8) de un total de 50 glomérulos por sección. Ambos tratamientos con MMF redujeron de forma significativa el índice de expresión glomerular (*tabla 8*). Además la tinción tubular fue prácticamente nula en el grupo de prevención (grupo II) y muy débil y ocasional en el grupo que recibió el tratamiento a partir del día 9, como se evidencia en la *figura 18*.

3.3. ESTUDIO DE iNOS EN PARÉNQUIMA RENAL

Se realizó mediante inmunohistoquímica la presencia en el parénquima renal de la enzima iNOS, responsable de la síntesis inducida de NO. La presencia de esta enzima los días 13-15 fue similar a la hallada para MCP-1 en ratas enfermas. Se observó una fuerte positividad en células glomerulares, por lo que se calculó también el índice de expresión glomerular, como se detalla en el epígrafe anterior, haciendo un recuento esta vez de las células positivas para iNOS (ver *tabla 8*).

Además, en los animales inyectados con HgCl₂ se halló una tinción más suave que la presente en células glomerulares, en algunas células tubulares, en células circulantes en contacto con el endotelio e iniciando la diapédesis, y, ocasionalmente, en células intersticiales aisladas. Las células mononucleares que infiltraban el riñón presentaron en su mayoría negatividad para la inmunotinción de iNOS (*figura 19*).

Grupo	Tratamiento	MCP-1+	iNOS+
Grupo I n=8	HgCl ₂	0.90±0.20*	0.98±0.13 *
Grupo II n=8	HgCl ₂ + MMF(P)	0.17±0.03 †	0.03±0.01†
Grupo III n=8	HgCl ₂ +MMF(T)	0.15±0.01 †	0.05±0.02 †
Grupo IV n=8	H ₂ O ₈ + Vehículo	0.16±0.03	0.04±0.03

Tabla 8. Índice glomerular de expresión de MCP-1 e iNOS

*p<0.001 Grupos I, II, y III vs Grupo IV; †p<0.001 Grupos II y III vs Grupo I.

Sin embargo, el estudio de las secciones renales los dos grupos de ratas que fueron tratadas con MMF mostraron prácticamente la ausencia de la enzima iNOS en todos los casos (*tabla 8 figura 20*). De forma esporádica, se halló positividad en alguna célula glomerular o una leve tinción tubular en las ratas que recibieron el inmunosupresor una vez iniciada la enfermedad (grupo III).

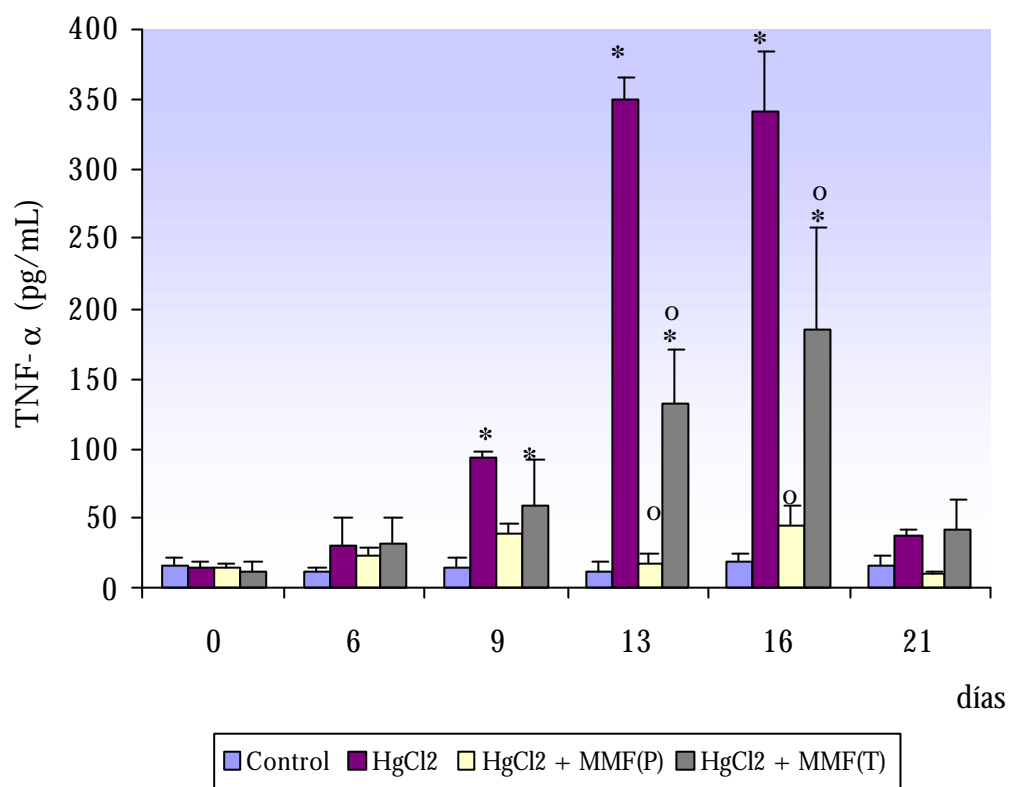


Figura 14: Niveles séricos de TNF- α . Los datos se muestran como media \pm d.e. * $p \leq 0.001$ vs. Control ° $p \leq 0.001$ MMF(P) y MMF(T) vs. HgCl₂

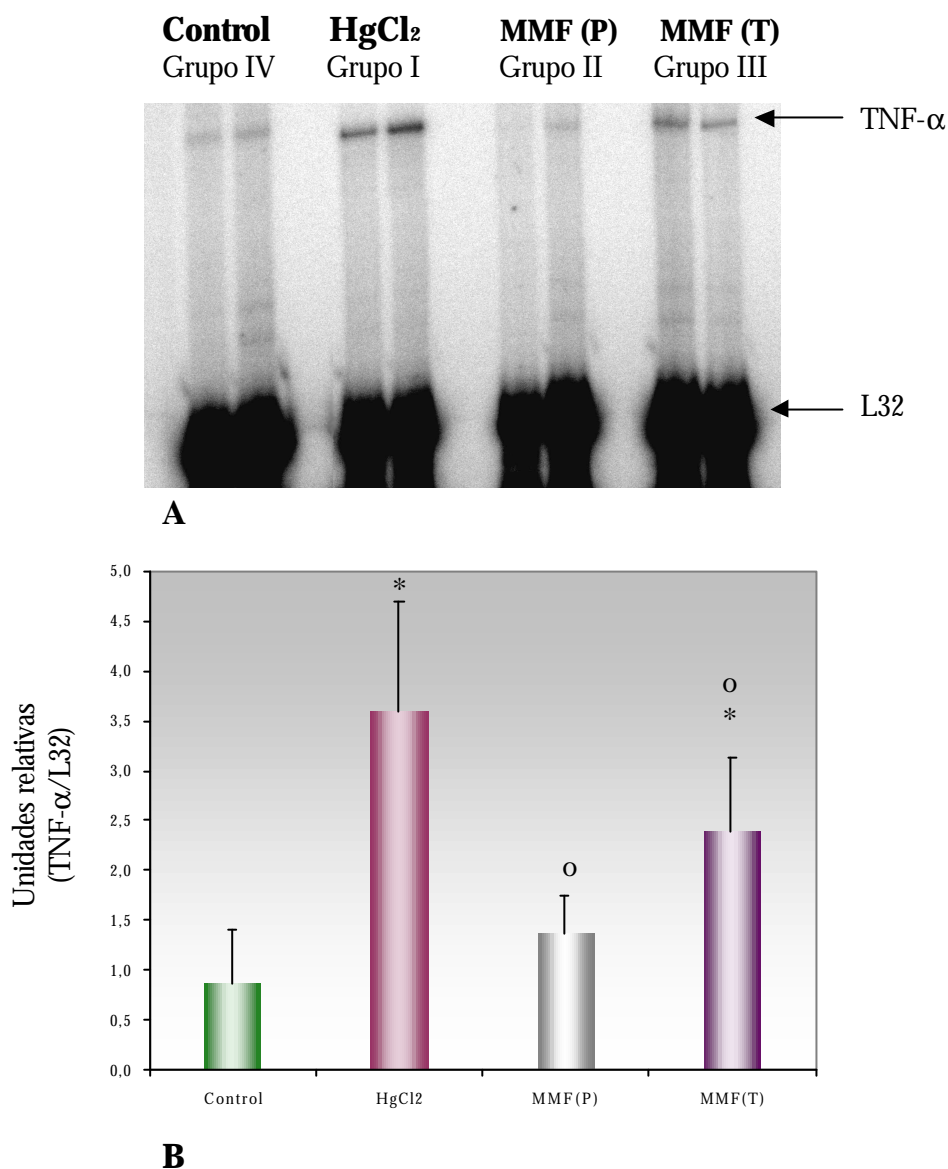


Figura 15. Expresión de TNF- α renal. Análisis del ARNm de TNF- α mediante RPA en tejido renal de n=8 ratas de los grupos I,II, III y IV (se muestran dos animales representativos de cada grupo) a día 13, cuando las lesiones renales son máximas. **A.** Gel representativo de RPA . **B.** Analisis densitométrico de la expresión renal de TNF- α a día 13 de la enfermedad. Los datos están normalizados frente a la expresión del gen constitutivo L32 y se expresan como media \pm d.e. *p \leq 0.001 vs. Control °p \leq 0.001 MMF(P) y MMF(T) vs. HgCl₂

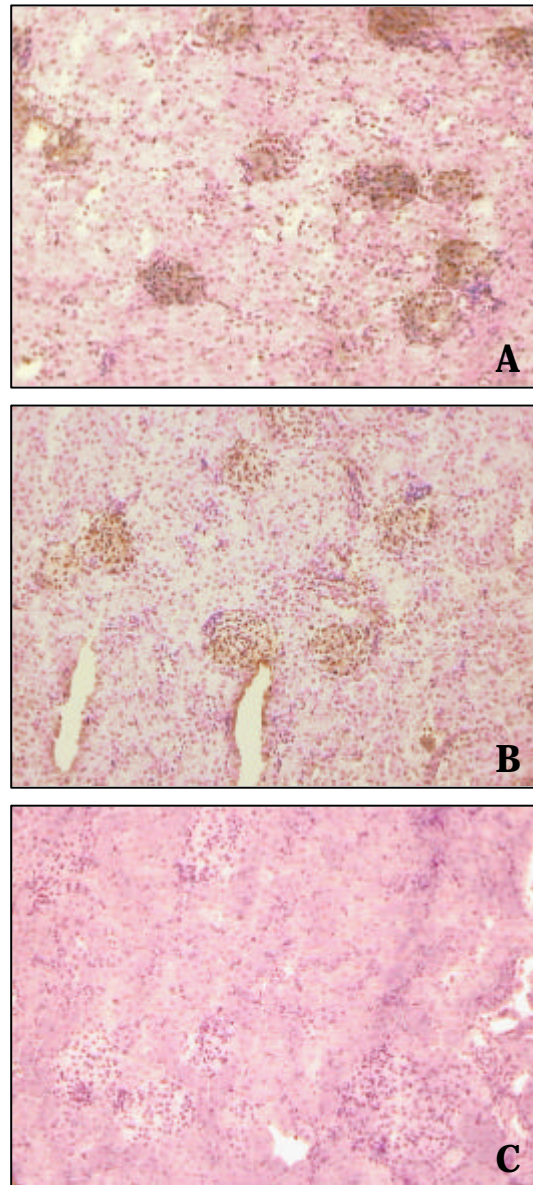


Figura 16 *Inmunohistoquímica de MCP-1 en parénquima renal* (24-48h)
Tinción positiva de la quimioquina MCP-1 en animales inyectados con HgCl_2 (**A**) y en animales que recibieron además MMF (**B**). Ausencia de marcaje en el grupo de animales control (**C**).

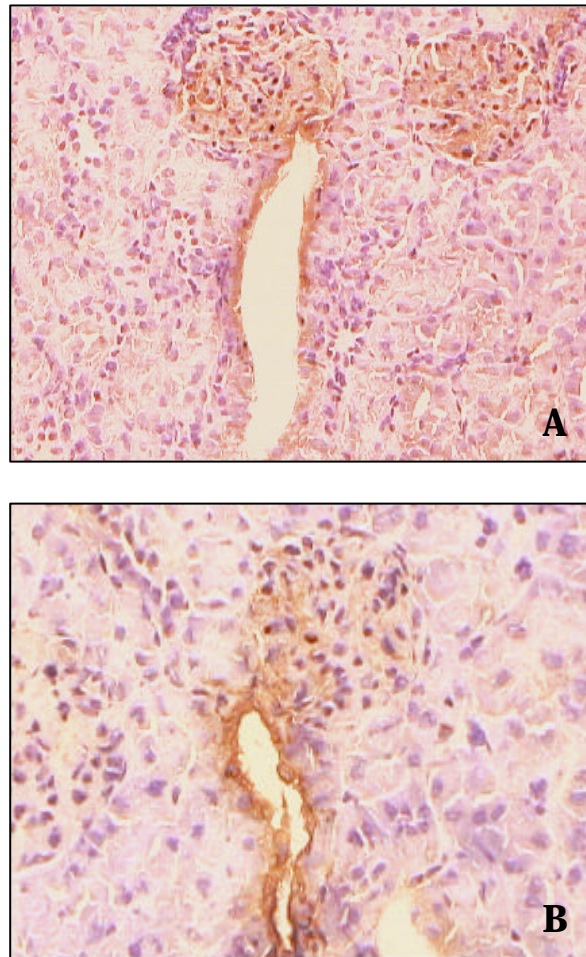


Figura 16b: Inmunohistoquímica de MCP-1 en parénquima renal (24-48h).
Detalle en el que se aprecia un marcaje glomerular y tubular similar en ratas del grupo de HgCl_2 (A) y en ratas que recibieron el tratamiento con MMF (B).

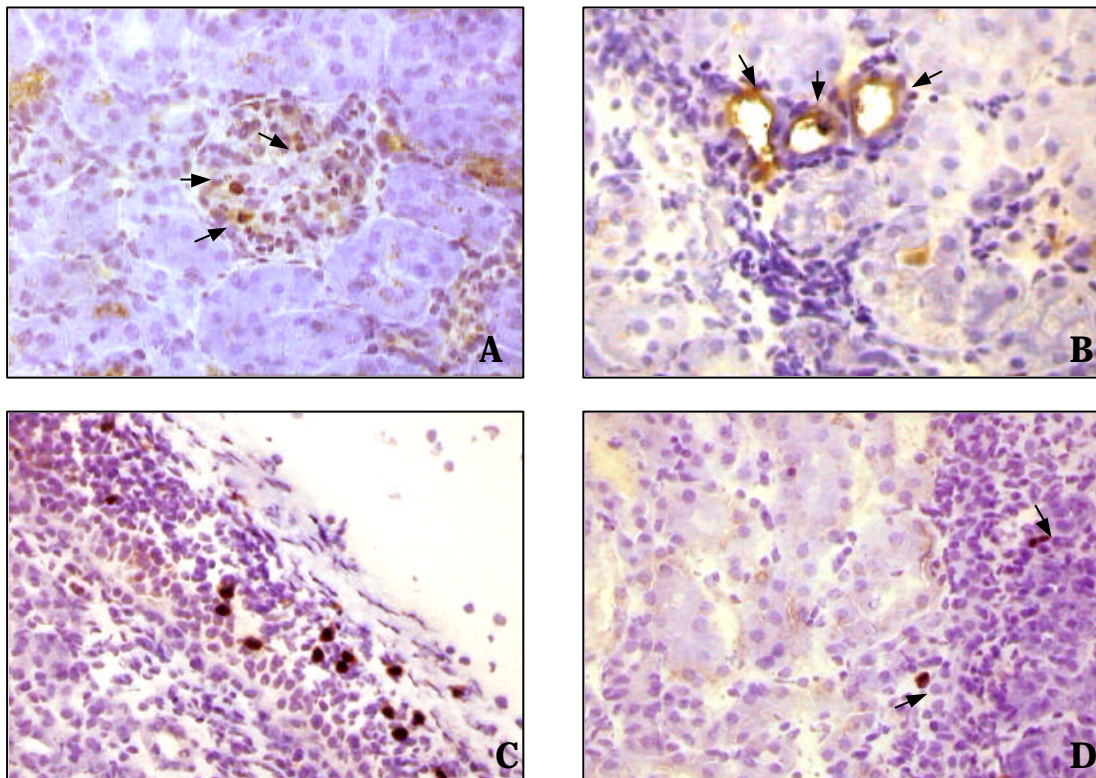


Figura 17 : Expresión de MCP-1 en parénquima renal día 13 en ratas con nefritis inducida por $HgCl_2$. Tinción positiva en células glomerulares (A), marcaje apical en túbulo (B), en células infiltrando el intersticio renal (C) y, ocasionalmente, en células que forman parte de este infiltrado inflamatorio (D).

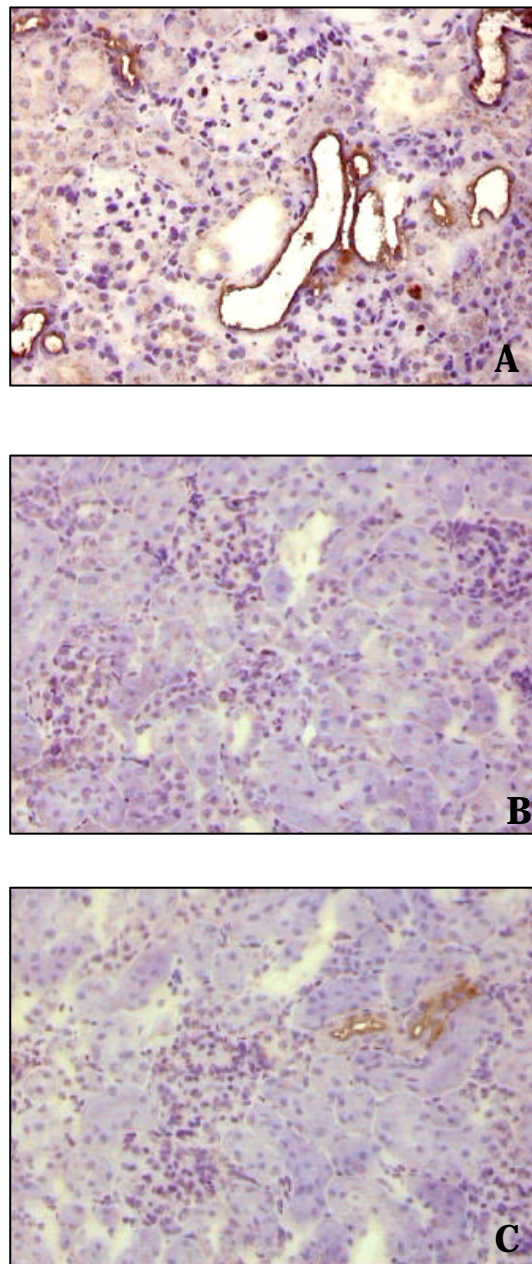


Figura 18: Inmunohistoquímica de MCP-1 en parénquima renal a día 13.

(A) Positividad tubular, y glomerular en animales inyectados con HgCl_2 , (B) Prácticamente ausencia de marcaje en los animales que recibieron el tratamiento preventivo con MMF, y (C) ocasional y leve tinción tubular en animales que fueron tratados con MMF a partir del día 9.

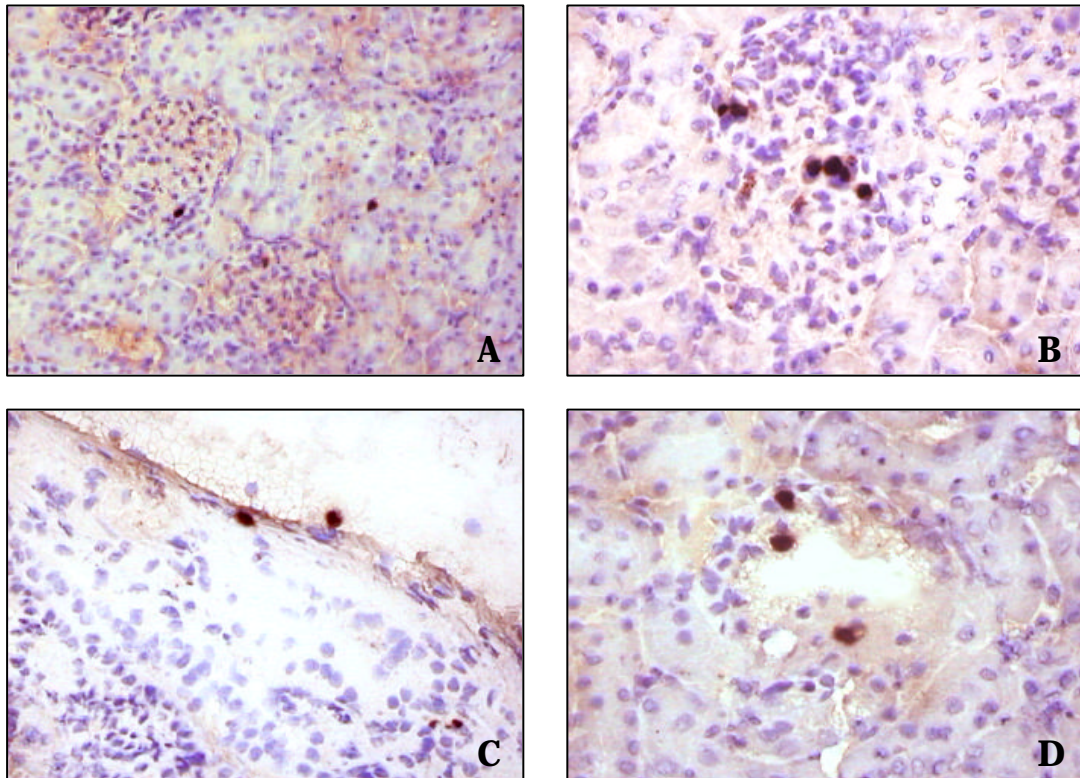


Figura 19 : Expresión renal de iNOS a día 13 en ratas con nefritis inducida por $HgCl_2$. Suave tinción citoplásmica tubular (A), intensa positividad en células glomerulares (B) así como en células circulantes en contacto con el endotelio y que inician la diapédesis al intersticio renal (C y D).

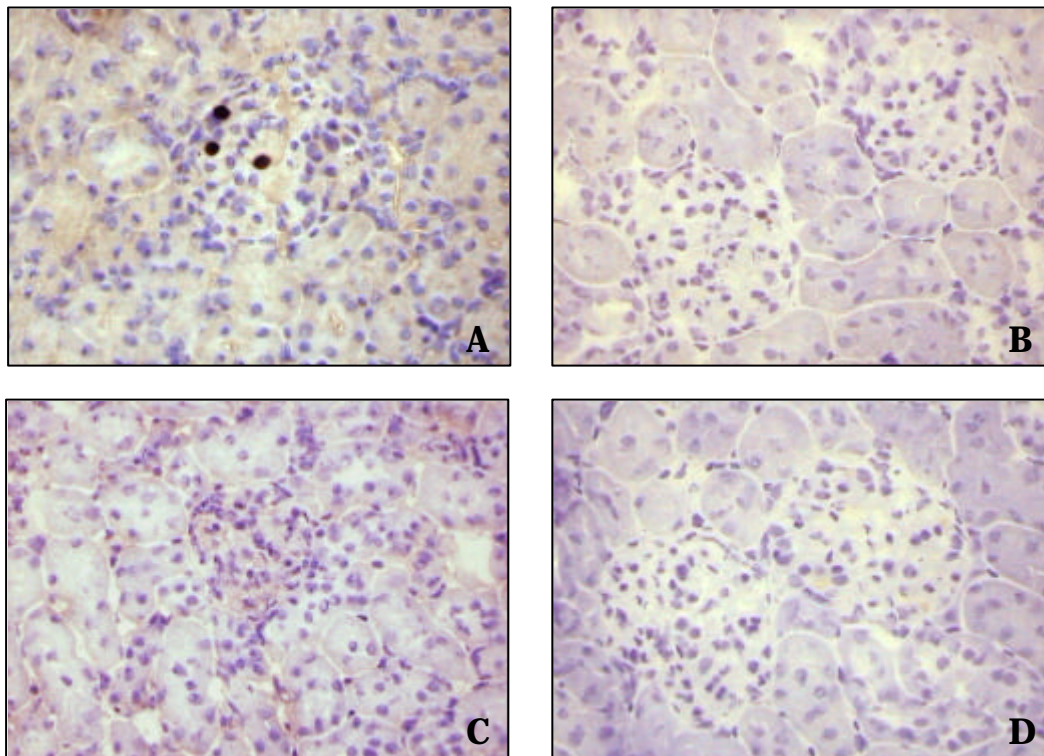


Figura 20: Inmunohistoquímica de iNOS a día 13. Fuerte positividad en células glomerulares de animales inyectados con HgCl_2 (A) ausencia de marcaje en animales que recibieron tratamiento preventivo con MMF (B), leve y ocasional tinción tubular con ausencia de marcaje en glomérulos de animales con tratamiento tardío con MMF (C). Negatividad en animales sanos (D).

4. ESTUDIO DE VLA-4

4.1. EXPRESIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 4$ EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Debido a la importancia que presenta la integrina VLA-4 en la inducción y desarrollo de esta enfermedad experimental, y con el fin de hallar si el MMF alteraba la expresión de esta molécula en los linfocitos de ratas, como se había observado previamente en humanos, se realizó un estudio por citometría de flujo usando tres Acs diferentes que reconocían esta molécula : HP2/1, HP2/4 y TA2 (ver *tabla 5*)

En la *figura 21*, se muestran los resultados de los análisis por citometría de flujo que se realizaron sobre linfocitos esplénicos y, como se puede observar, la expresión de la integrina no sufrió modificaciones significativas en su expresión inducidas por el MMF, exhibiendo un patrón de expresión similar al hallado en linfocitos normales.

4.2. ADHESIÓN DE LINFOCITOS A VCAM-1

Aunque la expresión de esta molécula no estuviese alterada, sí que podría estarlo su función por lo que se decidió estudiar la capacidad funcional de la molécula VLA-4 mediante ensayos de adhesión a su ligando VCAM-1 (unión mediada por dicha integrina). Los resultados del ensayo de adhesión, como se observa en la *figura 22*, pusieron de manifiesto que los linfocitos de ratas tratadas con MMF (grupo VI) exhibían una reducción en la adhesión basal a VCAM-1 del 30% respecto a los que procedían de ratas control (grupo V). Cuando se añadía el AcMo bloqueante de la adhesión linfocitaria HP2/4, la reducción aumentaba ligeramente, respecto a los linfocitos de ratas no tratadas.

Estos resultados estaban evidenciando que aunque el MMF no afectase a la expresión de VLA-4 en la membrana plasmática de los linfocitos sí que producía una alteración funcional en esta integrina que impedía la adecuada interacción con su ligando VCAM-1.

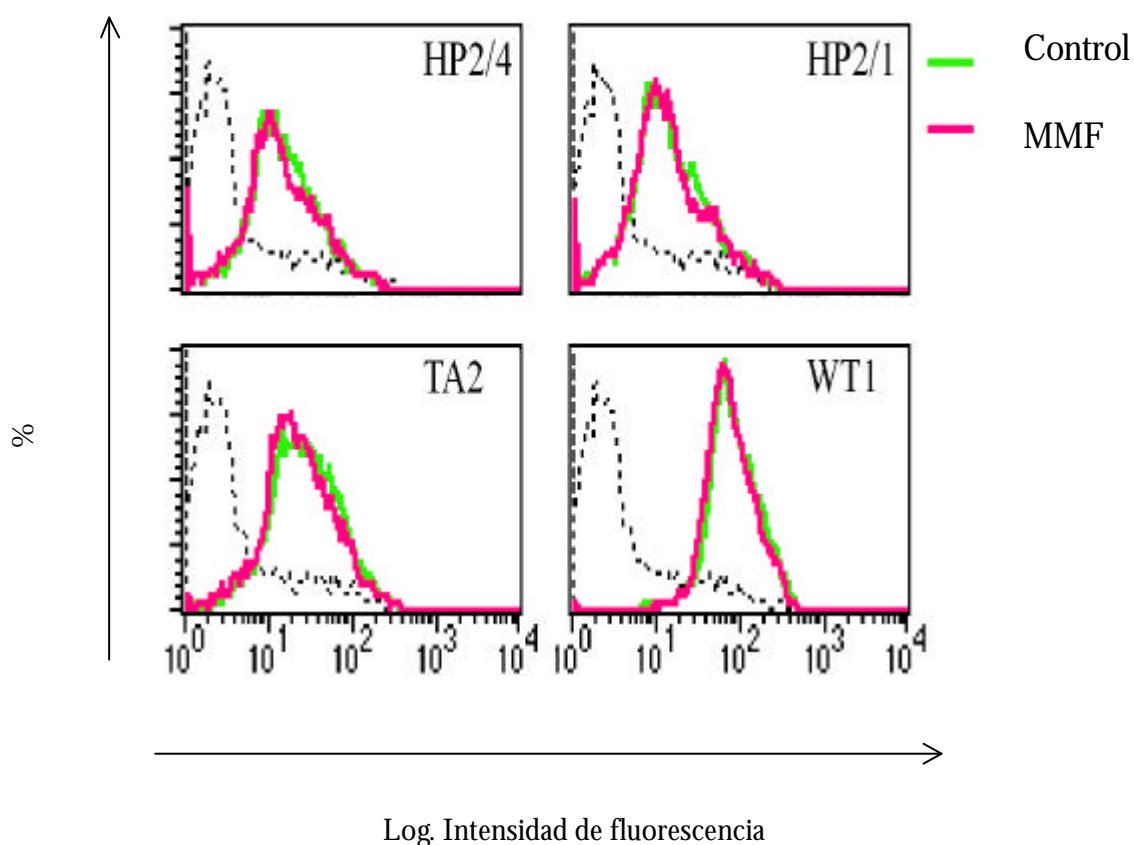


Figura 21: Expresión de VLA-4 sobre linfocitos esplénicos de rata.

Análisis de la expresión de la integrina VLA-4 en linfocitos esplénicos de ratas normales (Control marcado con la línea verde, y de ratas que recibieron MMF (MMF), marcado con la línea roja, con tres Acs distintos (HP2/4, HP2/1 y TA2) dirigidos contra la cadena α -4. WT1 (anti- LFA-1) se usó como control positivo de la técnica.

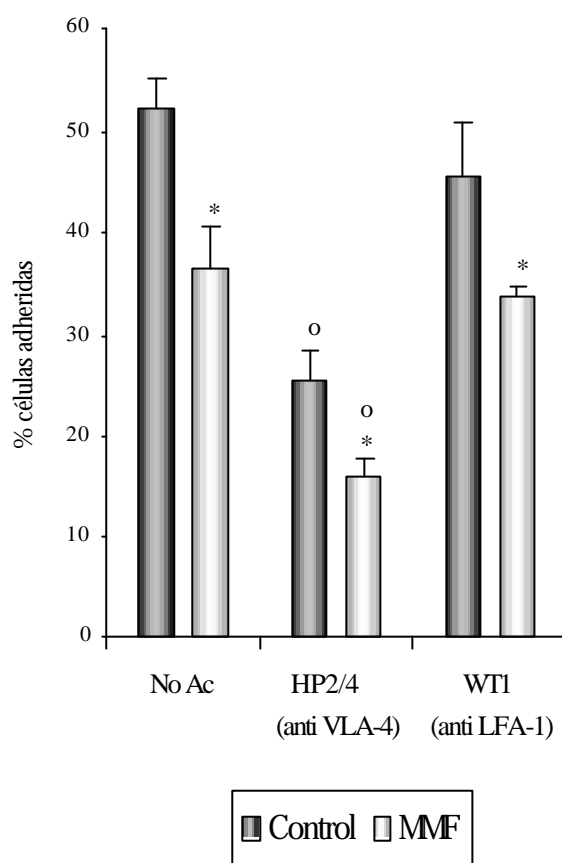


Figura 22 : Adhesión de linfocitos de rata a VCAM-1. % de de linfocitos esplénicos adheridos a la molécula recombinante VCAM-1 de ratas normales (Grupo VI) y ratas tratadas con MMF (grupo V). Los resultados están expresados como media \pm d.e. * $p < 0.001$ vs. Control $^{\circ}p < 0.001$ vs. No Ab.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El HgCl₂ induce en la rata BN una activación policlonal de células B dependiente de células Th2 autorreactivas que produce una nefritis autoinmune. Esta nefritis se caracteriza por la síntesis de Acs anti-ADN_{hs} y anti-MBG principalmente, y depósitos glomerulares de estos últimos acompañados por un infiltrado de células mononucleares y proteinuria de rango nefrótico (37, 49). Las lesiones renales en este modelo son máximas entre los días 13 y 15, tras los cuales se produce un aclaramiento de los auto-Acs séricos (26, 36, 37), con la disminución de los depósitos glomerulares, del infiltrado inflamatorio y de los niveles de proteinuria. A partir de la 3^a semana los animales se recuperan del daño renal (36).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el tratamiento preventivo con MMF inhibió la producción de Acs anti-ADN y anti-MBG evitando, de este modo, los depósitos glomerulares de estos últimos y el desarrollo de proteinuria. Además, el uso temprano del MMF bloqueó por completo la extravasación de células mononucleares al intersticio renal y mantuvo la síntesis de mediadores inflamatorios (TNF- α , MCP-1 y NO) a niveles próximos a los basales. Sin embargo, el uso tardío de dicho fármaco, una vez desarrollada la enfermedad, no tuvo efectos sobre la síntesis de auto-Acs, depósitos glomerulares ni proteinuria. No obstante, evitó la aparición del infiltrado inflamatorio intersticial y moduló a la baja la síntesis de los mediadores inflamatorios analizados.

En la nefritis autoinmune inducida por HgCl₂, además de la respuesta autoinmune que provoca el desarrollo de la enfermedad, se produce un daño tóxico agudo tras la primera dosis de mercurio como consecuencia del efecto directo de éste sobre las células renales (principalmente tubulares). Las lesiones tóxicas se manifiestan con la aparición temprana (24-48h.) de un pico transitorio de proteinuria. El tratamiento con MMF no inhibió el desarrollo de este pico tóxico inicial. Este hecho podría deberse a que la primera dosis de MMF se administró momentos previos a la administración de HgCl₂ por lo que, aun en el caso de tener algún tipo de efecto protector sobre las células tubulares (p.ej., modulando la síntesis de mediadores inflamatorios), no habría transcurrido tiempo suficiente para ejercer su acción si ésta dependiese de la depleción de GTP, como ocurre con la totalidad de los efectos del MMF descritos hasta el momento. Además, las células

tubulares serían menos sensibles que los linfocitos o los monocitos a la inhibición ejercida por el MMF, ya que, aunque tengan bloqueada la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanina, pueden sintetizar GMP a través de la ruta de recuperación (*salvage*). O puede que, sencillamente, el MMF sea incapaz de evitar las consecuencias de las lesiones inducidas directamente por el HgCl₂ sobre las células renales.

Cuando se observan las primeras consecuencias tóxicas de la administración de HgCl₂ (24-48h.), coincidiendo con el pico inicial de proteinuria, hallamos la presencia temprana de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 en células tubulares y de forma difusa en glomérulos. Esta quimioquina posiblemente esté siendo secretada en respuesta a las lesiones producidas por los cationes de Hg²⁺ sobre las células renales, en especial sobre las células epiteliales tubulares. MCP-1 es responsable del reclutamiento inicial de macrófagos y células T activadas a los focos inflamatorios (210-212) que, a menudo, son los responsables del daño tisular y, además, está implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como el LES (148, 149, 213), la artritis reumatoide (214), y en modelos experimentales como el lupus murino (146, 197) y la EAE (215).

Una posible vía para la inducción de MCP-1 en este modelo sería la propia acción de la proteinuria sobre las células tubulares. Se ha descrito que las células de epitelio tubular cuando se exponen a proteínas plasmáticas (en un sistema *in vitro* que mimetiza una situación de proteinuria) expresan grandes cantidades de MCP-1 (142). Por otro lado, la producción de ROS como consecuencia de la acción de los cationes de Hg²⁺ sobre las células renales (15) podrían ser otra fuente de estimulación de esta molécula quimiotáctica, bien directa o indirectamente, a través de la inducción previa de TNF- α . Además, los cationes de Hg²⁺ y el estrés oxidativo inducen también la activación del promotor de la IL-4 en mastocitos y linfocitos esplénicos tras una sola dosis de HgCl₂ en las ratas BN (53). Hasta el momento se ha observado que la IL-4 estimula y amplifica la expresión de la quimioquina MCP-1 en células endoteliales (216), por lo que no se podría descartar que otras células renales (p.ej., mesangiales, macrófagos residentes, epiteliales tubulares) expuestas al HgCl₂ expresen IL-4 que, a su vez, induciría la expresión de la quimioquina MCP-1.

El tratamiento con MMF, que como se comentó previamente no evitó la aparición de proteinuria, tampoco moduló la síntesis temprana de MCP-1, posiblemente por motivos similares a los ya comentados.

La presencia temprana de MCP-1 en el riñón podría ser clave en este modelo para el reclutamiento de los primeros monocitos que comienzan a infiltrar el riñón de manera temprana, en ausencia de depósitos inmunes, y del inicio de la respuesta autoinmune en esta enfermedad experimental. Habría que tener en cuenta el doble perfil de las lesiones renales: por un lado, tóxico, debido al efecto directo del HgCl_2 sobre el riñón y por otro, inmunológico, como consecuencia de la respuesta autoinmune. Lo más probable es que los dos mecanismos estén interactuando y el resultado que observamos sea consecuencia de ambos. Inicialmente, el daño tóxico sería el que produciría una activación local en el riñón, donde se reclutarían las primeras células inmunes (monocitos principalmente) que podrían iniciar la respuesta inmunológica que afecta al riñón.

Las lesiones renales importantes se producen posteriormente, después de la activación de clones autorreactivos y la síntesis y depósito de Acs-anti-MBG que conduce al desarrollo de la nefritis experimental a partir de los días 9-10. En este momento aparece la segunda fase de la proteinuria, que alcanza rango nefrótico los días 13-15, tras los cuales disminuye y retorna a niveles basales a partir de la tercera semana. En nuestro estudio hemos hallado que el tratamiento preventivo con MMF desde el inicio del experimento evita el desarrollo de proteinuria de rango nefrótico (días 13-15). Para ello, fue necesario alcanzar una dosis de MMF suficiente para inhibir la producción de Acs anti-MBG. Se observó entonces que, según se incrementaba la dosis de MMF y de forma paralela a la reducción en la síntesis de Acs, disminuían proporcionalmente los niveles de proteína en la orina.

En las enfermedades inmunológicas que afectan al riñón, los primeros abordajes que se realizaron para evitar el daño renal se centraban preferentemente en bloquear la producción de Acs ya que, a menudo, parecían ser los principales responsables de las lesiones tisulares renales. Para ello, se han utilizado frecuentemente inmunosupresores tales como la ciclosporina, el tacrolimus, y la ciclofosfamida, que aunque inicialmente muestran un efecto eficaz bloqueando la producción de Acs, a largo plazo presentaban graves efectos secundarios importantes (ver *tabla 3*).

En este trabajo hemos hallado que el uso de MMF en la nefritis inducida por mercurio, inhibe la respuesta primaria de síntesis de auto-Acs (anti-MBG y anti-ADNhs) de manera dosis-dependiente. Con las dosis iniciales de MMF (20-30mg/Kg peso) que se

administraron a ratas BN inyectadas con HgCl_2 , se producía una reducción del 40% en los niveles séricos de Acs anti-MBG y se hallaban niveles de proteinuria similares a los de las ratas enfermas. Sin embargo, a medida que se incrementaba la dosis del inmunosupresor, la supresión en la síntesis de Acs anti-MBG aumentaba, obteniendo un 90-95% de supresión con una dosis de 80 mg/Kg peso, lo que se correspondía con un drástico descenso de los niveles de proteinuria. Las ratas BN mostraron tolerancia a esta dosis de MMF, no observándose en ellas las alteraciones tóxicas gastrointestinales (gastritis y diarrea) que sí aparecieron cuando la dosis se aumentó hasta 100 mg/Kg de peso. Inicialmente se describió en la literatura que las ratas no toleraban dosis mayores de 30 mg/Kg (170, 217). En dichos estudios, se utilizaron ratas Sprague-Dawley, pero en las investigaciones que se realizaron con posterioridad en ratas Wistar (218) y LEW (219) se demostró que dosis de 60 mg/Kg eran bien toleradas y estaban aparentemente libres de efectos tóxicos secundarios. Los ratones sí que soportan dosis de incluso 100 mg/Kg (201), por lo que probablemente estas diferencias en la tolerancia al MMF puedan estar relacionadas con características metabólicas propias de la especie, o incluso de la cepa, lo que explicaría que las ratas BN toleren mayores concentraciones del fármaco que otras cepas de ratas estudiadas.

Mientras que los Acs anti-MBG parecen ser la causa fundamental del desarrollo de esta nefritis experimental, los Acs anti-ADN_{hs} no parecen tener una clara implicación patogénica. No obstante, su estudio podía proporcionarnos evidencias de si la supresión ejercida por el MMF incluía a ambos tipos de auto-Acs o se limitaba únicamente a los anti-MBG. Previamente se había observado en estudios realizados en nuestro laboratorio que la administración de Acs anti- $\alpha 4$ (HP2/1) suprimía la síntesis de Acs anti-MBG, pero no tenía efecto sobre los Acs anti-ADN, hecho que parecía estar sugiriendo distintas vías de síntesis para estos dos tipos de auto-Acs (dependiente e independiente de interacciones mediadas por la subunidad $\alpha 4$, respectivamente) (90). Sin embargo, el tratamiento preventivo con MMF también bloqueó por completo la producción de Acs anti-ADN cuando se administró desde el inicio de la enfermedad, al igual que ocurrió con los Acs anti-MBG.

Las primeras investigaciones que se realizaron sobre los efectos del MMF ya demostraron que este nuevo fármaco inhibía la formación de Acs de forma dosis-dependiente (166, 170) como hemos constatado en este estudio. La producción de Acs a partir de linfocitos B activados policlonalmente se inhibía por completo con una concentración 100 nM

de MPA (166). Además, dosis terapéuticas de MPA, eran capaces de inhibir la respuesta secundaria de Acs en células esplénicas humanas expuestas al toxoide tetánico *in vitro* (220). Sin embargo, *in vivo*, el MMF únicamente inhibía de manera eficiente las respuestas humorales primarias pero no así las secundarias (189, 221), hecho que se comentará más adelante.

Desconocemos la causa por la que en la rata BN son necesarias concentraciones mayores de MMF que en otras cepas para observar los mismos efectos y el por qué de su tolerancia a mayores dosis de inmunosupresor sin que manifieste síntomas de toxicidad. Aunque en nuestro estudio no mostramos evidencias experimentales directas que expliquen estos hechos, los datos presentes en la literatura sugieren que se pueden deber, al menos en parte, a diferencias en la farmacocinética del MMF. Recientemente se han realizado estudios comparativos entre distintas cepas de rata entre las que se hallaba la cepa BN, demostrando que existen diferencias en el balance energético (222) y distintos perfiles metabólicos (223) determinados por el genotipo específico de cada cepa.

Por otro lado, se ha observado que en ratones dosis de 80 mg/Kg inhibían la síntesis de Acs frente a la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. En estos animales el MMF reducía de forma significativa la síntesis de aquellos isotipos dependientes de IFN- γ (IgG2a, IgG2b, e IgG3) y producía una supresión menor en la respuesta de IgG1 dependiente de IL-4 (221). En la nefritis inducida por HgCl₂ en la rata BN, los Acs anti-MBG son en su mayoría de tipo IgG1 (224), por lo que estos datos podrían sugerir que la necesidad de dosis mayores de MMF para inhibir la producción de anti-MBG sea tal vez consecuencia de esta inhibición preferente del MMF sobre isotipos dependientes de IFN- γ (o tipo 1) que sobre isotipos dependientes de IL-4 (o tipo 2).

Consecuentemente con el bloqueo de la producción de Acs observada en los animales que recibieron de forma preventiva MMF se halló una ausencia de depósitos glomerulares de IgG. En la mayoría de las enfermedades inmunológicas renales, que se caracterizan en general por la aparición de depósitos inmunes en distintas localizaciones glomerulares, es frecuente la aparición de proteinuria. Los cambios que se producen en la permeabilidad selectiva glomerular, con la consiguiente aparición de proteinuria, son producto del daño producido en la pared capilar glomerular debido a la activación ejercida por los depósitos inmunes de varios sistemas mediadores de inflamación (225). El efecto directo de los Acs sobre la MBG puede aumentar la permeabilidad glomerular independientemente de la presencia de complemento y

células inflamatorias (226), lo que induciría una alteración en la MBG de la barrera de filtración como consecuencia de la interacción de los Acs depositados con ésta (225). La causa principal de la aparición de la proteinuria en la nefritis inducida por mercurio parece ser la presencia de depósitos glomerulares de IgG que alteran la barrera de filtración glomerular. Esta alteración consiste en la fusión de los podocitos a la MBG (91). Por lo tanto, la supresión de la síntesis y de los depósitos glomerulares de Acs en los animales tratados de forma preventiva con MMF, se corresponde con la ausencia de proteinuria, excepto en el caso del pico tóxico inicial, puesto que su aparición es independiente de mecanismos inmunológicos.

Usado de forma profiláctica, los efectos supresores que ejerce el MMF en la producción, depósito de Acs y aparición de proteinuria que hemos constatado en este estudio, también se han observado en otras nefritis experimentales. En la nefritis de Heymann el uso de MMF previo a la inducción de la enfermedad evita la producción de Acs con formación de complejos inmunes glomerulares, impidiendo así el desarrollo de proteinuria (187). Jonsson y col. (201) han descrito que en ratones lúpicos se produce también una drástica disminución en la síntesis de Acs (MRL/lpr) acompañada de la ausencia de depósitos glomerulares de IgG. Sorprendentemente, Van Bruggen y col. (227) no hallaron esta propiedad inmunomoduladora en la síntesis de Acs en este mismo modelo, aunque sí una ausencia de depósitos de IgG y complemento (C3). En ambos casos el tratamiento preventivo con MMF retrasó la aparición de la proteinuria.

En la nefritis inducida por mercurio en la rata BN aparece un infiltrado inflamatorio acompañando a los depósitos glomerulares. El infiltrado celular es máximo cuando la enfermedad se halla en su punto álgido (días 13-15), coincidiendo con el pico en la producción de auto-Acs y con los niveles más altos de proteinuria. No obstante, hasta la fecha, se desconoce si el infiltrado inflamatorio intersticial es o no consecuencia de las alteraciones producidas por la acción directa de los depósitos de Acs sobre la MBG.

En el reclutamiento de este infiltrado podría estar contribuyendo, además de los depósitos glomerulares de IgG, el infiltrado periglomerular de monocitos que aparece los días 5-6, cuando la respuesta inmunológica aun no se ha desencadenado y no existen depósitos glomerulares de Acs. Este infiltrado inicial amplificaría la síntesis de moléculas quimiotácticas, que se producen como consecuencia de las lesiones renales ejercidas por los depósitos de Acs, con el fin de atraer a los linfocitos y monocitos a los focos de daño .

Al analizar el tejido renal de las ratas que recibieron MMF desde el inicio de la enfermedad no se hallaron evidencias de este infiltrado intersticial. El MMF altera la transferencia de manosa y fructosa a las glicoproteínas, muchas de las cuales son moléculas de adhesión (167), por lo que el MMF podría estar impidiendo la extravasación de células mononucleares al riñón interfiriendo en la acción de las moléculas que median las interacciones entre leucocitos y células endoteliales y la diapédesis al intersticio renal. No obstante, en ausencia de depósitos glomerulares y proteinuria, sería más lógico pensar que la ausencia del infiltrado celular debe de ser secundaria a la ausencia de lesiones renales que presentan estos animales, como se discutirá más adelante.

La presencia de depósitos de IgG en ratas nefríticas, como se comentó anteriormente, induce la síntesis de un amplio panel de moléculas quimiotácticas a través de distintos mecanismos. Por ejemplo, la interacción de las regiones Fc de las Ig con sus correspondientes receptores (FcR) expresados en células renales residentes y fagocitos infiltrantes estimula la liberación de citoquinas y quimioquinas inflamatorias como IL-8, GM-CSF, MCP-1 y TNF- α . Las células mesangiales expresan estos receptores para el fragmento Fc de las Ig y su activación estimula la producción de MCP-1 y de otras quimiotácticas por mecanismos similares (228, 229).

Se ha descrito en multitud de ocasiones que la producción de mediadores inflamatorios, tanto por parte de células renales como de los linfocitos y monocitos que infiltran el riñón, puede contribuir de manera importante a la amplificación del daño renal (como resultado de la presencia prolongada del infiltrado celular) y al desarrollo de la proteinuria (134, 138, 197). El TNF- α es una de las citoquinas que se secretan inicialmente en los procesos de inflamación e induce la síntesis de múltiples mediadores inflamatorios, así como la expresión de moléculas de adhesión (121). En las células renales, el TNF- α estimula *in vitro* la producción de CC quimioquinas, principalmente de las quimioquinas proinflamatorias MCP-1 y RANTES (230, 231). En particular, la expresión de esta citoquina se sabe que es fundamental para las lesiones renales que se producen en la nefritis autoinmune inducida por mercurio, ya que su neutralización, aunque no tiene efectos sobre la producción de auto-Acs, evita la aparición de proteinuria aun en presencia de los depósitos glomerulares de IgG (129).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que mientras las ratas inyectadas con HgCl_2 sufren un aumento progresivo en la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ sérico, con una cinética similar a la hallada para la producción de Acs y a las lesiones renales (máximo entre los días 13-15), los animales que recibieron el tratamiento profiláctico con MMF mostraban concentraciones séricas normales de la citoquina en el suero a lo largo de todo el experimento. Además, el análisis de la expresión renal de esta citoquina a día 13, que se hallaba elevado en el grupo de ratas enfermas, se redujo en los animales que recibieron el MMF de forma preventiva hasta valores similares a los hallados en ratas sanas.

En este estudio se describe por primera vez la presencia de la quimioquina MCP-1 en riñones nefríticos de ratas tratadas con HgCl_2 en mesangio glomerular y células tubulares epiteliales a las 24h. tras la administración de la primera dosis, como ya se ha discutido, y a día 13, cuando son máximas las lesiones renales y el riñón presenta un infiltrado masivo de células mononucleares. Alguna de las células infiltrantes expresaba también esta quimioquina de forma aislada, pero la expresión de MCP-1 se hallaba principalmente localizada en las células propiamente renales.

Las ratas que recibieron el inmunosupresor mostraron una presencia glomerular casi nula, similar a la de las ratas sanas, y una débil y esporádica tinción tubular de esta quimioquina, posiblemente como resultado de la ausencia del infiltrado inflamatorio, cuyas células estarían induciendo la síntesis de MCP-1 en las células renales.

Por otra parte, el aumento en la producción de NO inducido por citoquinas como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, ha demostrado ser deletéreo en diversas alteraciones inflamatorias como ya se comentó en la *Introducción*. Una sobreproducción de NO puede dañar a las células a través de varios mecanismos. El NO reacciona con superóxidos para formar peroxinitritos, lo que produce radicales hidroxilos de forma espontánea que son muy perjudiciales para las células. Además, el NO y las especies reactivas pueden interaccionar con motivos metálicos de enzimas claves en el ciclo del ácido cítrico, de la respiración mitocondrial y en la síntesis de ADN (232). Se ha comprobado que los macrófagos de las ratas BN son únicos en cuanto a su capacidad para expresar altos niveles de la enzima iNOS (160). En los animales que recibieron únicamente el HgCl_2 se observó una cinética creciente en la excreción de nitritos coincidente con la hallada para las cinéticas de síntesis de Acs y de excreción de proteínas. El estudio de la expresión renal de la enzima iNOS

cuando el daño tisular es máximo reveló la presencia de esta enzima principalmente en células glomerulares, en menor medida en células tubulares y de forma esporádica en algunas células del infiltrado intersticial. El MMF, administrado desde el inicio de la enfermedad, inhibió la expresión de esta enzima en el tejido renal casi en su totalidad y mantuvo la excreción de nitritos en orina a concentraciones normales.

En un principio el análisis de la producción de nitritos en orina se valoraba como medida indirecta de la síntesis renal de NO, puesto que esta molécula es capaz de atravesar la barrera de filtración glomerular. Los estudios realizados sobre la producción de NO glomerular en modelos de nefritis inmunes mostraban un aumento en la excreción de nitritos coincidiendo con la producción glomerular *ex vivo* de estas moléculas como resultado de la interacción del NO con radicales libres de O₂. Sin embargo, estudios posteriores describieron que en situaciones de activación inmunológica sistémica, el aumento de la concentración de nitritos en orina era el resultado de la liberación sistémica de estas moléculas a la circulación. Este fenómeno estaría ocultando cualquier cambio en la concentración de nitritos en orina como consecuencia de la producción local de NO en glomérulos nefríticos. Incluso se comprobó que el aumento en la concentración de estos derivados del NO en orina estaba ligado a la activación antigénica (233).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, el aumento de los niveles de nitritos en orina que se produce en ratas inyectadas con HgCl₂ sería resultado del estado de activación del sistema inmunológico (desarrollo de la respuesta autoinmune) que enmascararía la producción renal de NO. En nuestro estudio, los niveles basales hallados para estas moléculas en las ratas que recibieron el tratamiento preventivo con MMF estaría indicándonos que la activación inmunológica no se ha producido e, incluso, que no existe un incremento en la síntesis renal de NO en estos animales.

Los datos hallados respecto a la reducción en la síntesis de mediadores inflamatorios en los animales que reciben MMF desde el inicio de la enfermedad parecen deberse una vez más a la ausencia de lesiones renales más que a un efecto directo del MMF sobre la síntesis de estas moléculas. El hecho de que durante los días 13-15 de la enfermedad, cuando el infiltrado inflamatorio renal es máximo, es cuando se observa una mayor presencia de estos mediadores sugiere que provengan en su mayoría de las células infiltrantes (linfocitos, macrófagos) y de las células tubulares y mesangiales activadas en

respuesta a las señales producidas por aquellas. Por lo tanto, la ausencia del infiltrado inflamatorio que se observa en las ratas que reciben el MMF contribuiría en gran medida a este hallazgo.

Los resultados obtenidos referentes al tratamiento preventivo con MMF parecen indicar que el MMF podría estar inhibiendo la respuesta inmune primaria, evitando la proliferación de clones autorreactivos y limitando así, en gran medida, las lesiones renales que quedarían restringidas a las meramente tóxicas, debidas a la interacción directa del mercurio con las células renales.

Una vez demostrado el efecto protector del MMF sobre la inducción y desarrollo de la nefritis autoinmune inducida por HgCl_2 , el siguiente paso en nuestro estudio fue analizar los posibles efectos terapéuticos de este fármaco cuando la respuesta autoinmune estuviera puesta en marcha. Para este fin, el inmunosupresor se administró a partir del día 9, cuando ya se han producido las interacciones celulares necesarias para organizar la respuesta inmunológica. En este momento de la enfermedad ya se hallan Acs anti-MBG en circulación y se detecta proteinuria.

El tratamiento de las ratas enfermas con MMF no tuvo efectos supresores sobre los niveles séricos de Acs (anti-MBG y anti-ADN_{hs}), incluso cuando se utilizó la dosis máxima tolerada. Como se expuso anteriormente, se ha demostrado en diversos estudios que el MMF inhibe la síntesis primaria de Acs. Sin embargo, este fármaco no parece presentar efectos supresores sobre la producción de Acs una vez que ha sido activada la célula B (189). Incluso, se ha descrito que la producción de Acs por parte de los linfocitos B de ratón frente a la HA del virus de la gripe sufre un ligero aumento cuando se administra el MMF con posterioridad al estímulo antigénico (221). La ausencia de propiedades supresoras una vez activada la respuesta inmune, tanto en la síntesis de auto-Acs como en los de depósitos glomerulares de IgG, y la proteinuria que hemos observado coincide con lo hallado en otras nefritis experimentales. En ratones a los que se les indujo el modelo de nefritis de Heymann (187), así como en ratones MRL/lpr (201, 227) y en ratones F1 NZB/W con nefritis lúpica establecida (219), el tratamiento con MMF no redujo la síntesis ni los depósitos glomerulares de Acs, ni presentó efectos beneficiosos sobre la proteinuria. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, Van Bruggen y col. durante el tratamiento preventivo con MMF observaron una ausencia de depósitos

glomerulares, aun manteniéndose elevados los niveles de auto-Acs séricos, lo que atribuyeron a un nuevo efecto del inmunosupresor. El MMF interferiría con factores que, normalmente, favorecen la localización de los complejos inmunes en la pared capilar glomerular e impediría el contacto entre estos y la MBG. Una posible alteración en la glicosilación de las proteínas de membrana podría inducir cambios en las características de la MBG, que impedirían estas interacciones (201, 227).

En estudios posteriores realizados en el mismo modelo experimental por otros grupos (201, 234) no se ha podido constatar de nuevo esta propiedad del MMF descrita por Van Bruggen y col. Nuestros resultados mostraron que las ratas enfermas tratadas con MMF presentaban depósitos glomerulares de IgG, y en consecuencia, una cinética de excreción de proteínas similar a la hallada en las ratas inyectadas con HgCl₂, por lo que, aun en el caso de que las mencionadas alteraciones en la MBG se hubieran producido, no estarían afectando a la interacción entre los Acs y la MBG. Sin embargo, sí que se observó en estos animales la casi total ausencia de células infiltrantes en el riñón, aun en presencia, en esta ocasión, de lesiones renales, como evidenciaban los depósitos glomerulares y la proteinuria detectada en estas ratas.

El análisis de los mediadores inflamatorios TNF- α , MCP-1 y NO mostró esta vez que, aunque reducidas significativamente respecto al grupo de ratas enfermas, la concentración de estas moléculas seguía siendo notablemente superior a la hallada en las ratas sanas o en las que recibieron el tratamiento preventivo. El impedimento de la extravasación leucocitaria producido por el MMF, estaría evitando la síntesis de moléculas proinflamatorias o de inductores de éstas procedentes de las células infiltrantes. Ésto se manifestaría en la disminución parcial de estos mediadores, puesto que las propias células renales seguirían sintetizándolos en respuesta al daño ejercido por los depósitos glomerulares y la proteinuria.

Hay que tener en cuenta que la proteinuria, una vez desarrollada, puede ejercer por sí misma efectos patológicos tales como un aumento en la captura de proteínas plasmáticas por las células epiteliales glomerulares, que podría inducir la producción de mediadores con efectos perjudiciales sobre los componentes celulares de la barrera de filtración (235). Como ya se mencionó con anterioridad, la proteinuria induce la expresión de la quimioquina MCP-1 en las células tubulares epiteliales renales (142). Por otro lado, los

fagocitos residentes al reconocer los depósitos de Acs a través de los receptores Fc de Ig pueden sintetizar TNF- α (228), que es uno de los principales inductores de moléculas inflamatorias tales como NO y MCP-1, y explicaría presencia de estas moléculas, en el tejido renal, aun en ausencia del infiltrado inflamatorio.

Las quimioquinas ejercen su acción a través de receptores transmembrana que se encuentran acoplados a proteínas G (132). El reclutamiento de leucocitos a lugares vascularizados en tejidos diana está vinculado a la activación de proteínas Gi (G inhibitorias) como consecuencia de la acción de las quimioquinas endoteliales sobre los leucocitos (239). En vista de esto, la limitación del GTP intracelular como consecuencia del tratamiento con MMF podría estar afectando a la actividad de las proteínas G y, consecuentemente, a la transducción de las señales inducidas por las quimioquinas, interfiriendo de esta manera en los procesos quimiotácticos que atraerían a los leucocitos al intersticio renal.

La expresión de TNF- α sérico se redujo a la mitad en las ratas enfermas que recibieron el tratamiento tardío con MMF y la expresión renal de esta citoquina en parénquima renal también sufrió una reducción próxima a un 1/3 respecto a la hallada en las ratas que recibieron únicamente mercurio. De nuevo, la ausencia del infiltrado celular en el parénquima renal podría ser responsable de esta reducción en la expresión renal de TNF- α . No obstante, se ha descrito que el MMF puede modular a la baja la expresión de TNF- α *in vivo* en la endotoxemia murina, por lo que no se puede descartar que el MMF tenga algún efecto directo sobre la síntesis de esta citoquina en células sensibles, por ejemplo en los macrófagos residentes renales.

El MPA, metabolito activo del MMF, suprime la biosíntesis de NO inducida por citoquinas en células vasculares y endoteliales murinas (190). Nuestros resultados mostraron que la expresión de la enzima iNOS se halla prácticamente inhibida en el parénquima renal de las ratas de los grupos que recibieron MMF, lo que se traduce en una reducción de la síntesis de NO. El MMF, de esta manera, evitaría las lesiones oxidativas mediadas por esta molécula y la inducción de la síntesis de citoquinas como consecuencia de la aparición de radicales libres (p.ej., MCP-1).

Aunque se desconozcan aun los mecanismos precisos, la inhibición que ejerce el MMF sobre la iNOS renal *in vivo* se podría explicar de varias formas:

- i) por una disminución o inhibición de la síntesis del cofactor limitante de la enzima iNOS BH₄, que ha de ser sintetizado en el momento en el que se produce la inducción de la enzima, para lo cual se requiere GTP (154);
- ii) por una reducción o inhibición en la síntesis de citoquinas inductoras de la iNOS como sucede en este caso con el TNF- α , cuya presencia en tejido renal se halla notablemente disminuida. Esto puede suceder bien como resultado de la modulación directa del MMF sobre la expresión de dichas citoquinas, o bien de manera secundaria a otros efectos (p.ej., bloqueo de la extravasación leucocitaria);
- iii) por la protección frente a las lesiones renales (como suponemos que sucede con el tratamiento preventivo con MMF), en ausencia de las cuales, no se produciría la inducción de la iNOS.

Por otro lado, en las ratas que a partir del día 9 de la enfermedad recibieron el MMF se hallaron concentraciones de nitritos en orina que fueron notablemente superiores a los valores normales. Este hallazgo podría indicarnos la activación a la que sigue estando sometido el sistema inmunológico de estas ratas. Aun así, las concentraciones de nitritos halladas los días 13 y 15 en estos animales, en comparación con los animales a los que únicamente se les administró mercurio, fueron significativamente menores, lo que sugiere que la activación del sistema debería estar siendo suprimida parcialmente por el MMF.

En la nefritis lúpica que desarrollan los ratones MRL/lpr, de manera similar, se halló que el tratamiento con MMF reducía drásticamente la expresión de iNOS, así como la concentración de nitritos en orina, lo que se correlacionaba con una reducción en la glomerulosclerosis y una recuperación de la función renal (157). Durez y col. constataron esta propiedad anti-inflamatoria del MMF *in vivo* en la endotoxemia murina, dónde el MMF inhibió la liberación de NO estimulada por LPS (185). Los efectos beneficiosos que presenta el MMF frente a la inducción de daño isquémico se atribuyen también, en parte, a una disminución en la producción de NO renal.

No se sabe con certeza si el MMF modula de forma directa la expresión y síntesis de mediadores inflamatorios, excepto en el caso del NO (a través de la inhibición de la iNOS). Nadeau y col. observaron inicialmente que el MMF inhibía la producción de citoquinas tras el trasplante renal en ratas (236); en el modelo de nefritis de Heymann el MMF modula a la baja la expresión de citoquinas de tipo 2 (187); y en la endotoxemia murina reduce la síntesis de TNF- α e IFN- γ (185).

En este trabajo no se muestran evidencias experimentales directas que nos permitan afirmar este hecho, pero no se puede descartar que el MMF tenga acciones no descritas aun sobre las células renales. El GTP es un importante segundo mensajero celular que participa en muchas rutas de transducción de señal a través de proteínas G o pequeñas GTPasas y, posiblemente, la alteración en el metabolismo de este nucleótido tenga consecuencias en la célula que se desconozcan por el momento.

En las ratas que recibieron tratamiento con MMF desde el inicio de la enfermedad, la ausencia de células infiltrantes podría atribuirse a que el MMF impide el desarrollo de lesiones inmunológicas renales. Sin embargo, en los animales que reciben el tratamiento una vez puesta en marcha la enfermedad, esta ausencia de infiltrado podría deberse en parte a una reducción de las señales pro-inflamatorias y quimiotácticas que dificultarían la atracción de leucocitos al parénquima renal.

Además, es factible que el MMF, mediante una alteración en la ruta de adhesión VLA-4/VCAM-1, interfiera en la extravasación leucocitaria a los focos de inflamación. En linfocitos humanos, este fármaco inhibe la transferencia de fucosa y manosa a glicoproteínas, muchas de las cuales funcionan como moléculas de adhesión. Estudios de inmunoprecipitación mostraron que la molécula VLA-4 era una de las glicoproteínas afectadas por este fármaco. Por otro lado, cuando se trataban con MPA células endoteliales humanas activadas previamente con IL-1, disminuía la adhesión de los linfocitos a éstas y la adhesión se inhibía por completo cuando se administraba MPA a ambos tipos celulares. Este fenómeno fue atribuido a una posible reducción en los ligandos de las moléculas de adhesión en las células diana (167).

La interacción entre moléculas de adhesión y sus receptores es determinante, no sólo para la migración leucocitaria y la extravasación a los focos inflamatorios, sino que son

imprescindibles para el inicio y fases efectoras de la respuesta inmunológica. Las interacciones entre células presentadoras de antígeno y los linfocitos requieren de estas moléculas y sus receptores, y lo mismo se aplica para los linfocitos efectoras y sus células diana (237). Por lo tanto, el bloqueo de moléculas de adhesión no sólo tiene acciones anti-inflamatorias, sino que también puede inducir inmunosupresión.

Las uniones mediadas por integrinas son de gran importancia para muchos aspectos de la respuesta inmunológica, incluyendo: la coestimulación de los linfocitos T durante la presentación antigénica, la activación de la célula B y la producción de Acs, la extravasación y migración de leucocitos, la citotoxicidad mediada por células y la regulación de la supervivencia celular (88, 98). En particular, la interacción entre la integrina VLA-4 y su receptor VCAM-1 refuerza la adhesión inicial al endotelio mediada por selectinas (106). Esta ruta de adhesión junto con la de LFA-1/ICAM-1, participa en las interacciones entre linfocitos B y células dendríticas, de gran importancia para la localización y estimulación antigénica de las células B en los centros germinales de los tejidos linfoides (109).

Debido a que la vía de adhesión VLA-4/VCAM-1 participa en diversos procesos fisiológicos relevantes, es frecuente su implicación en distintas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Durante estos últimos años, se ha comprobado el efecto beneficioso de la terapia con AcMos dirigidos contra la subunidad $\alpha 4$ de la molécula VLA-4 en distintos estudios *in vivo*. Estos estudios han subrayado el importante papel que juega esta integrina en el desarrollo de varios modelos animales, tales como EAE (89), alergia respiratoria (113), nefritis nefrotóxica aguda murina (114), hipersensibilidad mediada por contacto dependiente de células T (238) y nefritis inducida por $HgCl_2$ (90) (115), entre otros.

En la nefritis autoinmune inducida por mercurio, como se comentó previamente en la introducción, se ha comprobado que la interacción entre linfocitos circulantes que expresan VLA-4 y células endoteliales es imprescindible para el desarrollo de esta enfermedad (90, 91, 115, 129). Así lo ha demostrado el uso terapéutico de los AcMos HP2/1 y HP2/4 (que reconocen el epítipo B1 y B2 de la cadena $\alpha 4$, respectivamente) en esta enfermedad experimental. Cuando se bloquea el epítipo B2 de la cadena $\alpha 4$ con el AcMo HP2/4, Ac que favorece la agregación homotípica de linfocitos, los efectos beneficiosos se limitan a evitar la extravasación linfocitaria al intersticio renal (115). Sin embargo, cuando se bloquea el epítipo B1 de la cadena $\alpha 4$ con el AcMo HP2/1 se evita la

síntesis de Acs anti-MBG y los depósitos glomerulares, así como el infiltrado renal y el desarrollo de proteinuria (90, 115). Estos hallazgos indican el papel dual, aunque independiente, de las integrinas $\alpha 4$ en la extravasación de leucocitos y en la producción de Acs anti-MBG en este modelo experimental, lo que sugiere la independencia en los mecanismos efectores de este modelo (115).

Un estudio reciente ha demostrado que, además, el HgCl_2 actúa como un potente activador de la adhesión de células T mediada por integrinas de forma independiente de antígeno, probablemente mediante la activación de rutas de transducción intracelular (116).

Teniendo en cuenta todos estos datos, decidimos analizar el efecto del MMF en la expresión y función de la molécula VLA-4 en linfocitos esplénicos de rata. Los resultados obtenidos mostraron que el MMF no modifica la expresión en membrana de la integrina VLA-4, testada con tres Acs distintos que reconocen esta molécula. Sin embargo, la función de adhesión a VCAM-1 se redujo de manera significativa en los linfocitos de los animales tratados con MMF.

Es posible que la alteración en la función de VLA-4 se deba a una glicosilación incorrecta, lo que impediría un contacto adecuado con su ligando VCAM-1 (95), que se manifestaría en la reducción en su afinidad por éste. Otro posible mecanismo que pueda estar afectando a la función adhesiva de VLA-4 podría ser un impedimento en el *clustering* (agrupamiento) de estas integrinas en las zonas de adhesión (169).

Las quimioquinas subendoteliales y apicales regulan la adhesión y la migración a través de barreras endoteliales, no sólo estimulando la detención mediada por las integrinas sobre sus ligandos en el endotelio, sino que, además, disparan de forma temprana la captura de los linfocitos en superficies que expresan VCAM-1 a través de VLA-4 mediante una modulación extremadamente rápida del agrupamiento de las integrinas en las zonas de contacto adhesivo (239). Este proceso depende de la reorganización del citoesqueleto, para lo que se requieren pequeñas GTPasas (239, 240). La depleción del GTP intracelular inducida por el MMF podría estar afectando a este proceso de polarización de las integrinas en sitios específicos de membrana plasmática, además de a la activación en respuesta a las quimioquinas como se mencionó anteriormente.

La expresión de VCAM- 1 se ha observado además de en células endoteliales, en células dendríticas de centros foliculares y áreas interfoliculares de nódulos linfáticos, en macrófagos de pulpa roja esplénica (241), en epitelio renal, en algunas células tubulares y en la cápsula glomerular (241, 242). Una alteración en la adhesividad de VLA-4 observada en linfocitos tratados con MMF, y tal vez, una posible reducción en la expresión de VCAM-1 inducida por el MMF, podría estar afectando a varios procesos que incluirían a:

- i) las interacciones entre linfocitos T y células dendríticas o macrófagos, interfiriendo así en la presentación antigénica y, por tanto, en el inicio de la respuesta inmunológica. Además, se ha descrito que el MMF induce alteraciones en la expresión de las moléculas coestimuladoras en células dendríticas, hecho que impediría una presentación antigénica adecuada a los linfocitos (196);
- ii) las interacciones homotípicas entre linfocitos necesarias para la amplificación y polarización de la respuesta inmune, así como a las heterotípicas (T-B) necesarias para la síntesis de Acs, en la que se halla implicada la cadena $\alpha 4$ de la molécula VLA-4 (93, 98);
- iii) la extravasación de linfocitos y monocitos al intersticio renal, y tal vez a su anclaje a determinadas localizaciones renales, que facilitaría la permanencia del infiltrado inflamatorio mientras el sistema está en estado de activación. Esto mantendría activadas a las integrinas e induciría la expresión de VCAM-1 en células que habitualmente no expresan este receptor (p.ej., células renales).

En resumen, la alteración ejercida por el MMF sobre la molécula VLA-4 en linfocitos de rata podría estar interfiriendo inicialmente en la organización de la respuesta autoinmune, interviniendo en los mecanismos de presentación antigénica y comunicación celular (expansión de la respuesta y producción de Acs) y, posteriormente, evitando la aparición y/o la permanencia del infiltrado renal de células mononucleares que requieren la vía de adhesión VLA-4/VCAM-1.

COMENTARIOS FINALES

Tomando en conjunto los resultados obtenidos del tratamiento preventivo y del tratamiento terapéutico con MMF en la nefritis inducida por HgCl₂ en la rata BN, se podría afirmar que:

- ✓ El MMF administrado desde el inicio de la enfermedad tiene un efecto profiláctico en el desarrollo de esta enfermedad autoinmune probablemente impidiendo la organización de la respuesta inmunológica. Esto podría hacerlo:
 - actuando en los primeros estadios de la respuesta inmunológica, tales como la coestimulación entre APC y linfocitos, mediante la alteración de las glicoproteínas (moléculas de adhesión, coestimuladores);
 - interviniendo en estadios posteriores inhibiendo la proliferación de los clones autorreactivos, evitando de esta forma la síntesis de Acs y, en última instancia, el desarrollo de la nefritis autoinmune y los fenómenos inflamatorios que la acompañan (aparición del infiltrado renal y síntesis de mediadores inflamatorios).

- ✓ El efecto de la administración de MMF una vez que se han dado los contactos celulares necesarios para iniciar la respuesta inmunológica y se ha iniciado la síntesis de auto-Acs, se restringe a sus propiedades anti-inflamatorias que se reflejan en el bloqueo de la extravasación leucocitaria y en la reducción de NO, TNF- α y MCP-1 en tejido renal.

Actualmente, el tratamiento de las enfermedades autoinmunes a menudo es empírico e insatisfactorio. En la mayoría de los casos se usan inmunosupresores de amplio espectro en una amplia variedad de desórdenes autoinmunes e inflamatorios severos. Además de los corticosteroides, es frecuente el uso de ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina y tacrolimus (162). Todos ellos entrañan los riesgos habituales de la inmunosupresión comentados en la introducción y resumidos en la *tabla 3*.

El MMF es un fármaco relativamente reciente y, además de los efectos beneficiosos que presenta en el trasplante de órganos, múltiples evidencias han demostrado que además es efectivo en diversas alteraciones inflamatorias y en el tratamiento de nefritis experimentales y humanas. Su especificidad y reversibilidad, junto con la baja toxicidad que presenta, lo colocan en el punto de mira para futuras terapias inmunosupresoras.

Hasta la fecha, una de las limitaciones para un uso extendido inmediato en nefrología es su alto coste, por lo que si se mantienen y amplían los resultados prometedores de este fármaco en otras alteraciones inmunológicas e inflamatorias, aparte de en el trasplante, la apertura del mercado para este inmunosupresor provocaría la disminución de su precio.

Aunque en la nefritis experimental que hemos estudiado el infiltrado inflamatorio no sea la principal causa de patogenicidad, las propiedades anti-inflamatorias del MMF halladas en este modelo posiblemente puedan extrapolarse a otras enfermedades renales o sistémicas en las que la respuesta inflamatoria sea un componente importante en la inducción y/o progresión del daño tisular.

Además de su uso como monoterapia, si fuese necesario podría utilizarse en terapia combinada. Las limitaciones que hemos hallado que presenta este fármaco suprimiendo la respuesta secundaria de Acs podrían solventarse mediante una terapia combinada con otros inmunosupresores que fuesen capaces de bloquear esta respuesta (p.ej., ciclosporina, tacrolimus, etc). Usando esta terapia combinada, la dosis necesaria de estos inmunosupresores se reduciría, lo que limitaría los efectos secundarios no deseables que entraña su uso.

Es posible que el MMF, además de sobre la respuesta inmunológica y el infiltrado renal, pueda ejercer efectos moduladores sobre la síntesis de mediadores inflamatorios en el riñón. Nuestro estudio no nos permite constatar este hecho, pero sería interesante realizar estudios que pudiesen aclarar esta cuestión.

Los resultados que hemos obtenido del tratamiento con MMF en este modelo experimental, en conjunto con los descritos previamente en la literatura, confirman la utilidad del MMF en el tratamiento de enfermedades renales asociadas con procesos

inflamatorios. Por lo tanto, sería deseable la realización de más investigaciones en torno a este fármaco que permitan seguir descifrando sus mecanismos de acción, así como el desarrollo de ensayos experimentales y clínicos controlados usando el MMF como monoterapia o en terapia combinada que garanticen plenamente su eficacia e inocuidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El uso de MMF desde el inicio de la nefritis inducida por mercurio en la rata BN previene la inducción de esta enfermedad experimental, posiblemente impidiendo la activación inicial de la respuesta autoinmune, evitando la proliferación de los clones autorreactivos e impidiendo, de esta forma, la síntesis de auto-Acs.
2. La ausencia de proteinuria, infiltrados intersticiales y mediadores inflamatorios (TNF- α , MCP-1 y NO) en los animales que reciben el MMF de forma preventiva parece ser secundaria a la supresión de la producción de Acs anti-MBG y de los depósitos glomerulares, y no el resultado de un efecto directo del MMF sobre el parénquima renal.
3. La síntesis temprana (a las 24-48h. tras la primera inyección de HgCl₂) de la quimioquina MCP-1 en el tejido renal sugiere su posible implicación en el inicio de la respuesta autoinmune. La expresión de esta citoquina quimiotáctica promovería el reclutamiento inicial de células inmunes (monocitos, principalmente) al parénquima renal dañado como consecuencia del efecto tóxico directo del HgCl₂.
4. El MMF no tiene efectos beneficiosos sobre el daño tóxico ejercido por el HgCl₂, reflejado en el pico inicial de proteinuria y en la expresión de MCP-1 en túbulos y células glomerulares renales, ya que no presentan variaciones en los animales tratados con el inmunosupresor.
5. Una vez desencadenada la respuesta autoinmune, el tratamiento con MMF no es útil para suprimir la síntesis de auto-Acs, lo que pone de manifiesto que el MMF no tiene efectos supresores sobre la producción de Acs cuando las células B han sido previamente activadas.

6. El tratamiento terapéutico con MMF tiene efectos anti-inflamatorios en esta nefritis experimental, como demuestran la ausencia de células mononucleares en el intersticio renal (aun en presencia de los depósitos glomerulares) y la regulación a la baja de la síntesis de mediadores inflamatorios (TNF- α , MCP-1, NO) en el riñón.
7. La modulación de la expresión de TNF- α , MCP-1 e, indirectamente, del NO puede deberse, en parte, a la ausencia del infiltrado inflamatorio que contribuiría a la amplificación de la síntesis de estas moléculas y/o a un efecto directo del MMF sobre la síntesis y acciones de estas moléculas, aunque los experimentos realizados no muestran evidencias directas de esto último.
8. El MMF no modifica la expresión de VLA-4 en la membrana de los linfocitos, pero sí que induce alteraciones funcionales en esta molécula que se manifiestan en una adhesión notablemente reducida a su ligando VCAM-1.
9. El mecanismo a través del cual el MMF impide la extravasación de los linfocitos y monocitos al parénquima renal dañado de los animales que reciben el tratamiento terapéutico con MMF, podría ser la alteración en la vía de adhesión VLA-4/VCAM-1, imprescindible para este proceso en esta nefritis autoinmune. Además de la alteración en la función de VLA-4, la disminución de las citoquinas proinflamatorias TNF- α y MCP-1 podría estar regulando a la baja la expresión de VCAM-1 y dificultando la quimiotaxis de las células inmunes al lugar del daño.
10. La presencia de la quimioquina MCP-1 y de la enzima iNOS en el tejido renal de animales enfermos pone de manifiesto, por primera vez, la implicación de estos mediadores inflamatorios en la nefritis experimental inducida por mercurio en la rata BN.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Fitzgerald WF, Clarkson TW. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ Health Perspect* 1991;96:159-166.
2. Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 2000;52(1):113-143.
3. Kone BC, Brenner RM, Gullans SR. Sulfhydryl-reactive heavy metals increase cell membrane K⁺ and Ca²⁺ transport in renal proximal tubule. *J Membr Biol* 1990;113(1):1-12.
4. Rothstein A. Sulfhydryl groups in membrane structure and function. *Curr Top Membr Transm* 1970;1:135-176.
5. Smith MW, Ambudkar IS, Phelps PC, Regec AL, Trump BF. HgCl₂-induced changes in cytosolic Ca²⁺ of cultured rabbit renal tubular cells. *Biochim Biophys Acta* 1987;931(2):130-142.
6. Anner BM, Moosmayer M, Imesch E. Mercury blocks Na-K-ATPase by a ligand-dependent and reversible mechanism. *Am J Physiol* 1992;262:F830-836.
7. Imesch E, Moosmayer M, Anner BM. Mercury weakens membrane anchoring of Na-K-ATPase. *Am J Physiol* 1992;262:F837-842.
8. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987;56:395-433.
9. Gutknecht J. Inorganic mercury (Hg²⁺) transport through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 1981;61:61-66.

10. Abramson JJ, Trimm JL, Weden L, Salama G. Heavy metals induce rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 1983;80(6):1526-1530.
11. Adunyah SE, Dean WL. Effects of sulfhydryl reagents and other inhibitors on Ca²⁺ transport and inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release from human platelet membranes. J Biol Chem 1986;261(28):13071-13075.
12. Smith MW, Phelps PC, Trump BF. Cytosolic Ca²⁺ deregulation and blebbing after HgCl₂ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88(11):4926-4930.
13. Tan XX, Tang C, Castoldi AF, Manzo L, Costa LG. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. J Toxicol Environ Health 1993;38(2):159-170.
14. Mills JS, Johnson JD. Metal ions as allosteric regulators of calmodulin. J Biol Chem 1985;260(28):15100-15105.
15. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. J Biol Chem 1991;266(4):2005-2008.
16. Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. Toxicol Appl Pharmacol 1984;73(3):395-401.
17. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. Biochem Pharmacol 1983;32(19):2969-2972.
18. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. Biochem Pharmacol 1993;45(10):2017-2024.

19. Woods JS, Calas CA, Aicher LD. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. II. Promotion of oxidation from the interaction of mercuric ion, glutathione, and mitochondria-generated hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 1990;38(2):261-266.
20. Goering PL, Fisher BR, Chaudhary PP, Dick CA. Relationship between stress protein induction in rat kidney by mercuric chloride and nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;113(2):184-191.
21. Goering PL, Fisher BR, Noren BT, Papaconstantinou A, Rojko JL, Marler RJ. Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol Sci* 2000;53(2):447-457.
22. Gritzka TL, Trump BF. Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Electron microscopic observations: degeneration of the pars recta. *Am J Pathol* 1968;52(6):1225-1277.
23. Rodin A, Crowson C. Mercury nephrotoxicity in the rat. I. Factors influencing the localization of tubular lesions. *Am J Pathol* 1962;41:297-313.
24. Fillastre JP, Druet P, Méry JP. Proteinuric nephropathies associated with drugs and substances of abuse. En: Cameron JS: *The Nephrotic Syndrome*. 16th ed: Marcel Dekker; 1988.
25. Bigazzi PE. Lessons from animal models: the scope of mercury-induced autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;65(2):81-84.
26. Sapin C, Druet E, Druet P. Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown-Norway rat by mercuric chloride. *Clin Exp Immunol* 1977;28(1):173-179.
27. Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening JJ. Mercuric chloride-induced autoimmunity in the brown Norway rat. Cellular kinetics and

- major histocompatibility complex antigen expression. *Am J Pathol* 1988;133(1):127-138.
28. Bariety J, Druet P, Laliberte F, Sapin C. Glomerulonephritis with - and 1C-globulin deposits induced in rats by mercuric chloride. *Am J Pathol* 1971;65(2):293-302.
29. Druet E, Sapin C, Gunther E, Feingold N, Druet P. Mercuric chloride-induced anti-glomerular basement membrane antibodies in the rat: genetic control. *Eur J Immunol* 1977;7(6):348-351.
30. Goldman M, Druet P, Gleichmann E. Th2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 1991;12(7):223-271.
31. Hultman P, Bell LJ, Enestrom S, Pollard KM. Murine susceptibility to mercury. I. Autoantibody profiles and systemic immune deposits in inbred, congenic, and intra-H-2 recombinant strains. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;65(2):98-109.
32. Esnault VL, Mathieson PW, Thiru S, Oliveira DB, Martin-Lockwood C. Autoantibodies to myeloperoxidase in brown Norway rats treated with mercuric chloride. *Lab Invest* 1992;67(1):114-120.
33. Mathieson PW, Qasim FJ, Esnault VL, Oliveira DB. Animal models of systemic vasculitis. *J Autoimmun* 1993;6(2):251-264.
34. Kiely PD, Thiru S, Oliveira DB. Inflammatory polyarthritis induced by mercuric chloride in the Brown Norway rat. *Lab Invest* 1995;73(2):284-293.
35. Sapin C, Druet P, Mandet C. Induction of susceptibility to HgCl₂ immune glomerulonephritis in the Lewis rat by immunocompetent cells from susceptible F1 hybrids. *Eur J Immunol* 1980;10(5):371-374.

36. Hinglais N, Druet P, Grossetete J, Sapin C, Bariety J. Ultrastructural study of nephritis induced in Brown Norway rats by mercuric chloride. *Lab Invest* 1979;41(2):150-159.
37. Hirsch F, Couderc J, Sapin C, Fournie G, Druet P. Polyclonal effect of HgCl₂ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1982;12(7):620-625.
38. Marriott JB, Qasim F, Oliveira DB. Anti-phospholipid antibodies in the mercuric chloride treated brown Norway rat. *J Autoimmun* 1994;7(4):457-467.
39. Pusey CD, Bowman C, Morgan A, Weetman AP, Hartley B, Lockwood CM. Kinetics and pathogenicity of autoantibodies induced by mercuric chloride in the brown Norway rat. *Clin Exp Immunol* 1990;81(1):76-82.
40. Reuter R, Tessars G, Vohr HW, Gleichmann E, Luhrmann R. Mercuric chloride induces autoantibodies against U3 small nuclear ribonucleoprotein in susceptible mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(1):237-241.
41. Prouvost-Danon A, Abadie A, Sapin C, Bazin H, Druet P. Induction of IgE synthesis and potentiation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl₂ in the rat. *J Immunol* 1981;126(2):699-792.
42. Pelletier L, Pasquier R, Rossert J, Vial MC, Mandet C, Druet P. Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity. Ability to induce the autoimmune disease. *J Immunol* 1988;140(3):750-754.
43. Bowman C, Green C, Borysiewicz L, Lockwood CM. Circulating T-cell populations during mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat. *Immunology* 1987;61(4):515-520.
44. Londei M, Lamb JR, Bottazzo GF, Feldmann M. Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature* 1984;312(5995):639-641.

45. Finnegan A, Needleman B, Hodes RJ. Activation of B cells by autoreactive T cells: cloned autoreactive T cells activate B cells by two distinct pathways. *J Immunol* 1984;133(1):78-85.
46. Saito M, Nakashima I, Mizoguchi K, Isobe K, Nagase F, Goto S, et al. Immune reactivity of allogeneically pregnant mice to paternal MHC antigens on fetal and placental cells assessed by second set rejection of ascites tumor cells. *J Reprod Immunol* 1985;8(2-3):139-151.
47. Rossert J, Pelletier L, Pasquier R, Druet P. Autorreactive t cells in mercury-induced autoimmunity. Demonstration by limiting dilution analysis. *Eur J Immunol* 1988;18:1761-1766.
48. Sapin C, Hirsch F, Delaporte JP, Bazin H, Druet P. Polyclonal IgE increase after HgCl₂ injections in BN and LEW rats: a genetic analysis. *Immunogenetics* 1984;20(3):227-236.
49. Bowman C, Mason D, Pusey C, Lockwood C. Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown Norway Rat: A role for the T suppressor cells. *Eur J Immunol* 1984;14:464-470.
50. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995;16(1):34-38.
51. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-793.
52. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-2357.

53. Gillespie KM, Qasim FJ, Tibbatts LM, Thiru S, Oliveira DB, Mathieson PW. Interleukin-4 gene expression in mercury-induced autoimmunity. *Scand J Immunol* 1995;41(3):268-272.
54. Prigent P, Saoudi A, Pannetier C, Graber P, Bonnefoy JY, Druet P, et al. Mercuric chloride, a chemical responsible for T helper cell (Th)2-mediated autoimmunity in Brown Norway rats, directly triggers T cells to produce interleukin-4. *J Clin Invest* 1995;96(3):1484-1489.
55. Badou A, Savignac M, Moreau M, Leclerc C, Pasquier R, Druet P, et al. HgCl₂-induced interleukin-4 gene expression in T cells involves a protein kinase C-dependent calcium influx through L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1997;272(51):32411-32418.
56. Wolfreys K, Oliveira DB. Alterations in intracellular reactive oxygen species generation and redox potential modulate mast cell function. *Eur J Immunol* 1997;27(1):297-306.
57. Wu Z, Turner DR, Oliveira DB. IL-4 gene expression up-regulated by mercury in rat mast cells: a role of oxidant stress in IL-4 transcription. *Int Immunol* 2001;13(3):297-304.
58. Noble A, Staynov DZ, Díaz-Sánchez D, Lee TH, Kemeny DM. Elimination of IgE regulatory rat CD8⁺ T cells *in vivo* increases the co-ordinate expression of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-10. *Immunology* 1993;80(2):326-329.
59. Van der Meide PH, Groenestein RJ, de Labie MC, Aten J, Weening JJ. Susceptibility to mercuric chloride-induced glomerulonephritis is age-dependent: study of the role of IFN-gamma. *Cell Immunol* 1995;162(1):131-137.
60. Szeto C, Gillespie KM, Mathieson PW. Low-dose mercuric chloride induces resistance in brown norway rats to further mercuric chloride by up-regulation of interferon-gamma. *Scand J Immunol* 1999;50(2):195-201.

61. Gillespie KM, Szeto CC, Betin VM, Mathieson PW. Role of beta1 and beta2 subunits of the interleukin-12 receptor in determining T helper 1/T helper 2 responses *in vivo* in the rat. *Immunology* 2000;99(1):109-112.
62. Van der Meide PH, de Labie MC, Botman CA, Aten J, Weening JJ. Nitric oxide suppresses IFN-gamma production in the spleen of mercuric chloride-exposed brown Norway rats. *Cell Immunol* 1995;161(2):195-206.
63. Saoudi A, Kuhn J, Huygen K, de Kozak Y, Velu T, Goldman M, et al. TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1993;23(12):3096-3103.
64. Happ MP, Wettstein P, Dietzschold B, Heber-Katz E. Genetic control of the development of experimental allergic encephalomyelitis in rats. Separation of MHC and non-MHC gene effects. *J Immunol* 1988;141(5):1489-1494.
65. Druet P, Pelletier L. Th2 and Th1 autoreactive anti-class II cell lines in the rat suppress or induce autoimmunity. *J Autoimmun* 1996;9(2):221-226.
66. Mas M, Subra JF, Lagrange D, Pilipenko-Appolinaire S, Kermarrec N, Gauguier D, et al. Rat chromosome 9 bears a major susceptibility locus for IgE response. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1698-1705.
67. Mathieson P, Thiru S, Oliveira D. Regulatory role of OX-22 high T cells in mercury-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *J Exp Med* 1993;177:1309-1316.
68. McKnight AJ, Barclay AN, Mason DW. Molecular cloning of rat interleukin 4 cDNA and analysis of the cytokine repertoire of subsets of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1991;21(5):1187-1194.
69. Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the

- high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med* 1983;158(3):795-810.
70. Bridoux F, Badou A, Saoudi A, Bernard I, Druet E, Pasquier R, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta)-dependent inhibition of T helper cell 2 (Th2)-induced autoimmunity by self-major histocompatibility complex (MHC) class II-specific, regulatory CD4(+) T cell lines. *J Exp Med* 1997;185(10):1769-1775.
71. Kono DH, Balomenos D, Pearson DL, Park MS, Hildebrandt B, Hultman P, et al. The prototypic Th2 autoimmunity induced by mercury is dependent on IFN-gamma and not Th1/Th2 imbalance. *J Immunol* 1998;161(1):234-240.
72. Hu H, Moller G, Abedi-Valugerdi M. Mechanism of mercury-induced autoimmunity: both T helper 1- and T helper 2-type responses are involved. *Immunology* 1999;96(3):348-357.
73. Subra JF, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, et al. The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol* 2001;166(5):2944-2952.
74. Pelletier L, Rossert J, Pasquier R, Vial MC, Druet P. Role of CD8+ T cells in mercury-induced autoimmunity or immunosuppression in the rat. *Scand J Immunol* 1990;31(1):65-74.
75. Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 1994;180(5):1715-1728.
76. Cautain B, Damoiseaux J, Bernard I, Xystrakis E, Fournie E, van Breda Vriesman P, et al. The CD8 T cell compartment plays a dominant role in the deficiency of Brown-Norway rats to mount a proper type 1 immune response. *J Immunol* 2002;168(1):162-170.

77. Fournie GJ, Cautain B, Xystrakis E, Damoiseaux J, Mas M, Lagrange D, et al. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol Rev* 2001;184:145-160.
78. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Rev Immunol* 2002;2(1):46-53.
79. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359(6397):693-699.
80. Dang H, Geiser AG, Letterio JJ, Nakabayashi T, Kong L, Fernandes G, et al. SLE-like autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. *J Immunol* 1995;155(6):3205-3212.
81. Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B, Leu CH, Martz JE, Carlino JA, et al. Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-beta (TGF-beta) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF-beta and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1993;151(2):1116-1127.
82. Wahl SM, Allen JB, Costa GL, Wong HL, Dasch JR. Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1993;177(1):225-230.
83. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183(6):2605-2616.
84. Zauderer M. Origin and significance of autoreactive T cells. *Adv Immunol* 1989;45:417-437.

85. Agrawal B, Manickasundari M, Fraga E, Singh B. T cells that recognize peptide sequences of self MHC class II molecules exist in syngeneic mice. *J Immunol* 1991;147(2):383-390.
86. Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990;8:365-400.
87. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69(1):11-25.
88. Sánchez-Madrid F, Corbi AL. Leukocyte integrins: structure, function and regulation of their activity. *Semin Cell Biol* 1992;3(3):199-210.
89. Yednock T, Cannon C, Fritz L, Sánchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992;356(6364):63-69.
90. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martín A, Barat A, Álvarez V, et al. Prevention of mercuric chloride-induced nephritis in the brown Norway rat by treatment with antibodies against the alpha 4 integrin. *J Immunol* 1994;153(5):2313-2320.
91. Escudero E, Martín A, Nieto M, Nieto E, Navarro E, Luque A, et al. Functional Relevance of Activated B1 Integrins in Mercury-Induced Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1075–1084.
92. Hemler M, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger J, Clabby M. Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 1987;262(24):11478-11485.
93. Bednarczyk J, McIntyre B. A monoclonal antibody to VLA-4 alfa-chain (CDw49d) induces homotypic lymphocyte aggregation. *J Immunol* 1990;144(3):777-784.

94. Wayner E, Garcia-Pardo A, Humphries M, McDonald J, Carter W. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 1989;109(3):1321-1330.
95. Elices M, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler M, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60(4):577-584.
96. Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M, Lohr J, von Hoegen P, Sammar M, et al. The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1. *J Exp Med* 1995;182(2):345-355.
97. Sánchez-Madrid F, De Landázuri M, Morago G, Cebrián M, Acevedo A, Bernabeu C. VLA-3: a novel polypeptide association within the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur J Immuno* 1986;16:1343-1349.
98. Hemler ME, Elices MJ, Parker C, Takada Y. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 1990;114:45-65.
99. Gismondi A, Morrone S, Humphries MJ, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Human natural killer cells express VLA-4 and VLA-5, which mediate their adhesion to fibronectin. *J Immunol* 1991;146(1):384-392.
100. Weller PF, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR. Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(16):7430-7433.
101. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173(6):1553-1557.

102. Rosen GD, Sanes JR, LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 1992;69(7):1107-1119.
103. Udagawa T, McIntyre BW. A VLA-4 alpha-chain specific monoclonal antibody enhances CD3-induced IL-2/IL-2 receptor-dependent T-cell proliferation. *Lymphokine Cytokine Res* 1992;11(5):193-199.
104. Silvy A, Altevogt P, Mondiere P, Bella C, Defrance T. A role for the VLA-4 integrin in the activation of human memory B cells. *Eur J Immunol* 1997;27(11):2757-2764.
105. McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw AP, Davreux CJ, Rotstein OD. VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272(15):10287-10294.
106. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67(6):1033-1036.
107. Ryan DH, Nuccie BL, Abboud CN, Winslow JM. Vascular cell adhesion molecule-1 and the integrin VLA-4 mediate adhesion of human B cell precursors to cultured bone marrow adherent cells. *J Clin Invest* 1991;88(3):995-1004.
108. Teixido J, Parker CM, Kassner PD, Hemler ME. Functional and structural analysis of VLA-4 integrin alpha 4 subunit cleavage. *J Biol Chem* 1992;267(3):1786-1791.
109. Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, et al. Adhesion of human B cells to germinal centers *in vitro* involves VLA-4 and INCAM-110. *Science* 1990;249(4972):1030-1033.
110. Scheeren RA, Koopman G, Van der Baan S, Meijer CJ, Pals ST. Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1991;21(5):1101-1105.

111. Postigo AA, García-Vicuna R, Díaz-González F, Arroyo AG, De Landázuri MO, Chi-Rosso G, et al. Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Clin Invest* 1992;89(5):1445-1452.
112. Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S. A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation *in vivo*. *J Exp Med* 1993;177(2):561-566.
113. Mulligan MS, Wilson GP, Todd RF, Smith CW, Anderson DC, Varani J, et al. Role of beta 1, beta 2 integrins and ICAM-1 in lung injury after deposition of IgG and IgA immune complexes. *J Immunol* 1993;150(6):2407-2417.
114. Mulligan MS, Johnson KJ, Todd RF, 3rd, Issekutz TB, Miyasaka M, Tamatani T, et al. Requirements for leukocyte adhesion molecules in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 1993;91(2):577-587.
115. Escudero E, Nieto M, Martín A, Molina A, Lobb RR, Sánchez-Madrid F, et al. Differential effects of antibodies to vascular cell adhesion molecule-1 and distinct epitopes of the alpha4 integrin in HgCl₂-induced nephritis in Brown Norway rats. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(10):1881-1891.
116. Roos A, Neeft M, Engelen L, Schilder-Tol EJ, Kunzendorf U, Weening JJ, et al. The immune dysregulatory compound mercuric chloride induces integrin-mediated T-lymphocyte adhesion. *Immunology* 2001;102(1):31-38.
117. Nakashima I, Pu MY, Nishizaki A, Rosila I, Ma L, Katano Y, et al. Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering disregulated cellular signals. *J Immunol* 1994;152(3):1064-1071.
118. Aten J, Claessen N, Chand M, Weening J. The intracellular redox status modifies susceptibility to mercuric chloride-induced T cell activation. *Kidney Int* 1995;48:1364 (Abstract).

119. Rosenberg H, Galin J. Inflammation. En: Paul W: Fundamental Immunology. 4^a ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
120. Gallin J, Goldstein I, Snyderman R. Inflammation. 2nd ed. New York: Raven Press; 1992.
121. Neta R, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Relationship of TNF to interleukins. *Immunol Ser* 1992;56:499-566.
122. Moore K. Proinflammatory cytokines. En: William P: Fundamental Immunology. 4^a ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
123. Pober J, Cotran R. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab Invest* 1991;64(3):301-305.
124. Schattner A. Lymphokines in autoimmunity: a critical review. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;70(3):177-189.
125. Lorenz HM, Kalden JR. Perspectives for TNF-alpha-targeting therapies. *Arthritis Res* 2002;4(Supl. 3):S17-24.
126. Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A, et al. Modulation of antibody-mediated glomerular injury *in vivo* by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J Immunol* 1989;142(9):3083-3090.
127. Tamatani T, Kotani M, Tanaka T, Miyasaka M. Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. II. Differential regulation of LFA-1 in the interaction between lymphocytes and high endothelial cells. *Eur J Immunol* 1991;21(3):855-858.
128. Brennan DC, Yui MA, Wuthrich RP, Kelley VE. Tumor necrosis factor and IL-1 in New Zealand Black/White mice. Enhanced gene expression and acceleration of renal injury. *J Immunol* 1989;143(11):3470-3475.

129. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martín A, Escudero E, Álvarez V, et al. Abrogation of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against TNF α . *Mediators inflammation* 1995;4:444-451.
130. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9233-9237.
131. Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999;19(1):1-47.
132. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):565-568.
133. Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999;29(2):700-712.
134. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(1):152-176.
135. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338(7):436-445.
136. Mantovani A, Garlanda C, Introna M, Vecchi A. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplant Proc* 1998;30(8):4239-4243.
137. Grone HJ, Weber C, Weber KS, Grone EF, Rabelink T, Klier CM, et al. MET-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant

- rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *Faseb J* 1999;13(11):1371-1383.
138. Schlondorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B. Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 1997;51(3):610-621.
139. Xu K, Geczy CL. IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol* 2000;164(9):4916-4923.
140. Xiao BG, Mousa A, Kivisakk P, Seiger A, Bakhiet M, Link H. Induction of beta-family chemokines mRNA in human embryonic astrocytes by inflammatory cytokines and measles virus protein. *J Neurocytol* 1998;27(8):575-580.
141. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992;12(1-2):17-46.
142. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 1997;8(10):1537-1545.
143. Gong JH, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I. An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med* 1997;186(1):131-137.
144. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997;185(7):1371-1380.
145. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998;188(1):157-167.

146. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 1999;190(12):1813-1824.
147. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, et al. Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(6):906-913.
148. Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 1994;71(4):536-42.
149. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 1996;49(3):761-767.
150. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-526.
151. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992;65:287-346.
152. Janssens SP, Simouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267(31):22694.
153. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298(2):249-258.
154. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992;267(36):25722-25729.

155. Romero JC, Strick DM. Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2(1):114-121.
156. Narita I, Border WA, Ketteler M, Noble NA. Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 1995;72(1):17-24.
157. Yu CC, Yang CW, Wu MS, Ko YC, Huang CT, Hong JJ, et al. Mycophenolate mofetil reduces renal cortical inducible nitric oxide synthase mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in MRL/lpr mice. *J Lab Clin Med* 2001;138(1):69-77.
158. Gabbai FB, Boggiano C, Peter T, Khang S, Archer C, Gold DP, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase intensifies injury and functional deterioration in autoimmune interstitial nephritis. *J Immunol* 1997;159(12):6266-6275.
159. Kashem A, Endoh M, Yano N, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int* 1996;50(2):392-399.
160. Fu Y, Blankenhorn EP. Nitric oxide-induced anti-mitogenic effects in high and low responder rat strains. *J Immunol* 1992;148(7):2217-2222.
161. Woolfson R, Qasim F, Thiru S, Oliveira D, Neild G, Mathieson P. Nitric oxide contributes to tissue injury in mercuric chloride-induced autoimmunity. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;217(2):515-521.
162. Cohen P. Systemic Autoimmunity. En: Paul W : *Fundamental Immunology*. 4^a ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
163. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennet WM. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. *Am J Kidney Dis* 1996;28(5):631-659.

164. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis* 1996;28(2):159-172.
165. Allison A, Eugui E. Mycophenolate mofetil, a rationally designed immunosuppressive drug. *Clin Transplant* 1993;7:96-112.
166. Allison A, Eugui E. Immunosuppressive and other Effects of Mycophenolic Acid and an Ester Prodrug, Mycophenolate Mofetil. *Immunological Reviews* 1993;136:5-27.
167. Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, Waters RV, Eugui EM. Mycophenolic-acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 1993;25:67-70.
168. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993;268(36):27286-27290.
169. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):85-118.
170. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive activity of mycophenolic acid and its morpholinoethyl ester (RS-61443) in rodents. *Transplant Proc* 1991;23(2 Supl. 2):15-18.
171. Hauser IA, Johnson DR, Thevenod F, Goppelt-Strube M. Effect of mycophenolic acid on TNF alpha-induced expression of cell adhesion molecules in human venous endothelial cells *in vitro*. *Br J Pharmacol* 1997;122(7):1315-1322.
172. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid *in vitro*: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991;33(2):161-173.

173. Kornfeld R, Kornfeld S. Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. En: Lennarz WJ: Biochemistry Glycoproteins and Proteoglycans. New York: Plenum; 1980.
174. Laurent AF, Dumont S, Poindron P, Muller CD. Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and to some substrates. *Exp Hematol* 1996;24(1):59-67.
175. Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, et al. Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transpl Immunol* 1998;6(4):251-259.
176. Raab M, Daxecker H, Karimi A, Markovic S, Cichna M, Markl P, et al. *In vitro* effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta* 2001;310(1):89-98.
177. Weigel G, Bertalanffy P, Dubsky P, Griesmacher A, Wolner E. Mycophenolic acid influences T helper 2 (Th2) cytokine induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human endothelial cells. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(3):253-257.
178. Jepson S, Brogan IJ, Stoddart RW, Hutchinson IV. Mycophenolic acid does not inhibit protein glycosylation in T lymphocytes. *Transpl Immunol* 2000;8(3):169-175.
179. Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, et al. Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):1250-1252.
180. Thomson AW, Woo J, Yao GZ, Todo S, Starzl TE, Zeevi A. Effects of combined administration of FK 506 and the purine biosynthesis inhibitors mizoribine or mycophenolic acid on lymphocyte DNA synthesis and T cell activation molecule expression in human mixed lymphocyte cultures. *Transpl Immunol* 1993;1(2):146-150.

181. Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, Burton P, Chiu SH, Eugui E, et al. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation* 1999;68(3):411-418.
182. Nagy SE, Andersson JP, Andersson UG. Effect of mycophenolate mofetil (RS-61443) on cytokine production: inhibition of superantigen-induced cytokines. *Immunopharmacology* 1993;26(1):11-20.
183. Izeradjene K, Revillard JP. Apoptosis of superantigen-activated T cells induced by mycophenolate mofetil treatment. *Transplantation* 2001;71(1):118-125.
184. Lui SL, Ramassar V, Urmson J, Halloran PF. Mycophenolate mofetil reduces production of interferon-dependent major histocompatibility complex induction during allograft rejection, probably by limiting clonal expansion. *Transpl Immunol* 1998;6(1):23-32.
185. Durez P, Appelboom T, Pira C, Stordeur P, Vray B, Goldman M. Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF-alpha and upregulation of IL-10 release. *Int J Immunopharmacol* 1999;21(9):581-587.
186. Izeradjene K, Quemeneur L, Michallet MC, Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mycophenolate mofetil interferes with interferon gamma production in T-cell activation models. *Transplant Proc* 2001;33(3):2110-2111.
187. Penny MJ, Boyd RA, Hall BM. Mycophenolate mofetil prevents the induction of active Heymann nephritis: association with Th2 cytokine inhibition. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12):2272-2282.
188. Chang CC, Aversa G, Punnonen J, Yssel H, de Vries JE. Brequinar sodium, mycophenolic acid, and cyclosporin A inhibit different stages of IL-4- or IL-13-induced human IgG4 and IgE production *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:108-122.

189. Knechtle SJ, Wang J, Burlingham WJ, Beeskau M, Subramanian R, Sollinger HW. The influence of RS-61443 on antibody-mediated rejection. *Transplantation* 1992;53(3):699-701.
190. Senda M, DeLustro B, Eugui E, Natsumeda Y. Mycophenolic acid, an inhibitor of IMP dehydrogenase that is also an immunosuppressive agent, suppresses the cytokine-induced nitric oxide production in mouse and rat vascular endothelial cells. *Transplantation* 1995;60(10):1143-1148.
191. Giovanelli J, Campos KL, Kaufman S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(16):7091-7095.
192. Jones EA, Shoskes DA. The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. *J Urol* 2000;163(3):999-1004.
193. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha II, De Nucci G, Zatz R. Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension* 2001;37(1):170-175.
194. Qiu Y, Fairbanks LD, Ruckermann K, Hawrlowicz CM, Richards DF, Kirschbaum B, et al. Mycophenolic acid-induced GTP depletion also affects ATP and pyrimidine synthesis in mitogen-stimulated primary human T-lymphocytes. *Transplantation* 2000;69(5):890-897.
195. Pardo-Mindán FJ, Errasti P, Panizo A, Sola I, de Álava E, Lozano MD. Decrease of apoptosis rate in patients with renal transplantation treated with mycophenolate mofetil. *Nephron* 1999;82(3):232-237.
196. Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beisert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol* 2000;165(5):2374-2381.

197. Pérez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, et al. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(7):1369-1382.
198. Issekutz T, Wykretowicz A. Effect of a new monoclonal antibody, TA-2, that inhibits lymphocyte adherence to cytokine stimulated endothelium in the rat. *J Immunol* 1991;147:109-116.
199. Brideau R, Carter P, McMaster W, Mason D, Williams A. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1980;10(8):609-615.
200. Eddy A, Crary G, Michael A. Identification of lymphohaemopoietic cells in the kidneys of normal rats. *Am J Pathol* 1986;124:335-342.
201. Jonsson CA, Svensson L, Carlsten H. Beneficial effect of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil on survival and severity of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus (SLE)-prone MRLlpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 1999;116(3):534-541.
202. Griffith T, Bulger B, Trump B. The ultrastructure of the functioning kidney. *Lab Invest* 1967;16:220-235.
203. Bricio T, Mampaso F. Natural Killer function in the rat with interstitial nephritis. *Scand J Immunol* 1991;33:639-645.
204. Giménez A, Mampaso F. Characterization of inflammatory cells in drug-induced tubulointerstitial nephritis. *Nephron* 1983;43:239-240.
205. Mampaso F, Egido J, Martínez-Montero J, Bricio T, González E, Pirotzky E, et al. Interstitial mononuclear cell infiltrates in experimental nephrosis: Effect of PAF antagonist. *Nephrol Dial Transplant* 1989;4:1037-1044.

206. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
207. Sambrook J, Rusell S. Ribonuclease Protection: Mapping RNA with Ribonuclease and Radiolabeled RNA Probes. En: *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3^a ed. New York; 2001.
208. Yáñez-Mo M, Alfranca A, Cabañas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa M, et al. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 1998;141(3):791-804.
209. del Pozo M, Sánchez-Mateos P, Nieto M, Sánchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1995;131(2):495-508.
210. Valente AJ, Graves DT, Vialle-Valentin CE, Delgado R, Schwartz CJ. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry* 1988;27(11):4162-4168.
211. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3652-3656.
212. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, van Damme J, Jilek P, Sozzani S, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol* 1994;24(12):3233-3236.
213. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 1995;73(6):804-809.

214. Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;69(1):83-91.
215. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol* 1998;161(7):3767-3775.
216. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138(6):1315-1319.
217. Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 1999;55(3):945-955.
218. Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A, Daniel C, Marti HP. Mycophenolic acid: a new approach to the therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(11):2055-2066.
219. Corna D, Morigi M, Facchinetti D, Bertani T, Zoja C, Remuzzi G. Mycophenolate mofetil limits renal damage and prolongs life in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int* 1997;51(5):1583-1589.
220. Grailer A, Nichols J, Hullett D, Sollinger HW, Burlingham WJ. Inhibition of human B cell responses *in vitro* by RS-61443, cyclosporine A and DAB486 IL-2. *Transplant Proc* 1991;23(1 Pt 1):314-315.
221. Eugui EM, Nakano GM, Byars NE. Effect of mycophenolic acid on antibody titers and isotypes in mice vaccinated with influenza virus hemagglutinin. *Int: 9th Internat Congr Immunology* 1995;1:Abstracts 5073.

-
222. Strohl KP, Thomas AJ, St Jean P, Schlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rat strains. *J Appl Physiol* 1997;82(1):317-323.
223. Van Den Brandt J, Kovacs P, Kloting I. Metabolic variability among disease-resistant inbred rat strains and in comparison with wild rats (*Rattus norvegicus*). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27(10):793-795.
224. Druet E, Guery JC, Ayed K, Guilbert B, Avrameas S, Druet P. Characteristics of polyreactive and monospecific IgG anti-laminin autoantibodies in the rat mercury model. *Immunology* 1994;83(3):489-494.
225. Kaysen GA, Myers BD, Couser WG, Rabkin R, Felts JM. Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab Invest* 1986;54(5):479-498.
226. Couser WG, Salant DJ. In situ immune complex formation and glomerular injury. *Kidney Int* 1980;17(1):1-13.
227. Van Bruggen MC, Walgreen B, Rijke TP, Berden JH. Attenuation of murine lupus nephritis by mycophenolate mofetil. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(8):1407-1415.
228. Hora K, Satriano JA, Santiago A, Mori T, Stanley ER, Shan Z, et al. Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(5):1745-1749.
229. Gómez-Guerrero C, Duque N, Casado MT, Pastor C, Blanco J, Mampaso F, et al. Administration of IgG Fc fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J Immunol* 2000;164(4):2092-2101.
230. Kakizaki Y, Waga S, Sugimoto K, Tanaka H, Nukii K, Takeya M, et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1995;48(6):1866-1874.

231. Banas B, Luckow B, Moller M, Klier C, Nelson PJ, Schadde E, et al. Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(11):2314-2322.
232. Drapier JC, Hibbs JB, Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988;140(8):2829-2838.
233. Sever R, Cook T, Cattell V. Urinary excretion of nitrite and nitrate in experimental glomerulonephritis reflects systemic immune activation and not glomerular synthesis. *Clin Exp Immunol* 1992;90(2):326-329.
234. Jonsson CA, Erlandsson M, Svensson L, Molne J, Carlsten H. Mycophenolate mofetil ameliorates perivascular T lymphocyte inflammation and reduces the double-negative T cell population in SLE-prone MRLlpr/lpr mice. *Cell Immunol* 1999;197(2):136-144.
235. Daniels BS. The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol* 1993;13(5):318-323.
236. Nadeau K, Azuma H, Tilney N. Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunosuppressed with maintenance Cyclosporine or Mycophenolate Mofetil. *Transplantation* 1996;62:1363-1366.
237. Gregory CD, Murray RJ, Edwards CF, Rickinson AB. Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein- Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 1988;167(6):1811-1824.
238. Issekutz TB. Dual inhibition of VLA-4 and LFA-1 maximally inhibits cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation. *Am J Pathol* 1993;143(5):1286-1293.

239. Cinamon G, Grabovsky V, Winter E, Franitza S, Feigelson S, Shamri R, et al. Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. *J Leukoc Biol* 2001;69(6):860-866.
240. D'Souza-Schorey C, Boettner B, Van Aelst L. Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1998;18(7):3936-3946.
241. Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp Med* 1990;171(4):1369-1374.
242. Mampaso F, Sánchez-Madrid F, Marcén R, Molina A, Pascual J, Bricio T, et al. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 1993;56(3):687-691.

ANEXO

Effects of Mycophenolate Mofetil in Mercury-Induced Autoimmune Nephritis

ELENA NIETO,* ESTHER ESCUDERO,* ELENA NAVARRO,* MARÍA YÁÑEZ-MO,[§]
ANA MARTÍN,[†] GUILLERMO PÉREZ DE LEMA,[‡]
FRANCISCO SÁNCHEZ-MADRID,[§] and FRANCISCO MAMPASO*

*Department of Pathology, Hospital Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain; [†]Department of Biology, Universidad SEK, Segovia, Spain; [‡]Klinische Biochemie, Medizinische Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany; and [§]Department of Immunology, Hospital La Princesa, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.

Abstract. Mycophenolate mofetil (MMF) is a new immunosuppressive drug whose active metabolite, mycophenolic acid (MPA), blocks the action of inosine monophosphate dehydrogenase, resulting in the inhibition of the *novo* purine synthesis. Thus, MPA has an antiproliferative effect on T and B lymphocytes and also inhibits the glycosylation of cell surface adhesion proteins involved in cell-cell contact and in the recruitment of circulating leukocytes to sites of tissue damage and inflammation. In this study, the effect of MMF in the mercury model of nephritis was examined. Repeated exposure to HgCl₂ induces an autoreactive Th2 cell subset-inducing polyclonal B cell activation in the Brown Norway (BN) rat. This leads to the development of an autoimmune syndrome characterized by synthesis of autoantibodies (mainly anti-glomerular basement membrane [GBM] Abs) with glomerular linear deposits of IgG, proteinuria, and tubulointerstitial nephritis. Results show

that MMF has a preventive effect on mercury-induced disease as it blocks anti-GBM Ab synthesis, thus avoiding glomerular IgG deposits and proteinuria and the development of interstitial nephritis. However, the therapeutic effect of MMF seems to be restricted to its antiinflammatory properties blocking the extravasation of circulating leukocytes to renal interstitium by interfering with the very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) cell adhesion pathway. Also, MMF administration to mercury-injected rats reduces the secretion of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α . These findings confirm that MMF has a strong effect on the primary immune response in this model. Nevertheless, when the disease is in progress, MMF acts exclusively on the inflammatory response. MMF could be useful in the treatment of diseases associated with renal inflammation.

Mercuric chloride-induced nephritis was used to examine the effects of mycophenolate mofetil (MMF) administration on the course of this autoimmune model of disease. MMF is the morpholinoethyl ester of mycophenolic acid (MPA), which is a potent, non competitive and reversible inhibitor of eukaryotic inosine monophosphate dehydrogenase, a key enzyme in the *novo* purine synthesis. This enzyme catalyzes the conversion of inosine monophosphate into GMP, and due to lymphocytes rely on the *novo* pathway for production of nucleotides, MPA has antiproliferative effects on these cells by depleting intracellular GTP pool. Thus, MPA is a relatively selective inhibitor of lymphocyte proliferation since other cells can obtain guanine nucleotides via the *salvage* pathway (1). Furthermore, MPA-mediated depletion of GTP inhibits the transfer of mannose and fucose to lymphocyte and monocyte glycoproteins, some of which are adhesion molecules that mediate attachment

of such cells to endothelial and target cells, as well as the extravasation to sites of inflammation. The down-regulated expression of these adhesion molecules also confers to this immunomodulating drug an anti-inflammatory effect (2).

MMF has been used in the prevention of acute rejection after renal transplantation (3–7). Its low toxicity, in contrast with other drugs used like cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine (8), could make of this new immunosuppressant not only an alternative therapy for organ rejection, but also a potential therapeutic agent for treating autoimmune inflammatory disorders. Thus, several autoimmune experimental studies have shown improvement after MMF treatment. MMF is able to inhibit the development of experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats (9) and spontaneous diabetes in Bio-breeding rats (10). In addition, it has been shown that this immunosuppressive agent is effective in other autoimmune experimental diseases with renal affection, such as lupus erythematosus in MRLlpr/lpr mice prone (11), NZBxW lupus mice (12), and in the active Heymann nephritis model of disease (13).

Given the beneficial effects in immune-mediated models, MMF has also been used for the treatment of various human glomerulonephritis in small pilot trials on minimal change disease, focal segmental glomerulosclerosis, membranous ne-

Received December 29, 2000. November 8, 2001.

Correspondence to: Dr. Francisco Mampaso, Department of Pathology, Hospital Ramon y Cajal, Carretera Colmenar km 9.100, Madrid 28034, Spain. Phone: 3413368052; Fax: 3413369016; E-mail: fmampaso@hrc.insalud.es

1046-6673/1304-0937

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2002 by the American Society of Nephrology

phropathy, and lupus nephritis (14–20). Such results have shown short-term clinical efficacy of this drug, but additional controlled clinical trials are necessary to evaluate long-term benefits.

Mercuric chloride is a T cell–dependent polyclonal B cell activator that induces autoimmunity in susceptible rodent strains. In the Brown Norway (BN) rat, mercury induces a self-limiting autoimmune syndrome characterized by the presence of an autoreactive Th2 CD4⁺ cell subset (21,22), hypergammaglobulinemia, and a number of auto-Abs, mainly anti-glomerular basement membrane (GBM) Abs (23). This autoimmune response is accompanied by the development of nephritis with glomerular linear IgG deposits and proteinuria. The histologic renal lesions consist of a transient influx of lymphocytes and monocytes into the renal interstitium (24–26).

Taking into account that cellular activation, synthesis of anti-GBM Abs, and release of soluble inflammatory mediators are important steps in the renal tissue dysfunction observed in mercury-treated rats (27), we have examined whether MMF has the potential to be an adequate therapeutic agent to modulate this autoimmune renal disease.

Materials and Methods

Animals

BN female rats weighing 150 to 200 g were obtained from IFFA CREDO (Paris, France), fed standard laboratory chow *ad libitum*, and treated according to the institutional guidelines that are in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Monoclonal Antibodies

To identify rat cell surface markers we used the following mAbs: the mouse anti-human HP2/4 and HP2/1 mAb directed toward the α -4 integrin that crossreact with rat α -4 integrin, which have been described elsewhere (27); mAb TA2, which recognizes the rat very late activation antigen 4 (VLA-4) molecule (a generous gift from Dr. Thomas B. Issekutz, Izaak Walton Killam Hospital, Halifax, Canada); and mAb WT.1, which recognizes the α -subunit of rat LFA-1 (CD11a, LFA-1a) (28). The mouse anti-rat OX1 mAb, specific for the panleukocyte CD45 antigen, was purchased from Serotec (Oxford, UK).

Experimental Design

Animals were separated into four different groups. Groups I, II, and III received five subcutaneous injections of HgCl₂ (1 mg/kg body wt) to induce the disease over a period of 2 wk. Rats from group I did not receive any additional treatment and served as positive control of the disease. Rats from groups II and III were also orally given the immunosuppressant MMF (80 mg/kg body wt) dissolved in the vehicle once a day until sacrificed. Rats from group II started the treatment on the first day of the experiment, but the animals belonging to group III started treatment the day after the last injection of HgCl₂ (day 9 of the experiment, after the disease was developed). Finally, group IV served as a normal control in which rats were only injected with H₂O adjusted to the same pH (3.8) as the HgCl₂ solution, following the same protocol of HgCl₂ administration. The dosages and days were established on the basis of previous optimizing experiments of the disease kinetics (29). All animals were sequentially bled

on different days of the experiment by tail artery puncture. To titrate the optimal dose of MMF, a pilot experiment was performed. Rats were treated with different doses of the immunosuppressant (from 20 to 100 mg/kg body wt). We decided to choose the dose (80 mg/kg body wt) that was appropriate for completely blocking anti-GBM antibody production without producing diarrhea or considerable weight loss in rats.

Proteinuria

Rats were housed in metabolic cages with free access to food and water to collect 24-h urine. Urine samples were taken at regular intervals starting on day 0. Protein concentration in urine was determined by the Bio-Rad assay (Bio-Rad, Richmond, CA) according to the manufacturer's protocol. Samples were assayed in triplicate, and the optical density from each one was measured in a Titertek Multiskan Plus (Flow, Irvine, Scotland) at 595 nm.

Anti-GBM Abs Assay

Rat GBM was essentially isolated as described by Bowman *et al.* (25). Briefly, glomeruli were obtained from healthy BN rats by differential sieving and centrifugation of minced kidney cortices. The glomerular suspension was sonicated, washed, and lyophilized. The GBM was digested with type I collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at 0.7% wt/wt at 37°C for 1 h. Anti-GBM Abs were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously (25). All the samples were assayed in triplicate. Samples of a serum pool from untreated BN rats and from mercury-treated BN rats (which were bled on day 13 of the disease) served as negative and positive controls, respectively. Results were expressed as the percentage of binding obtained with samples from positive control serum. Absorbance was measured at 492 nm by using the Titertek Multiskan Plus.

Ribonuclease Protection Assay (RPA)

Total RNA was isolated from whole rat kidneys belonging to groups I, II, and IV at day 13 (when renal damage was maximal) and at day 16 (when renal injury started to decline). RPA is a highly sensitive and specific method for the detection and quantification of mRNA species. Twenty micrograms of total RNA from each sample were tested for cytokine expression analysis by multiprobe RPA (RiboQuant template set, rCK-1; PharMingen, San Diego, CA). Assays were performed according to manufacturer's instructions. The radiolabeled α -(32) P-UTP (3000 Ci/mmol) used was from PerkinElmer (Freiburg, Germany). The samples were run out on a 5% denaturing polyacrylamide gel, and the intensity of mRNA rat cytokines bands was analyzed by phosphoimaging (Storm 840; Phosphor-Imager Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). mRNA bands were quantified using the ImageQuant software (Molecular Dynamics, Eugene, OR), normalized to L32 constitutive gene expression, and averaged over the four animals per group used for this assay.

Tumor Necrosis Factor- α Assay

The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined in all the experimental groups of rats along the course of the disease by using a commercial rat ELISA TNF- α Kit (Endogen, MA). The assay was carried out according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in triplicate, and the plates were read at 450 nm in Titertek Multiskan Plus.

Kidney Tissue Processing

On days 13 or 23 of the experiment, rats ($n = 8$) from each group were sacrificed. Kidneys were removed and processed for histologic and immunohistochemical studies. For light microscopy, a piece of kidney tissue was fixed in neutral-buffered formal saline, and 3- μm paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff. For immunohistochemical studies, another piece of kidney tissue was snap frozen in precooled isopentane in liquid nitrogen and stored at -70°C until used. An indirect immunoperoxidase-stained method, was used to characterize OX1⁺ cells in the renal interstitium (30). Quantification of interstitial infiltrating cells bearing OX1⁺ surface marker was performed by counting, in two kidney tissue sections per rat, the total number of positive labeled cells examined in ten randomly chosen areas of interstitial infiltrates. These studies were performed by using a conventional light microscopy objective ($\times 63$), as described previously (31). Immunofluorescence (IF) microscopy was performed on ether/ethanol-fixed serial cryostat sections (5 μm) by using FITC-conjugated rabbit anti-rat IgG Ab (Serotec), as described elsewhere (32).

Expression and Function of the VLA-4 Integrin

To perform flow cytometry and cell adhesion assays, a group of rats ($n = 4$) were orally administered MMF (80 mg/kg wt) once a day for 3 d while another group of rats ($n = 4$, control group) only received the vehicle following the same protocol of MMF administration. Rat lymphocytes were obtained from the spleen as described previously (33). Mononuclear cells were separated by Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co.) density gradient centrifugation and suspended in RPMI 1640. Macrophages were then depleted by adherence on plastic dishes for 1 h at 37°C and 5% CO_2 atmosphere.

Flow Cytometry Assay

Spleen rat lymphocytes suspended in RPMI 1640 were incubated with saturating concentration of the anti- $\alpha 4$ HP2/4, anti- $\alpha 4$ HP2/1, anti-rat VLA-4 TA2 or anti-rat LFA-1 WT1 mAbs for 10 min at room temperature. After washing, cells were incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG highly cross-adsorbed (AlexaFluor 488, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) secondary antibody for 30 min at 4°C in the dark. Direct application of the secondary antibody was used as negative control. The samples were analyzed using a FACScan cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Cell Adhesion Experiments

Adhesion assays were performed as described previously (34) with slight modifications. Spleen lymphocytes were labeled with BCECF-AM (Molecular Probes Inc.) and pretreated with different mAbs (1:100 dilution of ascitic fluid) for 10 min, and 2.5×10^5 cells/well were seeded on 96-microwell plates (Nunc-ImmunoPlates Maxisorp; Nunc Inc., Naperville, IL) coated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of recombinant VCAM-1-4D-Fc (35) and blocked with 1% bovine serum albumin. After 20-min adhesion at 37°C , unbound cells were washed by inversion, lysed and fluorescence intensity measured in a microplate fluorescence reader (Bio-tek FL500).

Statistical Analyses

Proteinuria, adhesion assay, and ELISA results are given as mean \pm SD. The statistical analysis was performed by using the Mann-Whitney Test. $P < 0.001$ was considered statistically significant.

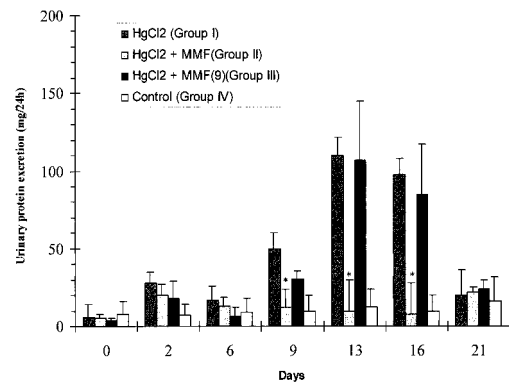


Figure 1. Protein excretion levels. Time course of urine protein excretion in all tested groups. Results are expressed as mg protein/24 h (mean \pm SD). $n = 15$ per group. $*P < 0.001$ difference with HgCl_2 -treated rats.

Results

Effect of MMF on Proteinuria

As shown in Figure 1, HgCl_2 -treated rats (group I) developed proteinuria in two different phases. A first short phase, which occurred immediately after the first injection of HgCl_2 , was caused by the direct effect of mercury on tubular renal cells. A second phase began between 9 to 11 d, reached maximal values on day 13, and declined thereafter. By the third week, all animals reached background levels. When HgCl_2 -injected rats were treated with MMF after the first injection of mercury (group II), the urinary levels of protein excretion showed a drastic reduction ($P < 0.001$) compared with group I. Statistical differences were not observed between MMF-treated rats (group II) and rats from the normal control group (group IV). By contrary, when HgCl_2 -injected rats were treated with MMF after the disease was developed (group III),

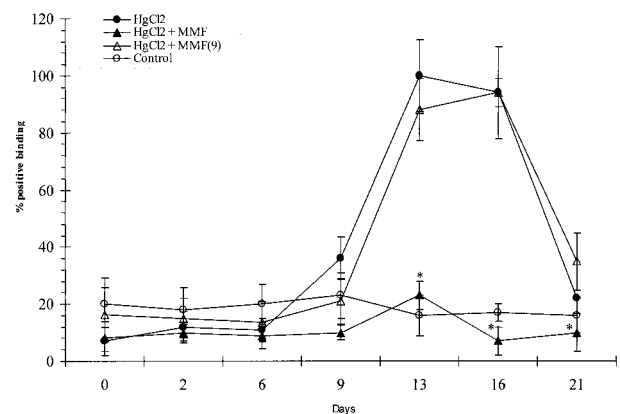


Figure 2. Levels of circulating anti-glomerular basement membrane (GBM) Abs. Percentage of positive binding of anti-GBM Ab in rats treated with HgCl_2 alone ($n = 20$), in rats treated with HgCl_2 plus mycophenolate mofetil (MMF) starting on day 0 ($n = 20$) or on day 9 ($n = 15$) of the experiments and in normal control rats ($n = 15$). Values are expressed as mean \pm SD. $*P < 0.001$, difference with mercury treated rats.

the levels of proteinuria were similar to those found in rats treated only with mercury (group I).

Effect of MMF on Anti-GBM Abs Production and Glomerular Anti-GBM Abs Deposition

MMF treatment prevents anti-GBM Ab production in HgCl₂-treated rats, but it was not able to inhibit such production after the disease was in progression. An increased anti-GBM Ab concentration was detected by ELISA in the serum of rats that were treated solely with mercury (group I) from day 9, being the maximal concentration observed at day 13 of the disease. Thereafter, serum levels of anti-GBM Abs started to decline, as occurred with the levels of proteinuria. Also, HgCl₂-injected rats (group I) showed, by direct immunofluorescence, a positive linear IgG rat deposition along the GBM, days 13 (Figure 3A) and 23 of the disease. By contrast, rats that in addition to mercury administration were treated with MMF starting on day 0 (group II) exhibited a drastic reduction (90%) in the serum levels of anti-GBM Abs, being said reduction maintained along the course of the experiment (Figure 2). Therefore, IgG glomerular deposition was not detected in this group of rats (Figure 3C). Nevertheless, when rats received MMF starting on day 9 (when the disease was developed, group III), significant reduction in neither anti-GBM Ab production nor the intensity of IgG deposition along the GBM (Figure 3B) was observed, compared with rats injected solely with HgCl₂ starting on day 0.

Effect of MMF on TNF- α Expression

Rats treated with HgCl₂ alone (group I) showed a sevenfold increase of TNF- α renal expression, expressed as relative units (TNF- α /L32), at day 13, compared with normal control rats (group IV) ($P < 0.001$) (Figure 4).

By contrast, mercury-treated rats that also received MMF (group II) showed a marked decrease in the levels of TNF- α mRNA expression, with no statistical differences having been found when compared with the normal control group.

On day 16, when the disease began to regress and proteinuria levels started to decline, TNF- α mRNA renal expression was similar in the three groups, with NS differences having been observed among them.

Effect of MMF on the Kinetics of TNF- α Serum Concentration

Serum TNF- α concentration was measured at different days of the experiment, using a commercial ELISA method. As shown in Figure 5, serum levels of TNF- α from HgCl₂-injected rats (group I) began to increase before day 9, reached maximal values at day 13 ($P < 0.001$), and then declined, returning to normal levels at day 22. When we analyzed the kinetics of TNF- α secretion in HgCl₂-injected rats, which also received MMF treatment (group II), TNF- α serum levels were similar to those found in rats from the normal control group (group IV). When HgCl₂-injected rats were treated with MMF starting at day 9 of the disease (group III), significant reduction in TNF- α serum levels was observed with rats treated with mercury

alone. These differences were also found with respect to normal control rats (group IV).

Effect of MMF on Renal Interstitial Cell Infiltrates

Light microscopy examination of renal tissue sections from rats treated with mercury alone (group I, $n = 8$) showed, at day 13 of the disease (Figure 6A), a pronounced interstitial nephritis, being less intense but still persisting on day 23. The interstitial cell infiltrates were preferentially located in the perivascular regions of the renal interstitium. Quantification in the HgCl₂-treated rats (group I) of interstitial inflammatory cells bearing the OX1⁺ surface molecule was 42 ± 6 cells/HPF (day 13) and 22 ± 4 cells/HPF (day 23), respectively. By contrast, in both groups of mercury-treated rats also receiving MMF at the beginning (group II, $n = 8$) or after the disease was developed (group III, $n = 8$) (Figure 6, B and C) as well as in normal control rats (group IV, $n = 8$), the number of interstitial infiltrating cells was practically absent on the same examined days. OX1⁺ cells were 3.5 ± 0.8 cells/HPF and 3 ± 0.9 cells/HPF (group II), 3.1 ± 0.7 cells/HPF and 2.6 ± 0.9 cells/HPF (group III), and 2.5 ± 0.5 cells/HPF and 2 ± 0.5 cells/HPF (group IV) on days 13 and 23 respectively.

Effect of MMF on VLA-4 Expression and Function

Results of FACS experiments showed that MMF did not induce significant changes in VLA-4 spleen lymphocyte surface expression when compared with lymphocytes from rats that did not receive the immunosuppressant, as shown in Figure 7.

Next we tested the effects of MMF on α -4 integrin function due to the relevance of VLA-4/VCAM-1 adhesion pathway in mercury-induced nephritis (27,29). As shown in Figure 8, MMF was able to reduce by 30% the binding of rat lymphocytes to immobilized VCAM-1. On the other hand, it has been shown that the mouse anti-human HP2/4 mAb (which cross-reacts with rat α -4 integrin) has the ability to block the attachment of rat lymphocytes to VCAM-1 (27). When HP2/4 mAb was added to rat lymphocytes, a proportional increasing reduction in the percentages of adhesion was found in both MMF-treated and normal rat lymphocytes (Figure 8).

Discussion

In this study, we have demonstrated the protective effect of MMF in mercury-induced autoimmune nephritis. Rats exposed to HgCl₂ develop a self-limiting autoimmune disorder characterized by hypergammaglobulinemia and synthesis of autoantibodies, mainly anti-GBM Ab (23). The renal lesions consist of linear rat IgG deposition on the glomerular basement membrane, severe proteinuria, and interstitial nephritis (24–26).

The development of autoimmunity in this model is not fully understood. It is known that HgCl₂ induces B cell proliferation dependent on autoreactive anti-class II Th2-cell subset in BN rats (36,37). In our study, we have found that MMF is able to block the production of auto-Abs against GBM in animals that have received the drug prior the induction of the disease.

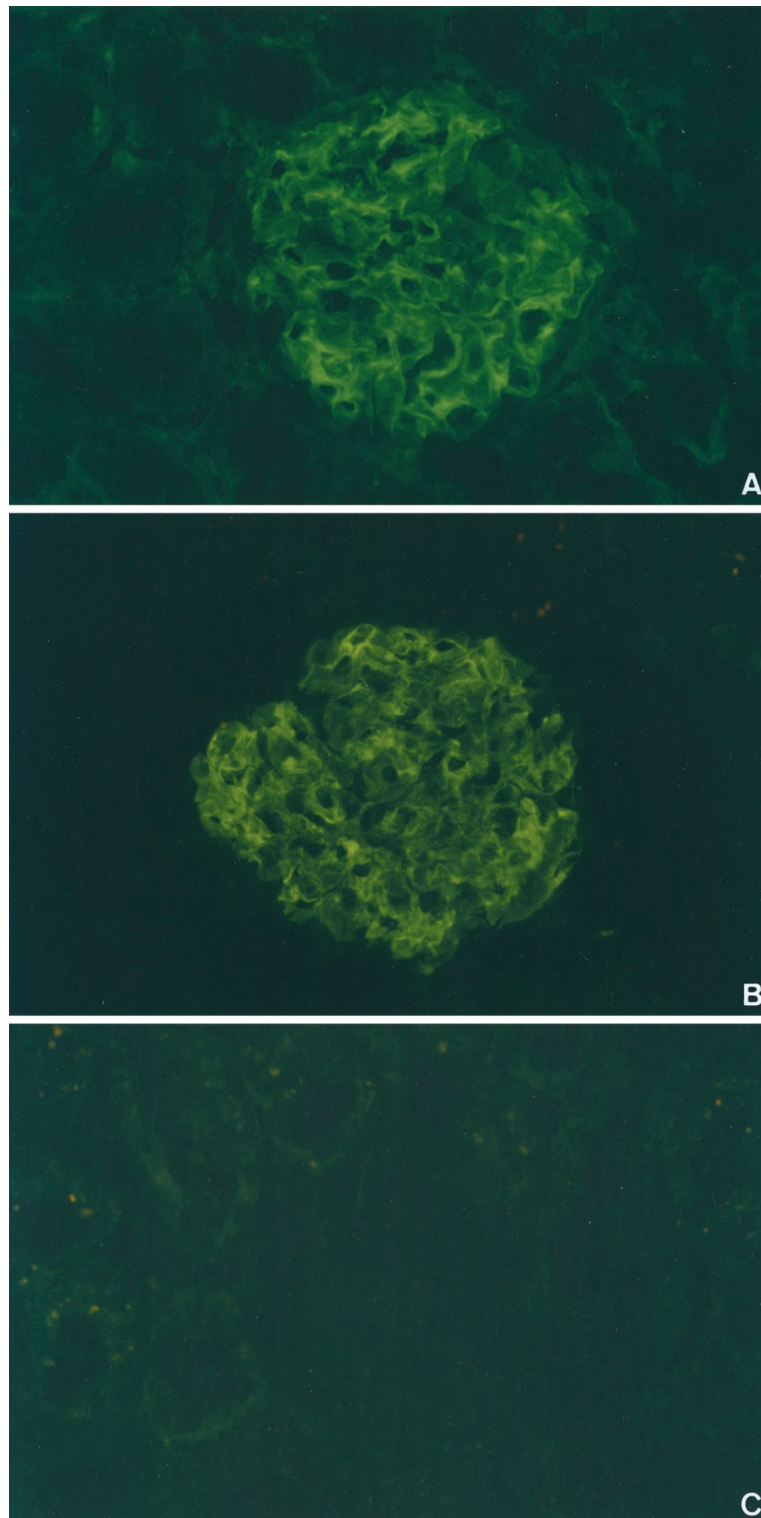


Figure 3. Immunofluorescence (IF) staining. Positive linear pattern deposition of rat IgG in rats treated with HgCl₂ alone (group I) (A) and in rats treated with HgCl₂ plus MMF starting on day 9 (group III) (B). Negative staining for rat IgG in rats treated with HgCl₂ and also receiving MMF since day 0 (group II) (C). Magnification, $\times 400$.

However, MMF was not able to exert immunosuppressive effects after the disease was in progression.

Several *in vitro* and *in vivo* studies have confirmed the immunosuppressive properties of MMF. Jonsson *et al.* (11)

have observed that MMF-treated lupus mice (MRL/lpr) showed little or no Ig deposits in renal glomeruli, in contrast to Van Bruggen *et al.* (38), who did not find these clear-cut immunomodulating properties in the same lupus model. It is

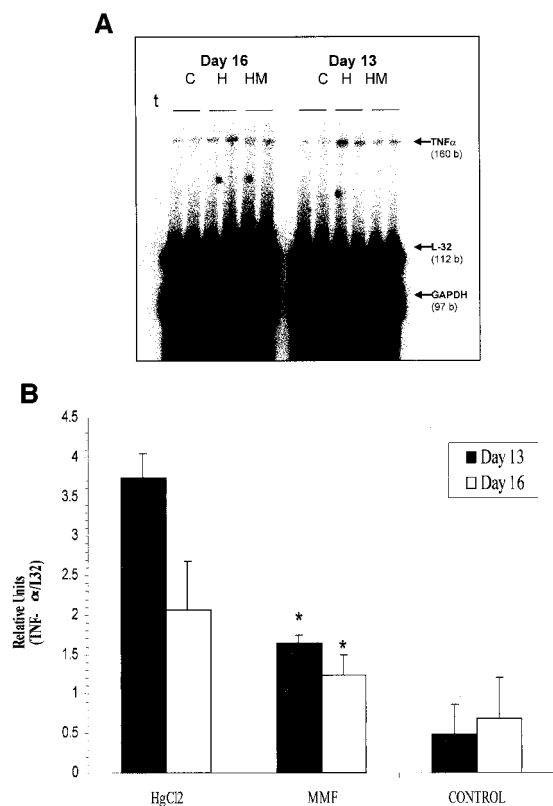


Figure 4. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) renal expression. Analysis of mRNA TNF- α by ribonuclease protection assay (RPA) in renal tissue from $n = 4$ rats of groups I, II, and IV (two rats representative from each group are shown) at day 13 (when nephritis was highly developed) and at day 16 (when the renal disease started to decline). (A) Representative RPA gel. Samples were organized at two time points (day 16 and 13 of the experiment) separated by an empty lane. Inside of each time point, samples were loaded on the gel as follows: first and second lanes were normal control samples from group IV (C), samples in the next two lanes were from HgCl₂-treated rats (group I) (H), and the last two lanes were from HgCl₂-treated rats also receiving MMF starting on day 0 (group II) (HM). t represents a 20- μ g tRNA control sample. (B) Densitometric analysis for TNF- α renal expression at days 13 and 16 of the disease. At day 13, mercury-treated rats (Group I) showed an increase in the TNF- α renal expression as compared with rats treated with mercury plus MMF (group II), which showed levels close to normal control rats (group IV). * $P < 0.001$, difference with mercury-treated rats. In contrast, TNF- α expression levels at day 16 were similar in all tested groups.

possible that such discrepancy might depend on the different doses of MMF given to MRL/lpr mice in each study. In this regard, we found that, when low doses of MMF (20 to 30 mg/kg wt) were administered to rats with mercury-induced nephritis, only a 40% reduction in anti-GBM Abs production was obtained, with no significant changes having been observed in the levels of proteinuria (data not shown). Nevertheless, when the dose of MMF was increased (80 mg/kg wt), a higher reduction (90%) in anti-GBM Ab production was found, which paralleled the drastic decrease in the urinary protein

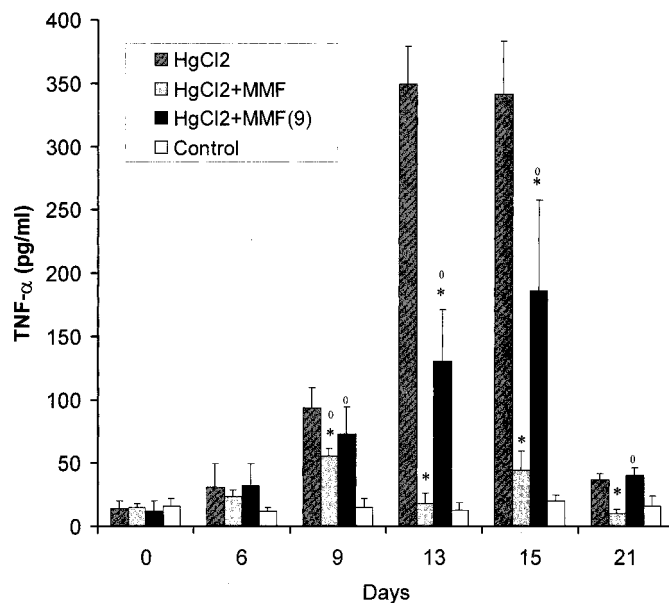


Figure 5. Kinetics of serum TNF- α . Serum levels of TNF- α along the course of the experiment in all tested groups. Results are expressed in pg/ml mean \pm SD. $n = 8$ per group. * $P < 0.001$ versus HgCl₂ treated rats (0); $P < 0.001$ versus normal control rats.

excretion. Our results have shown that the immunosuppressive effect of MMF on mercury-induced nephritis is dose-dependent, as has also been observed in other clinical and experimental MMF-treated diseases (39,40). However, we have found that even when the well-tolerated maximal dose of MMF was given to mercury-treated rats after the disease was in progress, the drug had no preventive effects on anti-GBM Ab production.

Adhesion molecules and their counter-receptors are determinant in leukocyte migration and extravasation to sites of inflammation. One possible mechanism of action of MMF may involve the VLA-4/VCAM-1 cell adhesion pathway. VLA-4 integrin is expressed mostly on leukocytes (41-43) and binds to the extracellular matrix protein fibronectin (44) and to VCAM-1 adhesion protein (45). It has been shown that the interaction between circulating leukocytes bearing VLA-4 molecules and endothelial cells expressing VCAM-1 molecules is crucial in the development of mercury-induced nephritis in BN rats. Previous data from our laboratory have shown that the administration of either anti-VLA-4 or anti-VCAM-1 mAbs to HgCl₂-injected rats completely blocked the influx of circulating leukocytes into the renal interstitium (27,29). It is well known that MMF inhibits the transfer of mannose and fucose to glycoproteins that function as adhesion molecules, including the VLA-4 molecule (2).

Our results have shown that MMF was able to reduce the adhesion of rat lymphocytes to VCAM-1; meanwhile, the surface expression of rat VLA-4 integrin, tested with three different Abs against VLA-4 molecule, was practically similar in both MMF-treated and untreated rat lymphocytes. Such observations, along with the lower basal adhesion and stronger HP2/4 mAb blockade of MMF-treated lymphocytes, strongly suggest that MMF could

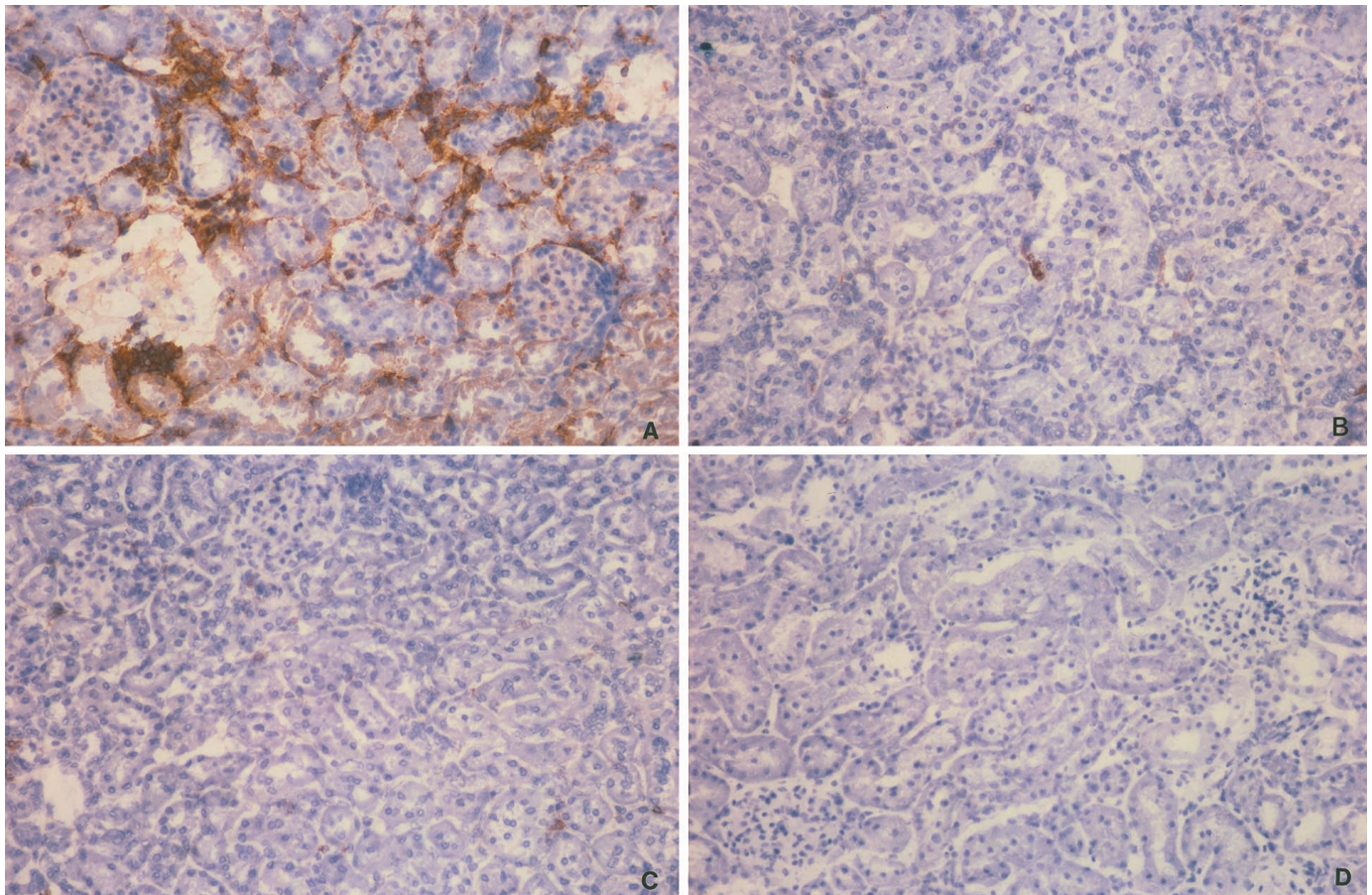


Figure 6. Immunoperoxidase (PO) staining with OX-1. (A) Prominent renal interstitial OX-1⁺ cell infiltrates in rats treated with HgCl₂ alone (group I). (B and C) Absence of renal interstitial inflammatory OX-1⁺ cells in rats treated with HgCl₂ plus MMF starting on day 0 (group II) and starting on day 9 (group III). (D) Negative staining for isotype IgG matched control. Magnification, ×300.

act by reducing the proportion of rat functional VLA-4 integrins. Therefore, it is feasible that MMF, by altering the VLA-4/VCAM-1 cell adhesion pathway, might interfere with extravasation of circulating leukocytes to the renal interstitium and could explain, at least in part, the abrogation of the renal inflammatory cell infiltrate, not only in the absence of renal lesions (which was expected) but even when anti-GBM Ab glomerular deposits and proteinuria were detected.

Unmodified renal expression and serum basal levels of TNF- α cytokine found in MMF-treated rats from the beginning of the disease indicate the absence of renal inflammatory damage and also support its protective effects on the development of this renal disease. By contrast, we have observed that MMF administration to mercury-injected rats had no therapeutic properties, as it is reflected by the lack of effects on anti-GBM Ab synthesis, IgG glomerular deposition, and proteinuria. On the other hand, the complete absence of interstitial cell infiltrates may decrease the amplification of renal inflammatory injury, consequently provoking the partial reduction found in TNF- α serum levels.

The mechanism(s) whereby MMF prevents this autoimmune renal disease might act by impeding auto-reactive Th2 cell subset activation, thus intercepting B cell stimulation

for producing anti-GBMs Abs. This blockade of the initial immune response avoids the development of the autoimmune syndrome. Consequently, we can assume that MMF has a strong effect on the primary immune response in this model. On the other hand, when the disease is initiated and lymphocyte cell-cell interactions as well as polyclonal activation are triggered, MMF therapy improvement is restricted to the blockade of lymphocyte extravasation to the renal interstitium. It is conceivable that, in addition to altering the VLA-4/VCAM-1 pathway, MMF could also be involved in other lymphocyte adhesion mechanisms as well as in chemokine/cytokine expression. Also, a possible direct effect of the drug on parenchymal renal cells cannot be ruled out (13,46–48).

Taking all these data into account, we conclude that MMF could be useful in the treatment of renal diseases associated with inflammation. More controlled trials with MMF as monotherapy or combined with other agents are required to warrant the clinical efficacy of this new drug.

Acknowledgments

This work was supported by Grants 00/0246 and 98/1211 from Fondo de Investigaciones Sanitarias and Grant 08.4/15/98 from Co-

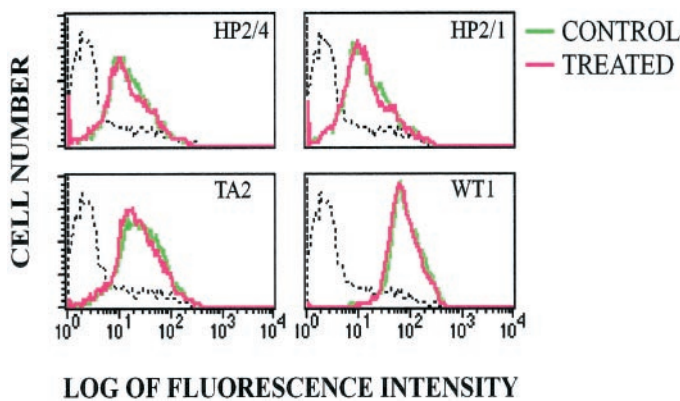


Figure 7. VLA-4 expression on spleen rat lymphocytes. Expression of VLA-4 molecule chain on rat lymphocytes from control (green line) and MMF-treated (red line) rats using three different antibodies (HP2/4, HP2/1, and TA2) against anti- α 4 chain. Cells were incubated with saturating concentrations of WT1 (as positive control), HP2/4, HP2/1, or TA2 mAb. Lymphocytes were then washed and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG. All samples were analyzed by flow cytometry.

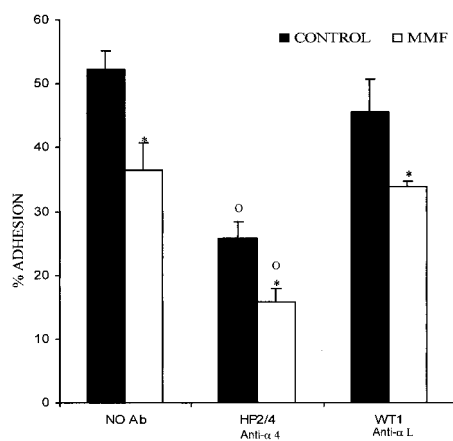


Figure 8. Adhesion of rat spleen lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Adhesion of spleen lymphocytes from MMF-treated and normal rats to recombinant VCAM-1 4D-Fc (2.5 μ g/ml). Results are given as mean \pm SD of $n = 4$ rats per group. * $P < 0.001$ versus control group (0); $P < 0.001$ versus no Ab.

munidad Autónoma de Madrid (Dr. Mampaso). We are grateful to Virginia Lynne Desbrow for her help in the manuscript correction. G.P.d.L. was supported by a postdoctoral fellowship from Spanish Ministerio de Educación y Cultura (Grant Ex 97/7230290).

References

- Allison A, Eugui E: Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 136: 5–27, 1993
- Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, Waters RV, Eugui EM: Mycophenolic-acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 25: 67–70, 1993
- Sollinger H: Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 60: 225–232, 1995
- Sollinger H: Update on preclinical and clinical experience with mycophenolate mofetil. *Transplant Proc* 28: 24–29, 1996
- European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group: Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 70: 401, 2000
- The Mycophenolate Mofetil Acute Renal Rejection Study Group: Mycophenolate mofetil for the treatment of a first acute renal allograft rejection: Three-year follow-up. *Transplantation* 71: 1091–1097, 2001
- Meier-Kriesche H, Ojo A, Leichtman A, Magee JC, Rudich SM, Hanson A, Cibrik DM, Kaplan B: Interaction of mycophenolate mofetil and HLA matching on renal allograft survival. *Transplantation* 71: 398–401, 2001
- Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB: Immunosuppressants: Cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis* 28: 159–172, 1996
- Chanaud NI, Vistica B, Eugui E, Nussenblatt R, Allison A, Gery I: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by mycophenolate mofetil, an inhibitor of purine metabolism. *Exp Eye Res* 61: 429–434, 1995
- Hao L, Chan S, Laffery K: Mycophenolate mofetil can prevent the development of diabetes in BB rats. *Ann NY Acad Sci* 696: 328–332, 1993
- Jonsson C, Svensson L, Carlsten H: Beneficial effect of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil on survival and severity of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus (SLE)-prone MRLlpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol* 116: 534–541, 1999
- Corna D, Morigi M, Facchinetti D, Bertani T, Zoja C, Remuzzi G: Mycophenolate mofetil limits renal damage and prolongs life in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int* 51: 1583–1589, 1997
- Penny M, Boyd R, Hall B: Mycophenolate Mofetil prevents the induction of active Heymann nephritis: Association with Th2 cytokine inhibition. *J Am Soc Nephrol* 9: 2272–2282, 1998
- Gaubitz M, Schorat A, Schotte H, Kern P, Domschke W: Mycophenolate mofetil for the treatment of systemic lupus erythematosus: An open pilot trial. *Lupus* 8: 731–739, 1999
- Fu Y, Liu G: Mycophenolate mofetil therapy for children with lupus nephritis refractory to both intravenous cyclophosphamide and cyclosporine. *Clin Nephrol* 55: 318–321, 2001
- Dooley M, Cosio F, Nachman P, Falkenhain ME, Hogan SL, Falk RJ, Hebert LA: Mycophenolate mofetil therapy in lupus nephritis: Clinical observations. *J Am Soc Nephrol* 10: 833–839, 1999
- Briggs W, Choi M, Scheel P: Successful mycophenolate mofetil treatment of glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 31: 213–217, 1998
- Briggs W, Choi M, Scheel P: Follow-up on mycophenolate treatment of glomerular disease (letter). *Am J Kidney Dis* 31: 898–899, 1998
- Herbert L, Cosio F, Bay W, Hernandez R, Lautman J: Mycophenolate mofetil (Cellcept, MMF) therapy of systemic lupus erythematosus and ANCA vasculitis. *Nephrol* 8: 87A, 1997
- Miller G, Zimmerman Rr, Radhakrishnan J, Appel G: Use of mycophenolate mofetil in resistant membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 36: 250–256, 2000

21. Pelletier L, Pasquier R, Hirsch F, Sapin C, Druet P: Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmune disease: in vitro demonstration. *J Immunol* 137: 2548–2554, 1986
22. Rossert J, Pelletier L, Pasquier R, Druet P: Autorreactive t cells in mercury-induced autoimmunity. Demonstration by limiting dilution analysis. *Eur J Immunol* 18: 1761–1766, 1988
23. Pusey C, Bowman A, Morgan A, Weetman A, Hartley B, Lockwood C: Kinetics and pathogenicity of autoantibodies induced by mercuric chloride in the brown Norway rat. *Clin Exp Immunol* 81: 76–82, 1990
24. Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening JJ: Mercuric chloride-induced autoimmunity in the brown Norway rat. Cellular kinetics and major histocompatibility complex antigen expression. *Am J Pathol.* 133: 127–138, 1988
25. Bowman C, Mason D, Pusey C, Lockwood C: Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown Norway Rat: A role for the T suppressor cells. *Eur J Immunol* 14: 464–470, 1984
26. Sapin C, Druet E, Druet P: Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown Norway rat by mercuric chloride. *Clin Exp Immunol* 28: 173–179, 1977
27. Escudero E, Nieto M, Martin A, Molina A, Lobb RR, Sánchez-Madrid F, Mampaso F: Differential effects of antibodies to vascular cell adhesion molecule-1 and distinct epitopes of the alpha4 integrin in HgCl₂-induced nephritis in Brown Norway rats. *J Am Soc Nephrol* 9: 1881–1891, 1998
28. Tamatani T, Kotani M, Tanaka T, Miyasaka M: Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. II. Differential regulation of LFA-1 in the interaction between lymphocytes and high endothelial cells. *Eur J Immunol* 21: 855–858, 1991
29. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martin A, Barat A, Alvarez V, Mampaso F: Prevention of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against the alpha 4 integrin. *J Immunol* 153: 2313–2320, 1994
30. Gimenez A, Mampaso F: Characterization of inflammatory cells in drug-induced tubulointerstitial nephritis. *Nephron* 43: 239–240, 1983
31. Mampaso F, Wilson C: Characterization of inflammatory cells in autoimmune tubulointerstitial nephritis rats. *Kidney Int* 23: 448–457, 1983
32. Mampaso F, Egado J, Martínez-Montero J, Bricio T, Gonzalez E, Pirozky E, Braquet P, Hernando L: Interstitial mononuclear cell infiltrates in experimental nephrosis: Effect of PAF antagonist. *Nephrol Dial Transplant* 4: 1037–1044, 1989
33. Bricio T, Mampaso F: Natural Killer function in the rat with interstitial nephritis. *Scand J Immunol* 33: 639–645, 1991
34. Yáñez-Mo M, Alfranca A, Cabañas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa MA, Ashman LK, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F: Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol* 141: 791–804, 1998
35. del Pozo M, Sánchez-Mateos P, Nieto M, Sánchez-Madrid F: Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131: 495–508, 1995
36. Goldman M, Druet P, Gleichmann E: TH2 cells in systemic autoimmunity: Insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol Today* 12: 223–227, 1991
37. Ochel M, Vohr H, Pfeiffer C, Gleichmann E: IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. *J Immunol* 146: 3006–3011, 1991
38. Van Bruggen MCJ, Walgreen B, Rijke TPM, Berden JHM: Attenuation of murine lupus nephritis by mycophenolate mofetil. *J Am Soc Nephrol* 9: 1407–1415, 1998
39. Neylan J: Immunosuppressive therapy in high-risk transplant patients: Dose-dependent efficacy of mycophenolate mofetil in African American renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 64: 1277–1282, 1997
40. Ziswiler R, Steinmann-Niggli K, Kappeler A, Daniel C, Marti H: Mycophenolic acid: a new approach to the therapy of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9: 2055–2066, 1998
41. Hemler M, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger J, Clabby M: Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* 262: 11478–11485, 1987
42. Berlin C, Bargatze R, Campbell J: alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80: 413–422, 1995
43. Lobb R, Hemler M: The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 94: 1772–1778, 1994
44. Wayner E, Garcia-Pardo A, Humphries M, McDonald J, Carter W: Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 109: 1321–1330, 1989
45. Elices M, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowsky j S, Hemler ME, Lobb RR: VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60: 577–584, 1990
46. Blaheta R, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Opperman E, Harder S, Scholz M, Weber S, Schuldes H, Encke A, Markus BH: Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transpl Immunol* 6: 251–259, 1998
47. Jones E, Shoskes D: The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. *J Urol* 163: 999–1004, 2000
48. Baer P, Gauer S, Hauser I, Scherberich J, Geiger H: Effects of mycophenolic acid on human renal proximal and distal tubular cells in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 15: 184–190, 2000

Functional Relevance of Activated $\beta 1$ Integrins in Mercury-Induced Nephritis

ESTHER ESCUDERO,* ANA MARTÍN,* MARTA NIETO,[†] ELENA NIETO,*
ELENA NAVARRO,* ALFONSO LUQUE,[‡] CARLOS CABAÑAS,[‡]
FRANCISCO SÁNCHEZ-MADRID,[†] and FRANCISCO MAMPASO*

*Department of Pathology, Hospital Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, [†]Immunology Section, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma, and [‡]Department of Biochemistry, Medical School, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Abstract. Cell adhesion through different adhesion molecules is a crucial event in the inflammatory response. Integrins can only bind and mediate cellular adhesion after their activation by different specific stimuli. The state of $\beta 1$ integrin activation can be assessed by a group of monoclonal antibodies (HUTS) that selectively recognize $\beta 1$ integrins in their active form. A similar activated epitope in the rat was defined using the anti-human monoclonal antibody HUTS-21, which recognizes an activation-dependent epitope on the $\beta 1$ chain. It was found that the divalent cations Mn^{2+} and Hg^{2+} were able to induce *in vitro* the activation of $\beta 1$ integrins on rat lymphocytes. The Hg^{2+} cation induces an autoimmune disease in the Brown Norway rat characterized by synthesis and glomerular deposits of anti-glomerular basement membrane antibodies, proteinuria,

and interstitial nephritis. Using the mercury model of nephritis, it was found that the expression of HUTS-21 epitope is induced *in vivo* in rat lymphocytes, and its appearance is correlated with the other parameters at the onset of the disease. In addition, the administration of HUTS-21 monoclonal antibody to $HgCl_2$ -treated rats offered evidence of its protective effects (1) against infiltration of renal interstitium by leukocytes, and (2) in the reduction of anti-glomerular basement membrane synthesis and glomerular deposition. Nevertheless, urinary protein values remained unaffected. These results demonstrate a key role of $\beta 1$ -activated integrins in both leukocyte cell-cell interactions and leukocyte infiltration pathway mechanism, and also indicate that leukocyte migration may have less importance in the development of this disease than previously thought.

The leukocyte adhesion to endothelium and the subsequent extravasation through the vascular wall into tissues are crucial steps in the genesis of an inflammatory response, which are regulated by several proinflammatory factors (1–5). The integrins, an important family of the adhesion molecules, are central to many of these adhesion-dependent events. The $\beta 1$ or very late activation antigen (VLA) are a subgroup within the integrin family comprising at least 10 members, each with a distinct α subunit noncovalently associated with the common $\beta 1$ subunit (6–8). The cellular adhesion through integrins can rapidly be regulated by reversible modulation of receptor function. One mechanism implicated in the upregulation of integrin-mediated adhesion consists in the induction of transitions to a high affinity state in a small fraction of integrin receptors, probably as a consequence of conformational changes of these molecules (9). These changes can be modulated by different factors such as the concentration of divalent cations, physiologic ligands, or monoclonal antibodies (mAb), among others (7,9–11).

Other investigators have reported the existence of a specific and regulatory region in the common $\beta 1$ subunit (CD29) of VLA integrins, whose expression is regulated upon cell activation, and it correlates with the ligand binding activity of these heterodimeric glycoproteins (11–16). The state of integrin activation can be assessed by a group of monoclonal antibodies (HUTS) that selectively recognize integrins in their active form. In addition, it has been shown that HUTS-21 mAb recognizes an epitope whose expression is induced upon ligand binding to the $\beta 1$ integrins on T lymphoblasts (11,17).

In the present study, we have found that the human HUTS-21 mAb also recognizes $\beta 1$ integrins on rat lymphocytes activated with divalent cations such as Mn^{2+} and Hg^{2+} . It is well known that Hg^{2+} induces an autoimmune disease in the Brown Norway (BN) rat mediated by T-dependent polyclonal B cell activation and resulting in synthesis of autoantibodies (mainly, anti-glomerular basement membrane [GBM] antibodies) with glomerular linear deposits of IgG, proteinuria, and interstitial mononuclear cell infiltrates (18).

Considering the recently described expression of activated $\beta 1$ integrins in a small proportion of lymphoid cells at sites of inflammation in human autoimmune chronic inflammatory diseases (19), we have examined the expression and possible role of activated $\beta 1$ integrins in the mercury-induced model of nephritis. Our results demonstrate the capacity of HUTS-21 mAb to recognize *in vivo* an activation-dependent $\beta 1$ epitope

Received March 2, 1999. Accepted October 7, 1999.

Correspondence to Dr. Francisco Mampaso, Pathology Department, Hospital Ramón y Cajal, Carretera Colmenar km 9.100, 28034 Madrid, Spain. Phone: +91 336 8052; Fax: +91 336 9016; E-mail: fmampaso@hrc.insalud.es

1046-6673/1106-1075

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2000 by the American Society of Nephrology

as well as its positive/negative effects on this autoimmune experimental disease.

Materials and Methods

Animals

BN rats, weighing 150 to 180 g, were obtained from IFFA-Credo (Paris, France) and from our own breeding colony and maintained under standard conditions, with free access to food and water.

Monoclonal Antibodies

The mouse anti-human HUTS-21 mAb, which reacts with an activation-dependent epitope on the VLA- β 1 chain (CD29), has already been described (11,17). The mouse anti-human HP2/1 mAb is directed toward the α 4 integrin (20) and cross-reacts with the rat α 4 integrin (21,22). The mouse anti-rat OX1 mAb, specific for the pan-leukocyte CD45 antigen (23), was purchased from Serotec (Oxford, United Kingdom).

Flow Cytometry Assays

To assay the effects of $MnCl_2$ and $HgCl_2$ on the activated β 1 subunit expression, whole-blood samples from normal control rats were incubated with a saturating concentration of HUTS-21 mAb for 15 min at 37°C in HEPES/NaCl buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/ml D-glucose, pH 7.4) containing 0.9 mM Mn^{2+} or 7.5 μ M $HgCl_2$. After washing, cells were incubated with FITC-conjugated goat-anti-mouse IgG (Becton Dickinson, Mountain View, CA) secondary antibody for 30 min at 4°C in the dark. The erythrocytes were lysed, leukocytes were fixed, and cellular membranes were stabilized in fluorescence-activated cell sorter (FACS) lysing solution (Becton Dickinson). OX1 mAb and only the direct application of the secondary antibody were used as positive and negative controls, respectively. The samples were analyzed using a FACScan cytometer (Becton Dickinson).

To investigate the effects of $HgCl_2$ in the *in vivo* expression of activated β 1 integrins, a group of rats ($n = 5$) was injected subcutaneously with $HgCl_2$ three times a week for 2 wk with 100 μ g of $HgCl_2$ per 100 g body wt (18). To establish the kinetics of the expression of HUTS-21 epitope throughout the course of the disease, animals were sequentially bled on different days of the experiment by tail artery puncture. Then, whole blood samples were incubated with saturating concentration of HUTS-21 mAb for 15 min at 37°C, washed, and incubated with FITC-conjugated goat-anti-mouse IgG (Becton Dickinson) secondary antibody for 30 min at 4°C in the dark. Then, samples were processed using the same procedure as above and further analyzed by flow cytometry.

Experimental Procedure

Four groups of rats were used in this study. Groups I to III were injected with 100 μ g of $HgCl_2$ per 100 g body wt, following the same procedure as described above to induce the disease. Group I ($n = 12$) did not receive any additional treatment. Rats from group II ($n = 12$) and group III ($n = 12$) also received an intraperitoneal injection (0.5 mg) of HUTS-21 or OX1 mAb on days 0, 8, and 13, respectively. Group III was used as control of HUTS-21 mAb administration. Group IV ($n = 12$) served as a normal control in which rats received distilled water adjusted to pH 3.8 (the same pH of the $HgCl_2$ solution used), following the same procedure described above for the mercury administration. The animals were sequentially bled by tail artery puncture and sacrificed on different days of the experiment.

Urinary Protein Excretion

Animals were maintained in metabolic cages for 24 h to collect urine samples and had free access to food and water. Urine samples were taken at regular intervals starting on day 0. The amount of protein was measured in triplicate by using a Bio-Rad assay (Bio-Rad, Richmond, CA), according to the manufacturer's protocol. The optical density from each sample was measured in a Titertek Multiskan Plus spectrophotometer (Flow, Irvine, Scotland, United Kingdom) at 595 nm.

Anti-GBM Antibody Assays

Rat GBM was isolated using essentially the same procedure described by Bowman *et al.* (24). Briefly, glomeruli were obtained from normal BN rats by differential sieving and centrifugation of minced kidney cortices. The glomerular suspension was sonicated, washed, and lyophilized. The GBM was digested with type I collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at 0.7% wt/wt for 1 h at 37°C. Anti-GBM antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously (24). Briefly, 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with rat GBM (100 μ l/well of 10 μ g/ml GBM in 0.1 sodium carbonate buffer, pH 9.6) by overnight incubation at 4°C and then washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (Sigma). Wells were filled with 100 μ l of sera (1:100 diluted) to be tested. Plates were incubated for 1 h at 37°C. After incubation with peroxidase-labeled rabbit anti-rat IgG antibody (Serotec), peroxidase activity was revealed and absorbance was measured at 492 nm by using a Titertek Multiskan Plus (Flow).

Samples of a serum pool from untreated BN rats and from BN rats that were treated with $HgCl_2$ and bled on day 13 of the disease served as negative and positive controls, respectively. Results were expressed as the percentage of binding obtained with samples from positive control serum.

Kidney Tissue Processing

On day 15 of the experiment (when the interstitial cell infiltration was still highly present) (22), rats from each group were sacrificed. Kidneys were harvested and further processed for histologic, immunohistochemical, and electron microscopy studies. For light microscopy, 2- μ m paraffin-embedded kidney sections were stained with hematoxylin and eosin and periodic acid-Schiff. For immunohistochemistry studies, pieces of renal tissue were snap-frozen in isopentane precooled in liquid nitrogen, and stored at -70° C until used. Direct immunofluorescence studies were performed on ether/ethanol-fixed serial cryostat sections by using FITC-conjugated rabbit anti-rat IgG (Serotec), as reported previously (25). To characterize OX1 and HUTS-21-positive cells in the renal interstitium, frozen kidney sections were stained with those mAb and revealed with an indirect immunoperoxidase method (26). Enumeration of interstitial infiltrating cells bearing OX1⁺ cell surface markers was determined by counting, in two kidney tissue sections per each rat, the total number of positive-labeled cells examined in 10 randomly chosen areas of interstitial infiltrates. The ratio of infiltrating cells expressing activated β 1 subunit (HUTS-21⁺ cells) to the total number of OX1⁺ cells was obtained using a conventional light microscopy objective (\times 60), as described (27). For ultrastructural studies, the renal tissue was fixed immediately in 2.5% glutaraldehyde in 1.1 M cacodylate buffer for 2 h, followed by post-fixation in osmium tetroxide. Then, tissue was dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Epon 812. Thin sections for ultrastructural examination were stained with lead citrate and examined at 75 kV with a Jeol 100CX electron microscope.

Statistical Analyses

The results are given as mean \pm SD values obtained from the levels of proteinuria and ELISA results. Data were analyzed using two-way ANOVA, and when the statistical difference was significant, data were also analyzed using the *t* test with the Bonferroni correction.

Results

Recognition of Activated $\beta 1$ Integrins on Rat Lymphocytes by HUTS-21 mAb

To assess the cross-reactivity of the mouse anti-human activated $\beta 1$ integrin (HUTS-21) mAb with the same subunit in the BN rat, rat lymphocytes obtained from whole blood were incubated with saturating concentrations of HUTS-21 mAb in the presence of Mn^{2+} and Hg^{2+} in the medium. Samples were

analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 1, the presence of either Mn^{2+} and Hg^{2+} cations induced the expression of the epitope recognized by HUTS-21 mAb.

Induced Expression of HUTS-21 Activated Epitope on Rat Lymphocytes through the Course of the $HgCl_2$ -Induced Nephritis

To establish the kinetics of HUTS-21 expression *in vivo*, whole blood samples of $HgCl_2$ -treated rats ($n = 5$), obtained at different days of the disease, were incubated with a saturating concentration of HUTS-21 mAb and analyzed by flow cytometry. Figure 2 shows the time course of the expression of the activated $\beta 1$ subunit epitope on rat lymphocytes. The maximal

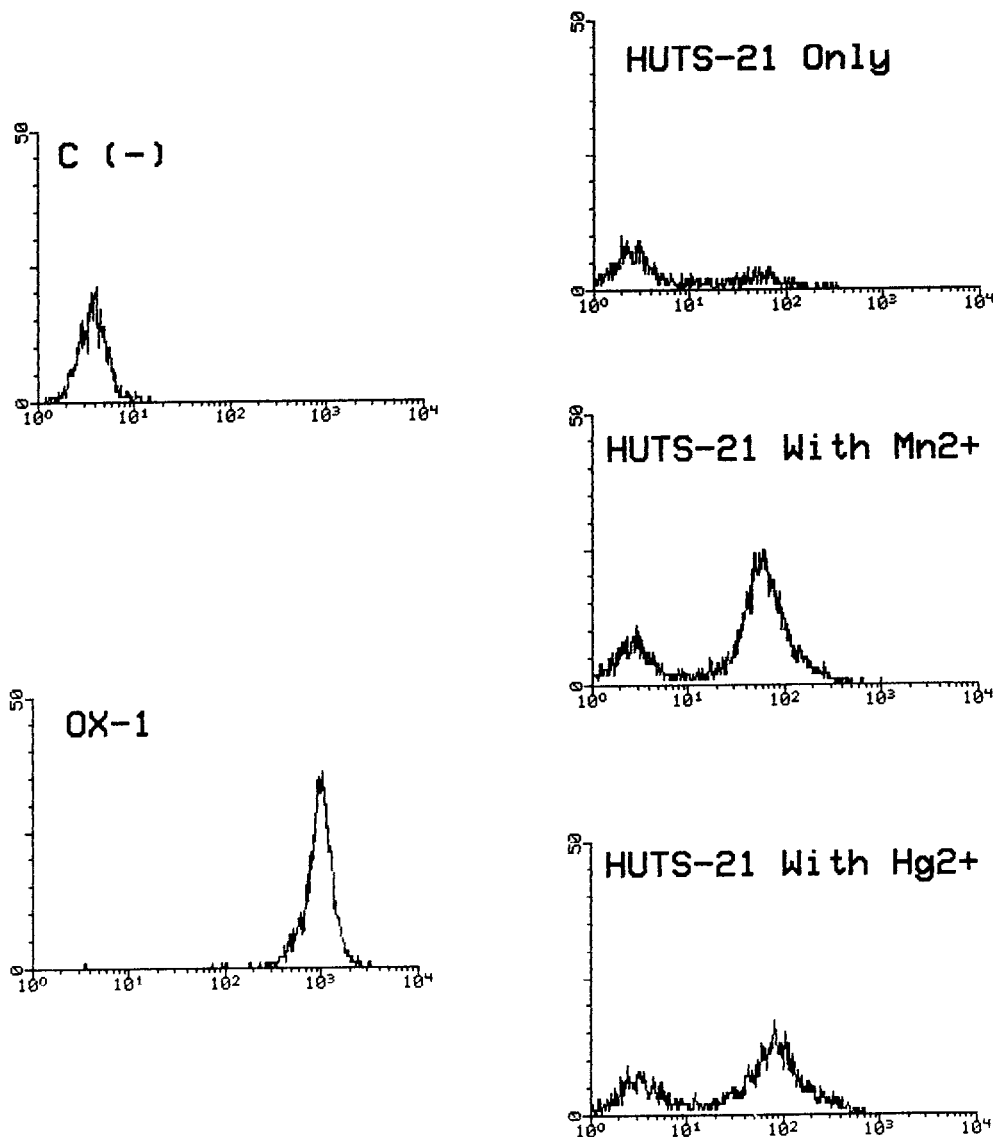


Figure 1. Recognition of activated $\beta 1$ integrins on rat lymphocytes by HUTS-21 monoclonal antibody (mAb) in the presence of $MnCl_2$ and $HgCl_2$ in the medium. Cells were incubated with a saturating concentration of the anti-activated $\beta 1$ integrins HUTS-21 mAb in medium with or without Mn^{2+} and Hg^{2+} . Lymphocytes were then washed and incubated with FITC-conjugated goat-anti mouse IgG. OX1 mAb and the direct application of only the secondary antibody were used as positive and negative controls, respectively. All samples were analyzed by flow cytometry.

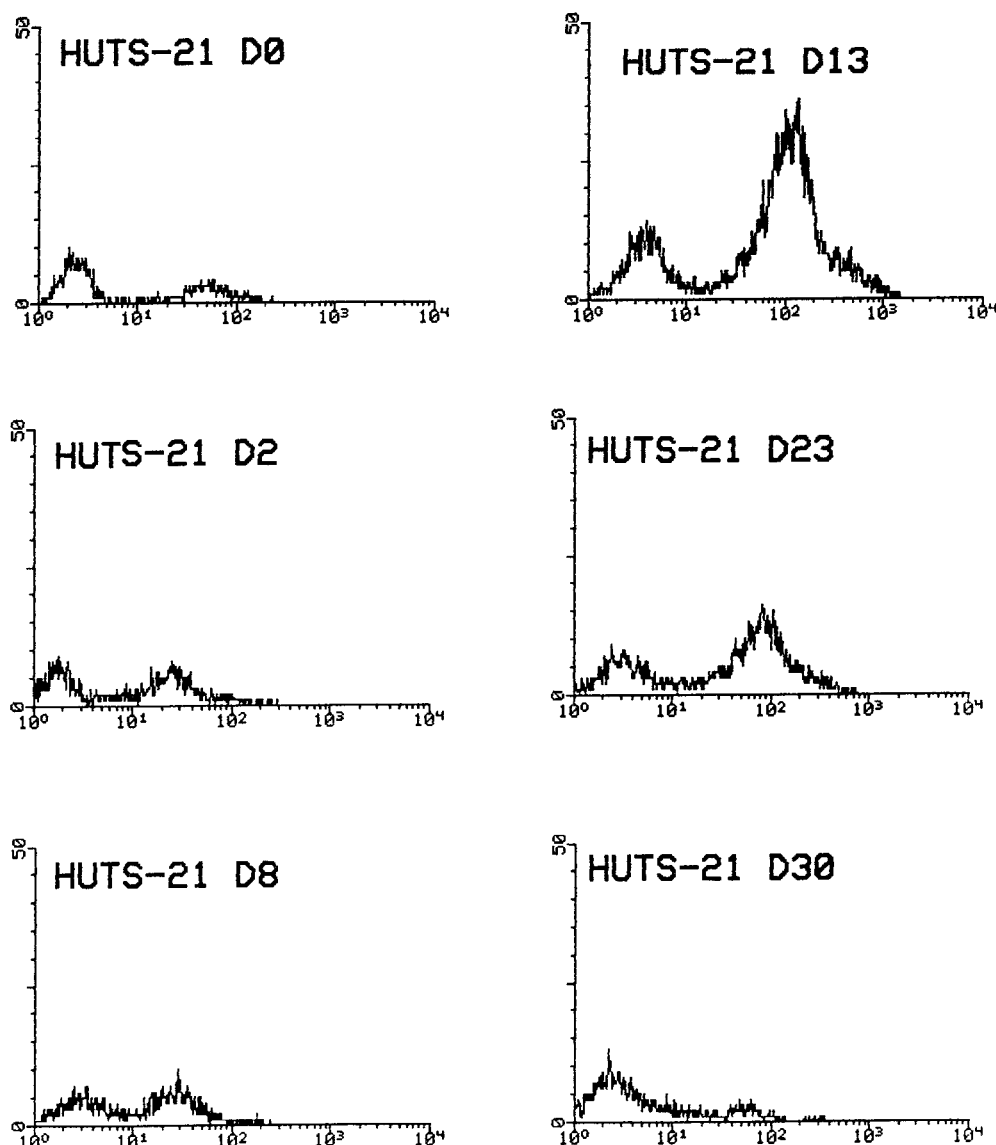


Figure 2. Expression of HUTS-21 activated $\beta 1$ epitope on rat lymphocytes through the course of the HgCl_2 -induced nephritis. Whole blood samples were obtained on different days of the disease. Samples were incubated with a saturating concentration of HUTS-21 mAb. The erythrocytes were lysed, leukocytes fixed, and cellular membranes stabilized in FACS-Lysis solution. OX1 mAb and the direct application of only the secondary antibody were used as positive and negative controls, respectively. All samples were analyzed by flow cytometry.

expression of HUTS-21 epitope was obtained between days 13 and 15, with the expression declining after day 23 to reach the background levels at day 30 of the disease.

Effect of HUTS-21 mAb Treatment on the Proteinuria of HgCl_2 -Injected BN Rats

As shown in Figure 3, HgCl_2 -treated rats (group I) developed proteinuria in two different phases: a first short phase, which started immediately after the first injection of HgCl_2 , followed by a second phase starting on day 11 and declining after day 16 of the disease. At the third week, all of the animals reached the background protein levels. The treatment with anti-activated $\beta 1$ epitope HUTS-21 mAb (group II) did not modify the time course of the urinary protein excretion levels. Electron microscopy examination of the kidney of rats from

groups I and II showed similar striking abnormalities of glomerular epithelial cells with edema and extensive effacement of the podocyte foot processes. No other ultrastructural glomerular alterations were observed (Figure 4, A through C).

Effect of HUTS-21 mAb Treatment on Anti-GBM Antibody Production and Glomeruli Deposition

As shown in Figure 5, the sera from rats injected with HgCl_2 (group I) presented circulating antibody anti-GBM as detected by ELISA. The maximal concentration of anti-GBM antibody was detected on day 13 of the disease, decreasing thereafter as also occurred with the proteinuria. By direct immunofluorescence methods, rats treated only with mercury showed a linear IgG glomerular deposition along the GBM on examination at day 15 of the disease, as demonstrated in Figure 6A. Rats that

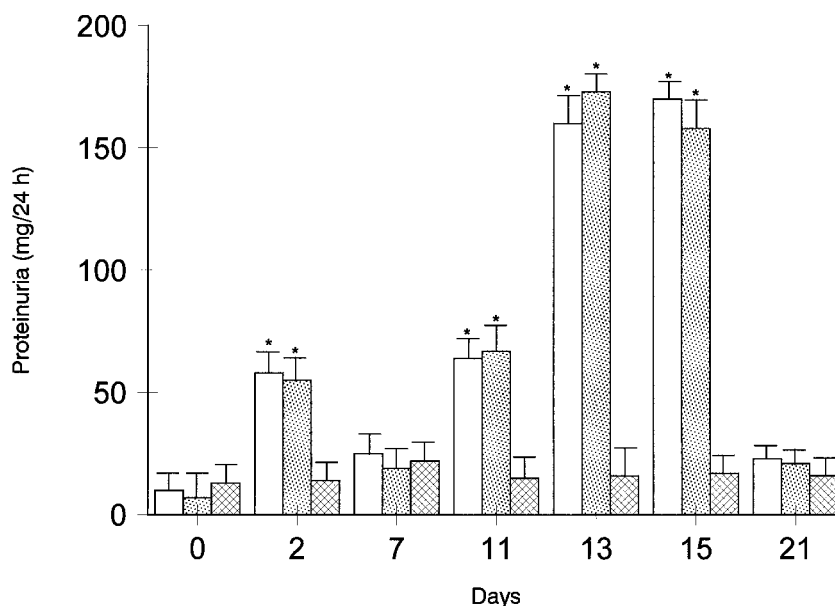


Figure 3. Urine protein excretion ratio in all tested groups. Results are expressed as mean \pm SD. \square , HgCl₂; \cdot , HUTS-21; ▨ , control.

in addition to mercury administration were treated with anti-activated β 1 epitope HUTS-21 mAb (group II) exhibited a significant reduction in the anti-GBM antibody serum levels (40%) (Figure 5). This drop in circulating anti-GBM antibody was maintained throughout the course of the disease. Also, a reduction in the intensity of IgG linear deposits on the GBM was found in this group of rats (Figure 6B).

To saturate the target protein, the following alternative therapeutic protocol was performed: Mercury-treated rats received daily an intraperitoneal injection (0.5 mg) of HUTS-21 mAb ($n = 6$) or OX1 mAb ($n = 6$), starting on day 0 and finishing on day 14 of the experiment. Despite having increased the total dose of HUTS-21 mAb from 1.5 to 7.5 mg, the levels of circulating anti-GBM antibody and the intensity of linear IgG glomerular deposits were not further decreased, and proteinuria remained unaltered (data not shown). These results suggest that the doses of HUTS-21 mAb used in both protocols were saturating.

Expression of HUTS-21 β 1 Activation Epitope in Kidney Tissue and Effects of Anti-HUTS-21 mAb Administration on Interstitial Cell Infiltrates

Renal tissue sections from rats treated with HgCl₂ alone (group I) and rats treated with HgCl₂ + HUTS-21 mAb (group II) were examined by light microscopy on day 15 of the disease. Renal tissue sections from normal rats served as control (Figure 7A).

Pronounced patchy areas of interstitial mononuclear cell infiltrates were located preferentially in the perivascular regions of the renal interstitium in HgCl₂-treated rats (Figure 7B). To characterize the total number of lymphohemopoietic infiltrating cells and to assess the HUTS-21 expression in the interstitial cell infiltrates, frozen kidney tissue sections were stained with anti-CD45 (OX1) and anti-activated β 1 subunit epitope (HUTS-21) mAb. The number of OX1⁺ inflammatory

interstitial cells found in HgCl₂-treated rats was 36 ± 7 cells/high-power field, and the proportion of HUTS-21⁺ cells that formed part of such infiltrates was $>95\%$ (Figure 7, B and C).

The effect of HUTS-21 mAb treatment on the intensity of interstitial cell infiltrate was also examined. Figure 7D showed that the number of OX1⁺-infiltrated cells in the renal tissue from rats treated with HUTS-21 (OX1⁺ cells/high-power field) was considerably reduced (4.5 ± 0.9) compared with the OX1⁺ cells from HgCl₂-treated rats alone (36 ± 7).

Discussion

Cell communication through different adhesion molecules is an essential event in the inflammatory response (1–5). Cellular adhesive properties are regulated through the selective expression of the integrin repertoire, as well as by the modulation of the binding properties of these receptors (9). The β 1 subfamily of integrins function mainly as cellular receptors for extracellular matrix proteins, and they are also implicated in cell-cell interactions (7,28). The expression of β 1 integrin activation epitopes at sites of tissue injury in inflammatory processes has also been described, suggesting a key role of β 1 integrin activation in the development of inflammatory processes (19). The state of integrin activation can be assessed by a group of monoclonal antibodies (HUTS) that selectively recognize β 1 integrins in their active form. These epitopes are expressed on activated β 1 integrins by different stimuli, and their expression correlates with the binding activity of β 1 integrins to immobilized ligands (11,16,17).

In this study, we have analyzed the expression of the β 1-activated epitope recognized by HUTS-21 mAb in an animal model of autoimmune nephritis, induced by HgCl₂. Our results show the expression of a similar activated β 1 epitope in rat lymphocytes, as demonstrated by the reactivity of HUTS-21 mAb with rat lymphocytes in the presence of the divalent cations Mn²⁺ and Hg²⁺. It is well known that Hg²⁺ cation

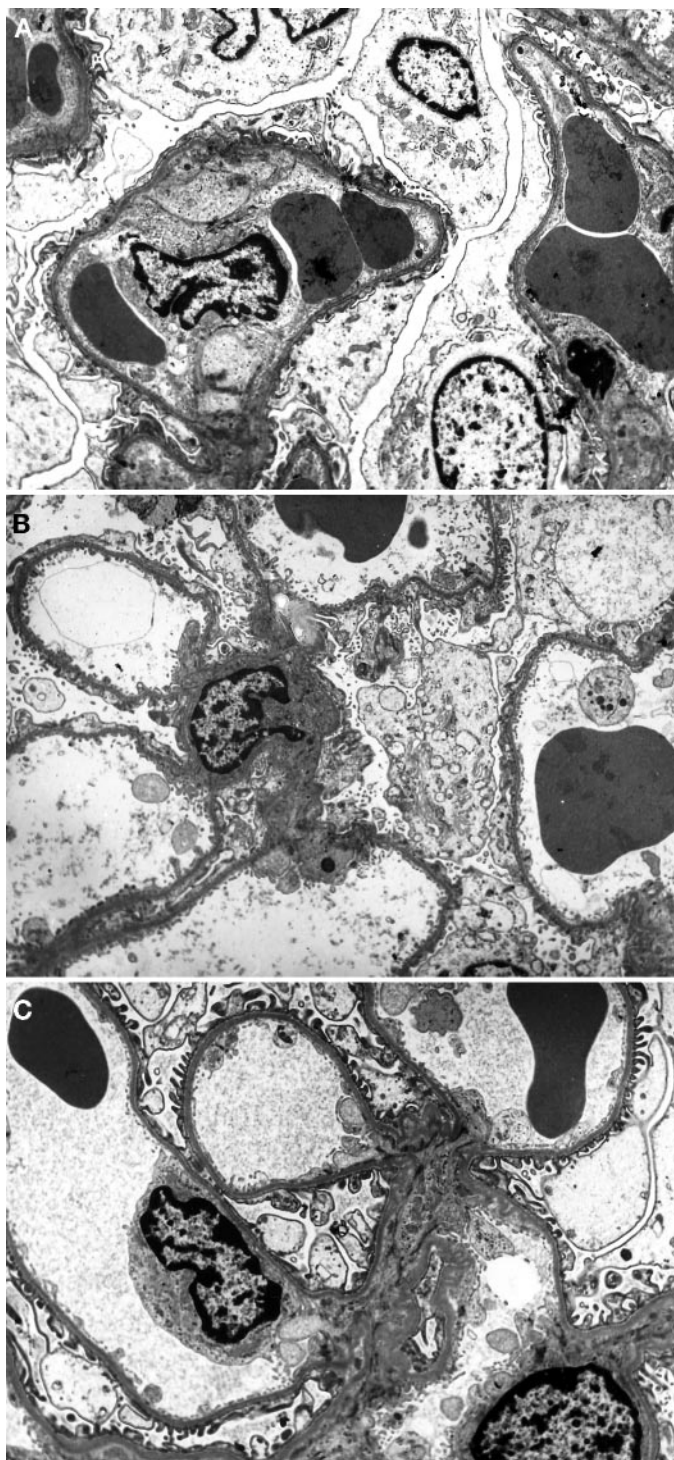


Figure 4. Ultrastructural micrographs from rats injected with HgCl_2 alone (A) and rats also treated with HUTS-21 mAb (B), showing both edema of the epithelial cell cytoplasm with prominent foot processes obliteration. Normal control rats show a well-preserved morphologic appearance of the foot-processes (C). Magnification: $\times 5200$ in A and B; $\times 5600$ in C.

induces an autoimmune disease in the BN rat characterized by the synthesis of autoantibodies (mainly, anti-GBM antibody) with glomerular linear deposits of IgG, severe proteinuria, and

acute tubulointerstitial nephritis (18,22,24,29,30). The development of this experimental autoimmune model is a consequence of the generation of an autoreactive T cell subset inducing a polyclonal B cell activation (31,32). It has been shown previously that interaction between circulating leukocytes expressing VLA molecules and endothelial cells is a crucial event in the development of this renal disease (22,29,30). Taking into account that activated $\beta 1$ integrins are expressed in a small proportion of lymphoid cells in different human autoimmune chronic inflammatory diseases (19), it was of interest to know the possible expression of leukocyte-activated $\beta 1$ integrins in the mercury model of nephritis. Our data demonstrate the induced expression by lymphocytes in this *in vivo* model of the activation-dependent epitope of the $\beta 1$ (VLA) integrins, which paralleled the other parameters in the onset of the disease. In this regard, we have found that the expression of the HUTS-21 epitope on rat peripheral blood lymphocytes was maximal on days 13 to 15 of the disease, as occurred with the levels of circulating autoantibodies, proteinuria, and intensity of interstitial nephritis (22,29,30). Our findings suggest a role of $\beta 1$ -activated receptors in the development of this experimental autoimmune disease, and thus we have investigated whether HUTS-21 mAb was able to exert any blocking effect when it was used as a therapeutic agent. The administration of HUTS-21 mAb to HgCl_2 -treated rats abrogated the renal interstitial mononuclear cell infiltrates and reduced the levels of circulating anti-GBM antibodies and glomerular deposition. Nevertheless, urinary protein values were unaffected.

It is feasible that the blocking effects observed after HUTS-21 mAb administration on leukocyte extravasation and migration into the renal interstitium were due to conformational changes in the integrin molecules, inducing an increase of the ligand binding affinity. These *in vivo* results concur with previous *in vitro* studies showing that the engagement of $\beta 1$ integrins by HUTS-21 causes functional inhibition of $\beta 1$ integrin-dependent dynamic processes, such as cell migration on extracellular matrix proteins or endothelial cell ligands (17). It has been reported previously (33–35) that the cell migration requires a gradient of adhesive strength from the front to the rear of the migrating cell that determines cell movement and that the cell migration could be inhibited by changes in this delicate balance of adhesion/release (35–38). It is therefore conceivable that HUTS-21 mAb treatment could affect this adhesion/release balance. On the other hand, engagement of $\beta 1$ epitope HUTS-21 inhibits migration of T lymphoblasts on vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin substrates, but has no effect over intercellular adhesion molecule-1 migration (17). Our results demonstrate that HUTS-21 mAb administration was able to abrogate the renal interstitial cell infiltrates, thus strongly supporting that leukocyte migration from blood to renal interstitium is mediated by the VLA/vascular cell adhesion molecule-1 adhesion pathway in this particular disease model, in accordance with previous studies (22,29,30). Moreover, our findings indicate that the expression of active conformations of $\beta 1$ integrins is involved in the

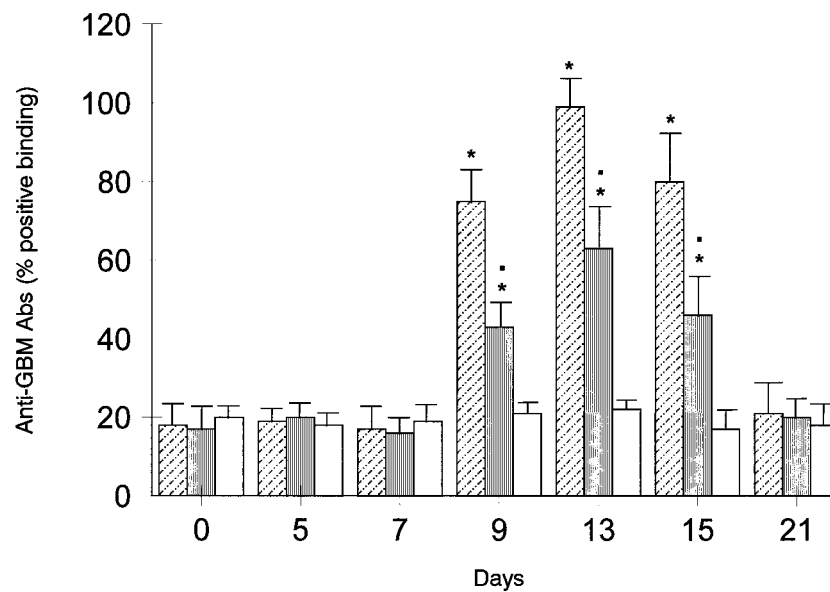


Figure 5. Levels of circulating anti-glomerular basement membrane autoantibodies in HgCl₂-injected rats (▨), in rats treated with HUTS-21 and OX1 mAb (▤), and in the normal control group (□). Values are expressed as mean \pm SD. * $P \leq 0.01$, difference with the normal control group. ■ $P \leq 0.5$, difference with the HgCl₂-treated group.

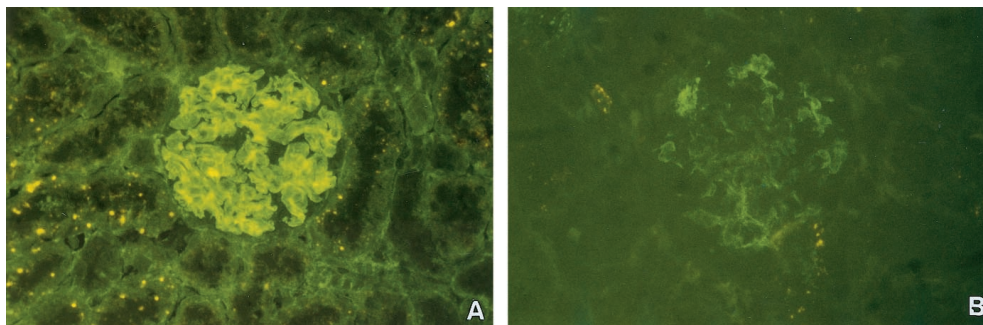


Figure 6. Immunofluorescence staining. Positive linear pattern deposition of rat IgG in rats treated with HgCl₂ alone (A) and in rats that were also injected with HUTS-21 mAb (B). Panel B shows a reduction in the intensity of the deposits.

leukocyte recruitment into the renal interstitium and also in the development of this inflammatory disease.

In addition to the protective effect of HUTS-21 mAb treatment in the development of renal cell infiltrates, we found a reduction in the levels of circulating anti-GBM antibodies, as well as in the intensity of glomerular IgG deposition. This last observation suggests a role for activated β 1 integrins in T cell–B cell interactions implicated in the synthesis of the autoantibodies in this experimental model. Nevertheless, the incomplete reduction of anti-GBM antibody production after HUTS-21 mAb administration suggests that other mechanisms are at work in the autoantibody synthesis. This issue is supported by our previous observation, in which anti- α 4 chain HP2/1 mAb treatment abolished anti-GBM antibody synthesis (22). Of interest, the persistence of high urinary protein excretion levels after *in vivo* administration of HUTS-21 mAb to HgCl₂-treated rats suggests that the reduction in the levels of circulating anti-GBM antibody and glomerular IgG linear deposits are not enough to prevent the development of protein-

uria. In this regard, it has been previously demonstrated that the induction of injury with heterologous anti-GBM antibody can be related to micrograms of antibody bound per gram of kidney in terms of molecules per glomerulus. Quantitative studies showed that 75 μ g of antibody bound per gram of kidney, or approximately one molecule for 26 μ m² of glomerular filtering surface, is necessary to induce proteinuria in the rat. Most probably and depending also on steric factors, at least half of the filtering surface would be covered by the antibody (39). By electron microscopy, we have found similar ultrastructural glomerular alterations in both HgCl₂-treated rats with persistent proteinuria and in those rats that also received HUTS-21 mAb treatment, independently of the intensity of anti-GBM antibody deposition. Once proteinuria develops, it may exert a pathologic effect by itself as enhanced uptake of plasma proteins by glomerular epithelial cells does occur in proteinuric states and may eventually lead to the production of mediators with an injurious effect on the cellular components of the filtration barrier (40). On the other hand, the complete abro-

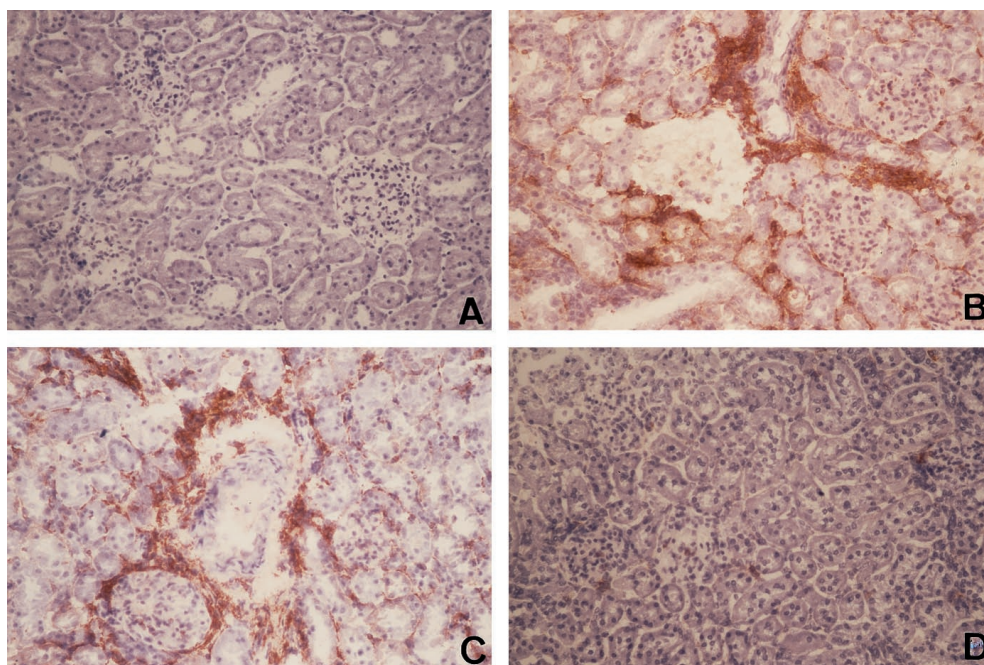


Figure 7. Immunoperoxidase staining with OX1 and HUTS-21 mAb. (A) OX1⁺ infiltrating cells in normal control rats. (B) OX1⁺ infiltrating cells in rats treated with HgCl₂ alone. (C) HUTS-21⁺ infiltrating cells in rats treated with HgCl₂ alone. (D) OX1⁺ infiltrating cells in rats treated with HgCl₂ and also injected with HUTS-21 mAb.

gation of interstitial cell infiltrates in the presence of proteinuria, found after *in vivo* administration of HUTS-21 mAb to HgCl₂-treated rats, indicates that the leukocyte migration may have less importance in the development of renal tissue damage than previously thought. These findings are consistent with those reported by our group, in which anti- α 4 mAb HP2/4 treatment was able to abrogate the interstitial leukocyte infiltration without affecting the proteinuria levels (30). They are also in agreement with those described in allergic inflammatory reactions, in which the administration of anti- α 4 mAb HP1/2 suppressed the leukocyte accumulation but had no effect on stimulated edema formation (41). Nevertheless, there are conflicting data in the literature regarding the protective effect of integrin blockade on renal function but not on inflammation. A similar apparent discrepancy on the functional effects of the leukocyte adhesion molecules has been reported in allergic airway inflammatory disorders (42–44). Although it is well established that leukocyte adhesion molecule blockade is tissue-protective in ischemic reperfusion injury in muscle or heart, the interpretation of responses of the kidney is still a matter of controversy. CD11/CD18 and intercellular adhesion molecule-1 blockade are usually protective in experimental renal ischemia-reperfusion injury. In contrast, induction of systemic neutropenia and selectin function blockade do not have a protective effect, suggesting a neutrophil-independent mechanism for renal protection (45). Leukocyte adhesion molecules might mediate renal ischemia-reperfusion injury by mechanisms other than simply leukocyte migration, such as signal transduction and cell transport (46).

In conclusion, we have reported a key role of the β 1-activated integrins in the development and progression of this

renal inflammatory disease, in both leukocyte cell-cell interactions and leukocyte infiltration pathway mechanisms. Our results confirm the important role played by VLA integrins in this model and provide further evidence that cellular activation and synthesis of anti-GBM antibody can be implicated in the renal dysfunction observed in rats with HgCl₂-induced disease.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant 98/1211 (to Dr. Mampaso); Comunidad Autónoma de Madrid 08.4/0015/98 (to Dr. Mampaso), 08.1/0015/97 (to Dr. Cabañas) and 08.1/0011/97 (to Dr. Sánchez-Madrid); CICYT SAF 98/0088 (to Dr. Cabañas); and CICYT SAF 99/0034-C01 and 2FD97-0680-C02 (to Dr. Sánchez-Madrid).

References

1. Springer TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration [Review]. *Annu Rev Physiol* 57: 827–872, 1995
2. Jutila MA: Leukocyte traffic to sites of inflammation. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 100: 191–201, 1992
3. Cronstein BN, Weissmann G: The adhesion molecules in inflammation. *Arthritis Rheum* 36: 147–157, 1993
4. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules [Review]. *Blood* 84: 2068–2101, 1994
5. Rabb HA: Cell adhesion molecules and the kidney. *Am J Kidney Dis* 23: 155–166, 1994
6. Giancotti FG, Mainiero F: Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta* 1198: 47–64, 1994
7. Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25, 1992

8. Postigo AA, Sánchez-Madrid F: Adhesion and homing molecules. *Transplant Proc* 25: 65–69, 1993
9. Sánchez-Mateos P, Cabañas C, Sánchez-Madrid F: Regulation of integrin function [Review]. *Semin Cancer Biol* 7: 99–109, 1996
10. Arroyo AG, García-Pardo A, Sánchez-Madrid F: A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J Biol Chem* 268: 9863–9868, 1993
11. Luque A, Gómez M, Puzon W, Takada Y, Sánchez-Madrid F, Cabañas C: Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355–425) of the common beta 1 chain. *J Biol Chem* 271: 11067–11075, 1996
12. Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, Hemler ME: Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* 270: 25570–25577, 1995
13. Mould AP, Garratt AN, Askari JA, Akiyama SK, Humphries MJ: Identification of a novel anti-integrin monoclonal antibody that recognises a ligand-induced binding site epitope on the beta 1 subunit. *FEBS Lett* 363: 118–122, 1995
14. Yednock TA, Cannon C, Vandevort C, Goldbach EG, Shaw G, Ellis DK, Liaw C, Fritz LC, Tanner LI: Alpha 4 beta 1 integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J Biol Chem* 270: 28740–28750, 1995
15. Puzon-McLaughlin W, Yednock TA, Takada Y: Regulation of conformation and ligand binding function of integrin alpha 5 beta 1 by the beta 1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 271: 16580–16585, 1996
16. Miyake K, Yamashita Y, Kimoto M: A calcium- or manganese-dependent epitope on the integrin beta 1 chain recognized by a unique mAb. *Int Immunol* 6: 1221–1226, 1994
17. Gomez M, Luque A, del Pozo MA, Hogg N, Sanchez-Madrid F, Cabañas C: Functional relevance during lymphocyte migration and cellular localization of activated β 1 integrins. *Eur J Immunol* 27: 8–16, 1997
18. Bowman C, Mason DW, Pusey CD, Lockwood CM: Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown Norway rat: A role for the T suppressor cells. *Eur J Immunol* 14: 464–470, 1984
19. Arroyo A, García-Vicuña R, Marazuela M, Yednock TA, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F: Expression and functional significance of an activation-dependent epitope of the beta 1 integrins in chronic inflammatory diseases. *Eur J Immunol* 25: 1720–1728, 1995
20. Sanchez-Madrid F, De Landazuri MO, Morago G, Cebrian M, Acevedo A, Bernabeu C: VLA-3: A novel polypeptide association within the VLA molecular complex. Cell distribution and biochemical characterization. *Eur J Immunol* 16: 1343–1349, 1986
21. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N: Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356: 63–66, 1992
22. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martín A, Barat A, Alvarez V, Mampaso F: Prevention of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against the α 4 integrin. *J Immunol* 153: 2313–2320, 1994
23. Eddy AA, Cray GS, Michael AF: Identification of lymphohemopoietic cells in the kidneys of normal rats. *Am J Pathol* 124: 335–342, 1986
24. Bowman C, Peters DK, Lockwood CM: Anti-glomerular basement membrane autoantibodies in the Brown Norway rat: Detection by a solid-phase radioimmunoassay. *J Immunol Methods* 61: 325–333, 1983
25. Mampaso FM, Egido J, Martínez-Montero JC, Bricio T, González E, Pirotzky E, Braquet P, Hernando L: Interstitial mononuclear cell infiltrates in experimental nephrosis: Effect of PAF antagonist. *Nephrol Dial Transplant* 4: 1037–1044, 1989
26. Gimenez A, Mampaso M: Characterization of inflammatory cells in drug-induced tubulointerstitial nephritis. *Nephron* 43: 239–240, 1986
27. Mampaso FM, Wilson CB: Characterization of inflammatory cells in autoimmune tubulointerstitial nephritis in rats. *Kidney Int* 23: 448–457, 1983
28. Postigo A, Teixidó J, Sánchez-Madrid F: The alpha 4 beta 1/VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res Immunol* 144: 723–735, 1993
29. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martín A, Escudero E, Alvarez V, Mampaso F: Abrogation of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against TNF α . *Mediat Inflamm* 4: 444–454, 1995
30. Escudero E, Nieto M, Martín A, Molina A, Lobb R, Sánchez-Madrid F, Mampaso F: Differential effects of antibodies to VCAM-1 and distinct epitopes of the α 4 integrin in HgCl₂ induced nephritis in Brown Norway rats. *J Am Soc Nephrol* 9: 1881–1891, 1998
31. Sapin C, Druet E, Druet P: Induction of anti-glomerular basement membrane antibodies in the Brown Norway rat by mercuric chloride. *Clin Exp Immunol* 28: 173–179, 1977
32. Pelletier L, Pasquier R, Rossert J, Vial MC, Mandet C, Druet P: Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity: Ability to induce the autoimmune disease. *J Immunol* 140: 750–754, 1988
33. Regen CM, Horwitz AF: Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 119: 1347–1359, 1992
34. Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: A physically integrated molecular process [Review]. *Cell* 64: 359–369, 1996
35. Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA, Sheetz MP: Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Chem* 123: 977–991, 1993
36. Lawson MA, Maxfield FR: Ca²⁺ and calcineurin dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75–79, 1995
37. Kuijpers TW, Mul EP, Blom M, Kovach NL, Gaeta FC, Tollefson V, Elices MJ, Harlan JM: Freezing adhesion molecules in a state of high-avidity binding blocks eosinophil migration. *J Exp Med* 178: 279–284, 1993
38. Bauer JS, Schreiner CL, Giancotti FG, Ruoslahti E, Juliano RJ: Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: Collaborative interactions among integrins. *J Cell Biol* 116: 477–487, 1992
39. Wilson CB, Dixon FJ: Immunologic mechanism of renal disease. In: *Contemporary Issues in Nephrology*, Vol. 3, edited by Wilson CB, Brenner BN, Stein JH, New York, Churchill Livingstone, 1979 pp 35–66
40. Daniels BS: The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol* 13: 318–323, 1993

41. Weg VB, Williams TJ, Lobb RR, Nourshargh S: A monoclonal antibody recognizing very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 177: 561–566, 1993
42. Rabb HA, Olivenstein R, Issekutz TB, Renzi PM, Martin JG: The role of the leukocyte adhesion molecules VLA-4, LFA-1, and Mac-1 in allergic airway responses in the rat. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1186–1191, 1994
43. Pretolani M, Ruffie C, Lapa-e-Silva JR, Joseph D, Lobb RR, Vargaftig BB: Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp Med* 180: 795–805, 1994
44. Rabb H, Martin JG: An emerging paradigm shift on the role of leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest* 100: 2937–2938, 1997
45. Rabb H, O'Meara O, Maderna P, Coleman P, Brady H: Leukocyte adhesion molecules and ischemic renal failure. *Kidney Int* 51: 1463–1469, 1997
46. Rabb H, Postler G: Leukocyte adhesion molecules in ischemic renal injury: Kidney-specific paradigms? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 286–291, 1998

Chemokine Expression Precedes Inflammatory Cell Infiltration and Chemokine Receptor and Cytokine Expression during the Initiation of Murine Lupus Nephritis

GUILLERMO PÉREZ DE LEMA,* HOLGER MAIER,* ELENA NIETO,[†]
VOLKER VIELHAUER,* BRUNO LUCKOW,* FRANCISCO MAMPASO,[†]
and DETLEF SCHLÖNDORFF*

**Medizinische Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany; and* [†]*Sección de Inmunopatología, Hospital Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain.*

Abstract. Lupus nephritis is characterized by immune complex deposition and inflammatory cell infiltration. Therefore, the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/MpJ Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) mice were investigated, with a focus on the expression of several chemokines and chemokine receptors. Mice were monitored for proteinuria from 6 to 20 wk of age, and kidneys were examined every 2 wk by light microscopy, electron microscopy, and immunohistologic analyses. Furthermore, the expression of chemokines, chemokine receptors, and proinflammatory cytokines was analyzed in ribonuclease protection assays. MRL/lpr mice demonstrated increased expression of monocyte chemoattractant protein-1, regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted protein, inducible protein of 10 kD, and macrophage inflammatory protein-1 β at week 8. At that time point, levels of circulating and glomerular immune complexes were increased, and no proteinuria or histopathologic signs of renal damage could be observed. As assessed in immunohistochemical and *in situ* hybridization analyses, monocyte chemoattractant protein-1 and

regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted protein expression was preferentially located in the glomeruli and interstitium. Mononuclear cell infiltration of the kidney was observed by weeks 10 to 12. At week 12, the renal expression of chemokine receptor 1 (CCR1), CCR2, and CCR5 was increased, mice became proteinuric, and renal damage was histologically evident. Finally, the expression of proinflammatory cytokines was detected (weeks 12 to 14). In summary, (1) chemokines are upregulated before inflammatory cell infiltration, proteinuria, and kidney damage are observed; (2) chemokine generation is restricted to sites of subsequent inflammatory cell infiltration, *i.e.*, glomeruli and interstitium; (3) chemokine receptor expression parallels mononuclear cell infiltration; and (4) proinflammatory cytokines are upregulated later, in parallel with inflammatory cell infiltration and the onset of proteinuria. These results support the hypothesis that chemokines initiate leukocyte infiltration and precede proteinuria and renal damage in MRL/lpr mice.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that involves increased production of autoantibodies, immune complex (IC) deposition in the microvasculature of various organs (including the kidney), complement activation, leukocyte infiltration, and tissue damage. The IC glomerulonephritis of SLE is a major cause of morbidity and determinant of the outcome of the disease (1–4). Studies on the pathogenesis of SLE have been facilitated by the availability of murine lupus models. Mice from specific lupus-prone strains spontaneously develop an autoimmune disease with renal manifestations that closely resemble those observed for patients with lupus. The most well-established murine SLE models are those using the

(NZB \times NZW)F₁ (NZB/W) and MRL/MpJ Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) strains (5,6). MRL/lpr mice carry the so-called *lpr* mutation in the apoptosis-related Fas gene, which results in an aberrant transcript (7,8). As a consequence of this mutation, autoreactive lymphocytes escape thymic selection (9), leading to their proliferation and increased circulating IC, which are deposited in the glomerular microvasculature. IC trigger the synthesis of various mediators of inflammation, resulting in cellular infiltration, proteinuria, and progressive renal failure. Among the known chemotactic factors, chemokines seem to be involved by promoting chemotaxis and activation of selected subpopulations of leukocytes, which express specific chemokine receptors (10). In support of this hypothesis, a role for several chemokines in a number of acute inflammatory renal disorders has been described (11–14).

To date, predominantly the role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) has been studied in human lupus nephritis (15–17), as well as in murine models of SLE (18–20). Tesch *et al.* (19) recently described a marked reduction in the renal mononuclear cell infiltrate, reduced proteinuria, and less severe renal pathologic conditions, leading to prolonged sur-

Received October 26, 2000. Accepted December 28, 2000.

Correspondence to Prof. Dr. Detlef Schlöndorff, Medizinische Poliklinik der LMU, Pettenkoferstrasse 8a, D-80336 München, Germany. Phone: +49/89-5160-3500; Fax: +49/89-5160-4439; E-mail: sdorff@pk-i.med.uni-muenchen.de

1046-6673/1207-1369

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2001 by the American Society of Nephrology

vival, for MRL/lpr mice rendered genetically deficient for MCP-1, compared with wild-type or heterozygous lupus mice. Because the renal influx of inflammatory cells was not totally suppressed and because multiple chemokines usually act in concert, additional chemokines may be involved. Interestingly, our laboratory recently described a prominent periglomerular and interstitial mononuclear cell infiltrate positive for chemokine receptor 5 (CCR5; a main chemokine receptor for regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted [RANTES] protein, macrophage inflammatory protein-1 α [MIP-1 α], and MIP-1 β) in biopsies from patients with lupus nephritis (21). Although it is apparent that chemokines contribute significantly to leukocyte influx into sites of tissue injury, they must be considered part of a concerted interaction involving cytokines, adhesion molecules, and other mediators of inflammation. For example, proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interferon- γ (IFN- γ) stimulate renal cells to produce chemokines *in vitro* (22–24), whereas other cytokines, such as transforming growth factor- β (TGF- β), can suppress their synthesis (25). Furthermore, TGF- β has been implicated in the progressive fibrosis of renal disease. There is experimental evidence that TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ play important pathogenic roles in lupus nephritis (26–28).

However, little is currently known regarding the temporal sequence of the intrarenal generation of chemokines and cytokines or their relationships to the inflammatory cell infiltrates, the generation of proteinuria, and the resulting renal pathologic processes and functional insufficiency. Knowledge of this immune pathologic network and its temporal regulation is an important requirement for evaluation of the potential pathophysiologic roles of chemokines and cytokines during lupus nephritis and for subsequent design of therapeutic strategies to interfere with their actions. For example, does cytokine generation precede that of chemokines or *vice versa*, and how do these factors relate to the inflammatory cell infiltrate?

To address these questions, we systematically characterized the expression of a series of chemokines and chemokine receptors, as well as inflammatory cytokines, during the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. Our results demonstrate that the intrarenal generation of chemokines precedes cellular infiltration, chemokine receptor expression, and proinflammatory cytokine production, as well as the resulting proteinuria and functional renal impairment. Therefore, chemokines may play an important role in the initiation and further development of lupus nephritis.

Materials and Methods

Reagents and Antibodies

A custom antipeptide antiserum against murine MCP-1 was raised in rabbits, as described previously (29). A FITC-conjugated rabbit anti-mouse Ig antibody specific for both IgG and IgM (IgG+M) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), a rabbit anti-mouse RANTES polyclonal antibody (PeproTech, London, UK), and a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit Ig secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) were used. The peroxidase-conjugated CD3 monoclonal antibody was from Serotec (Oxford, UK). All reagents for

the anti-DNA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were from Boehringer Mannheim, except the mouse monoclonal anti-single- and double-stranded DNA antibody used as a standard (Chemicon International, Temecula, CA). Radiolabeled [α - 35 S]UTP (1.25 Ci/mmol) and [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mmol) were from NEN (Boston, MA). All other reagents or solvents (analysis grade) were from Merck (Darmstadt, Germany). The multiprobe template sets (mCK2b, mCK3, mCK5, and mCR5) for analysis of mRNA expression using ribonuclease protection assays (RPA) were from Pharmingen (San Diego, CA).

Experimental Design

MRL and MRL/lpr mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed under specific pathogen-free conditions, with free access to water and food. All experimental procedures were performed according to German law (Tierschutzgesetz). Permission was given by the local governmental authorities (211-2531.3-11/99).

Mice were distributed into different experimental groups, each consisting of three to six female mice. Beginning at the age of 6 wk, groups of MRL (control) and MRL/lpr (lupus) mice were euthanized every 2 wk. Spot urine samples were obtained immediately before euthanasia, and blood samples were obtained by cardiac puncture after cervical dislocation. The following parameters were determined using standard analytical protocols: Bradford assay (30) (microtiter scale) for proteinuria assessments (BioRad, Richmond, CA), Jaffee method (31) for creatinine measurements (Merck Diagnostika), urease/glutamate dehydrogenase method (32) for blood urea nitrogen measurements (Merck Diagnostika), and IgG ELISA for analysis of circulating IC (Boehringer Mannheim) and anti-double-stranded DNA antibodies (33).

One kidney was used exclusively for isolation of total RNA, using a standard protocol (34). The upper pole of the other kidney was used for ultrastructural study. The remaining part of the kidney was split into two halves. One half was fixed in formaldehyde for routine histologic examination and *in situ* hybridization. The other half of the renal tissue was embedded in OCT medium (Jung; Leica Instruments, Wetzlar, Germany), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80° until used for immunohistochemical analysis.

Renal Morphologic Analyses

Light Microscopy. Renal tissue was fixed in neutral buffered formaldehyde in saline, and 3- μ m, paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin/eosin and period acid-Schiff stain. The severity of the renal lesions was graded as 0 to 3+, using the activity index described for human lupus nephritis by Austin *et al.* (35).

Electron Microscopy. For ultrastructural studies, the kidney tissue was immediately fixed for 2 h in cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde, followed by postfixation in osmium tetroxide. Tissue was then dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Epon 812 (Merck). Ultrathin sections were stained with lead citrate and examined at 75 kV using a JEOL CX electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) (36).

In Situ Hybridization

In situ hybridization with radiolabeled cRNA probes was performed on 4- μ m sections of paraffin-embedded tissues, as described previously (29). Briefly, section slides were prehybridized at 52° C for 2 h. After prehybridization, slides were washed and dehydrated with graded ethanol concentrations. Fragments of murine MCP-1 (positions 299 to 459, GenBank database accession number J04467),

RANTES (positions 124 to 444, GenBank accession number S37648), CCR2 (positions 1736 to 1888, GenBank accession number U47035), and CCR5 (positions 1384 to 1604, GenBank accession number D83648) cRNA were radiolabeled with [α - 35 S]UTP. Sections from both MRL and MRL/lpr mice were hybridized at 52°C overnight. After hybridization, sections were incubated in a RNase mixture at 37°C for 30 min, followed by high-stringency washing and dehydration. Finally, sections were dipped in Ilford K2 nuclear research emulsion (Ilford, Cheshire, UK) at 42°C and exposed for 2 wk at 4°C in a dry chamber. After development, tissue was counterstained with hematoxylin/eosin. Sense riboprobes were used as controls for the hybridization. In the cases of CCR2 and CCR5, combined *in situ* hybridization and CD3 immunohistologic analyses were performed. Therefore, after the *in situ* hybridization step, direct immunohistochemical staining was performed using a 1:50 dilution of the anti-CD3 antibody. After development, the aminoethylcarbazole substrate slides were dipped, exposed, developed, and counterstained as described above.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed on frozen tissue sections and processed as described above, using standard techniques (36,37). Direct immunofluorescence studies were performed on 4- μ m, ether/ethanol-fixed, serial cryostat sections by using a FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG+M antibody.

To characterize MCP-1- and RANTES-positive cells in mouse kidney tissue, a two-step immunoperoxidase method was used. Acetone-fixed, 5- μ m-thick, cryostat sections were stained with rabbit antiserum against either murine MCP-1 (dilution, 1:75) or murine RANTES (10 ng/ μ l). Positive staining was observed by using a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit Ig secondary antibody (Dako), with diaminobenzidine as chromogen. The respective preimmune sera served as negative controls.

Renal mRNA Expression

Cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression was analyzed by RPA. Twenty micrograms of total RNA from each sample was used for the cytokine and chemokine expression analyses by multiprobe RPA (RiboQuant mCK2b, mCK3, and mCK5 template sets; Pharmingen). Fifty micrograms of RNA was used for the chemokine receptor template set mCR5. Assays were performed according to the instructions provided by the manufacturer. The RNase-protected probes were separated on 5% denaturing polyacrylamide gels and analyzed by phosphorimaging (Storm 840 PhosphorImager; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Bands were quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics, Eugene, OR). In preliminary experiments, the identities of the various templates in the multiprobe RPA kits were confirmed by sequencing.

Statistical Analyses

Data were expressed as means \pm SD and analyzed with either the unpaired two-way *t* test (for parametric data) or the Mann-Whitney *U* test (for nonparametric data). The null hypothesis was rejected at $P < 0.05$.

Results

Biochemical Analyses of Serum Parameters

MRL/lpr (lupus) mice demonstrated characteristic alterations of serum immune parameters, with progressive increases in the levels of circulating IC (Figure 1A) and anti-DNA

antibodies (Figure 1B) with age, compared with age-matched MRL (control) mice. For MRL/lpr mice, circulating IC levels were observed to be elevated as early as 8 wk of age ($n = 3$) and increased progressively until they reached a maximum at week 16 ($n = 6$). Plasma levels of anti-DNA antibodies started to significantly increase at 10 wk of age ($n = 3$) and demonstrated a marked additional increase at 12 to 20 wk of age ($n = 3$ to 6 animals/time point). No changes with age occurred in the MRL control mice.

The renal function of MRL/lpr mice was compromised, as demonstrated by increases in proteinuria (Figure 1C) and plasma urea levels (Figure 1D). Both parameters increased significantly at somewhat later time points (weeks 12 to 14) and continuously increased until week 20 ($n = 3$ to 6). In contrast, proteinuria was absent and blood urea nitrogen levels were unaltered in control animals throughout the study period.

Histopathologic Analyses

Renal Morphologic Features. MRL/lpr mice demonstrate progressive development of renal damage, which is noticeable at 10 wk of age and reaches significance at 12 wk. Figure 2 (A to D) presents representative photographs of hematoxylin/eosin-stained renal tissue from lupus mice ($n = 3$ to 6) of 8, 10, 12, or 14 wk of age. The observed lesions included the presence of enlarged hypercellular glomeruli, with increased numbers of both resident cells and infiltrating leukocytes. A parallel increase in mesangial matrix was also noted. Prominent interstitial mononuclear cell infiltrates were also observed, with predominantly perivascular localization in the cortex and medulla of the affected kidneys. Occasionally, focal glomerular capillary thrombi, fibrinoid necrosis, and crescents were identified in later phases.

The renal histologic lesions of the MRL/lpr mice exhibited progressively increasing activity indices, which began to be significant at 12 wk of age (Figure 1E). The activity indices increased with age for lupus mice, so that at the age of 20 wk all mice exhibited signs of severe renal damage ($n = 3$). In contrast, no histopathologic abnormalities could be observed in MRL mice at any time point ($n = 3$ to 6).

Direct Immunofluorescence Analyses. MRL/lpr mice (10 to 14 wk of age) exhibited generalized, diffuse, granular, irregularly distributed mesangial IC deposits ($n = 3$ to 6) (Figure 2H). In addition, positive antinuclear antibody staining was observed in some 14-wk-old animals (data not shown). Eight-week-old mice demonstrated no consistent staining for IC ($n = 3$) (Figure 2F).

Ultrastructural Studies. Ultrastructural analyses using transmission electron microscopy were performed for two lupus mice and one control mouse at 8, 10, and 14 wk of age. Eight-week-old mice demonstrated no ultrastructural alterations (Figure 2E). In contrast, 10-wk-old mice (Figure 2G) exhibited hypercellular glomeruli with mesangial matrix expansion and edema, in addition to well defined, electron-dense deposits. The most consistent ultrastructural finding at 14 wk of age was the presence of prominent electron-dense deposits localized preferentially in the mesangium and in the subendothelial area of the glomeruli. Occasionally, small electron-

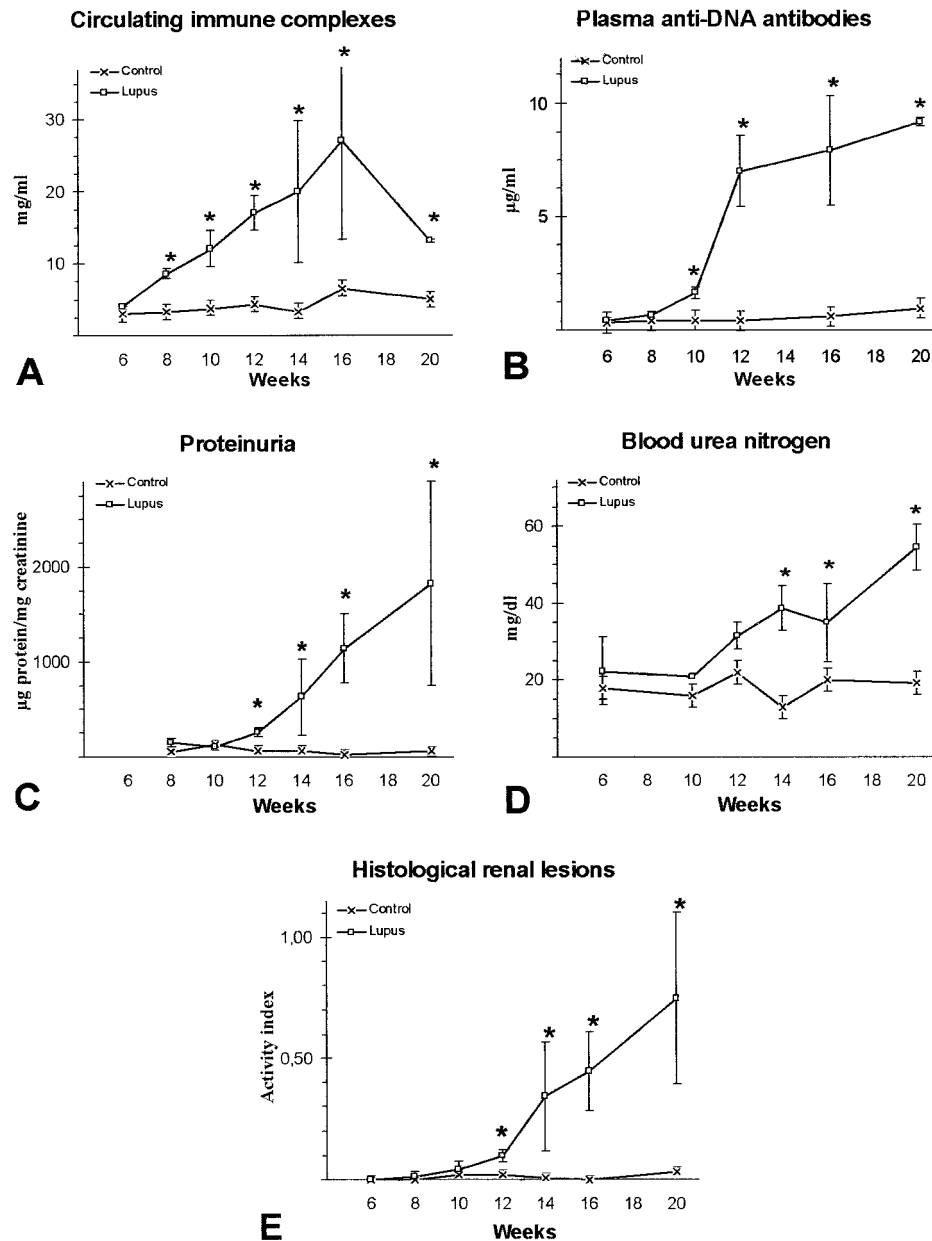


Figure 1. Time course of renal disease in MRL and MRL/MpJ Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) mice. (A) Circulating immune complex (IC) levels, as quantified in plasma samples with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mouse IgG+M. (B) Anti-DNA antibody levels, as quantified in plasma samples with an ELISA. (C) Proteinuria, as detected in spot urine samples by the Bradford method, expressed as the urinary protein/creatinine ratio. (D) Blood urea nitrogen levels, as measured in plasma samples using the urease/GIDH method. (E) Histologic renal lesions (activity index), scored as previously described by Austin *et al.* (35) for human patients with lupus nephritis. Values are means \pm SD for three to six animals in each group (*, $P < 0.05$ versus respective time-matched control).

dense deposits were also identified in the glomerular subepithelium. Focal podocyte foot process effacement and endothelial cell edema, with capillary lumen obliteration, were also observed. No significant ultrastructural alterations were noted in the control groups at any of the time points examined.

Renal Chemokine Expression

Renal Chemokine mRNA Expression. Chemokine mRNA expression was analyzed by RPA of total kidney RNA.

As shown in Figure 3, lupus mice exhibited significant increases in renal mRNA for the chemokines MCP-1, RANTES, interferon γ -inducible protein 10 (IP-10), and MIP-1 β , starting at 8 wk of age. Other chemokines examined (lymphotactin, eotaxin, MIP-1 α , MIP-2, and T-cell activation protein 3) were undetectable. MRL/lpr mice exhibited progressive increases in chemokine expression from week 8 to week 16 ($n = 3$ to 6/time point), compared with the age-matched MRL control animals ($n = 3$). The barely

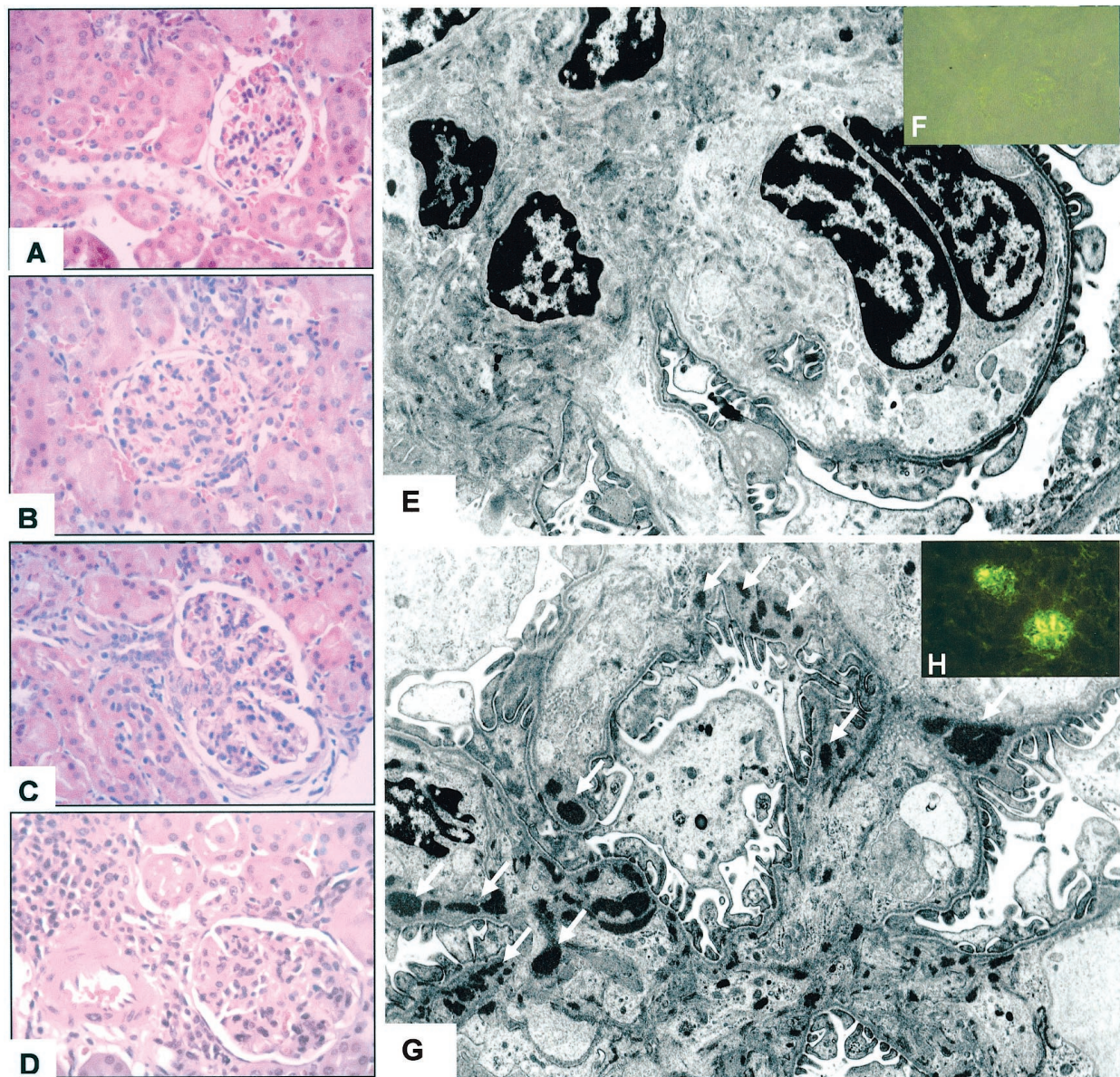


Figure 2. Histopathologic kinetics of glomerular and tubulointerstitial damage in MRL/lpr mice. (A to D) Light microscopic microphotographs of hematoxylin/eosin-stained sections from representative mice of different ages. Lesions progressively increased with the age of the animals, from an absence of lesions (8 wk) (A) to initial (10 wk) (B), mild (12 wk) (C), and well established (14 wk) (D) lesions. (F and H) Representative direct immunofluorescence micrographs, showing negative staining of a sample from an 8-wk-old MRL/lpr mouse (F) and generalized, diffuse, irregular, granular staining, corresponding to mesangial IC deposits, in a sample from a 10-wk-old MRL/lpr mouse (H). (E and G) Ultrastructural microphotographs of representative 8-wk-old (E) and 10-wk-old (G) MRL/lpr mice. No electron-dense deposits could be detected at the age of 8 wk, whereas mice exhibited numerous deposits (arrows) at 10 wk. Magnifications: $\times 400$ in A through D; $\times 9900$ in E and G; $\times 200$ in F and H.

detectable chemokine expression in the MRL control mice remained unaltered during the study period.

It should be noted that a polymorphism in the murine IP-10 gene can lead to false-negative results with the mCK5 RPA multiprobe kit (38). The results for IP-10 were therefore confirmed by using single-template RPA (data not shown).

Immunohistochemical Analyses. To localize the major CC chemokines detected, *i.e.*, MCP-1 and RANTES, immunohistologic staining of renal tissue was performed. Figure 4 presents representative examples of MCP-1 and RANTES

staining in 14-wk-old MRL mice ($n = 3$) (Figure 4, A and E) and MRL/lpr mice ($n = 2$) (Figure 4, B and F). Immunohistologic analyses of both chemokines demonstrated marked positivity within the glomeruli of the MRL/lpr mice. The staining for both chemokines was stronger in the glomerular areas that also demonstrated increased mononuclear cell accumulation. Positive staining was also observed in the mesangial area. This expression pattern was consistent at 12 wk of age ($n = 2$) and increased until week 16 ($n = 2$). Despite the increasing intensity of the immunohistologic signals for

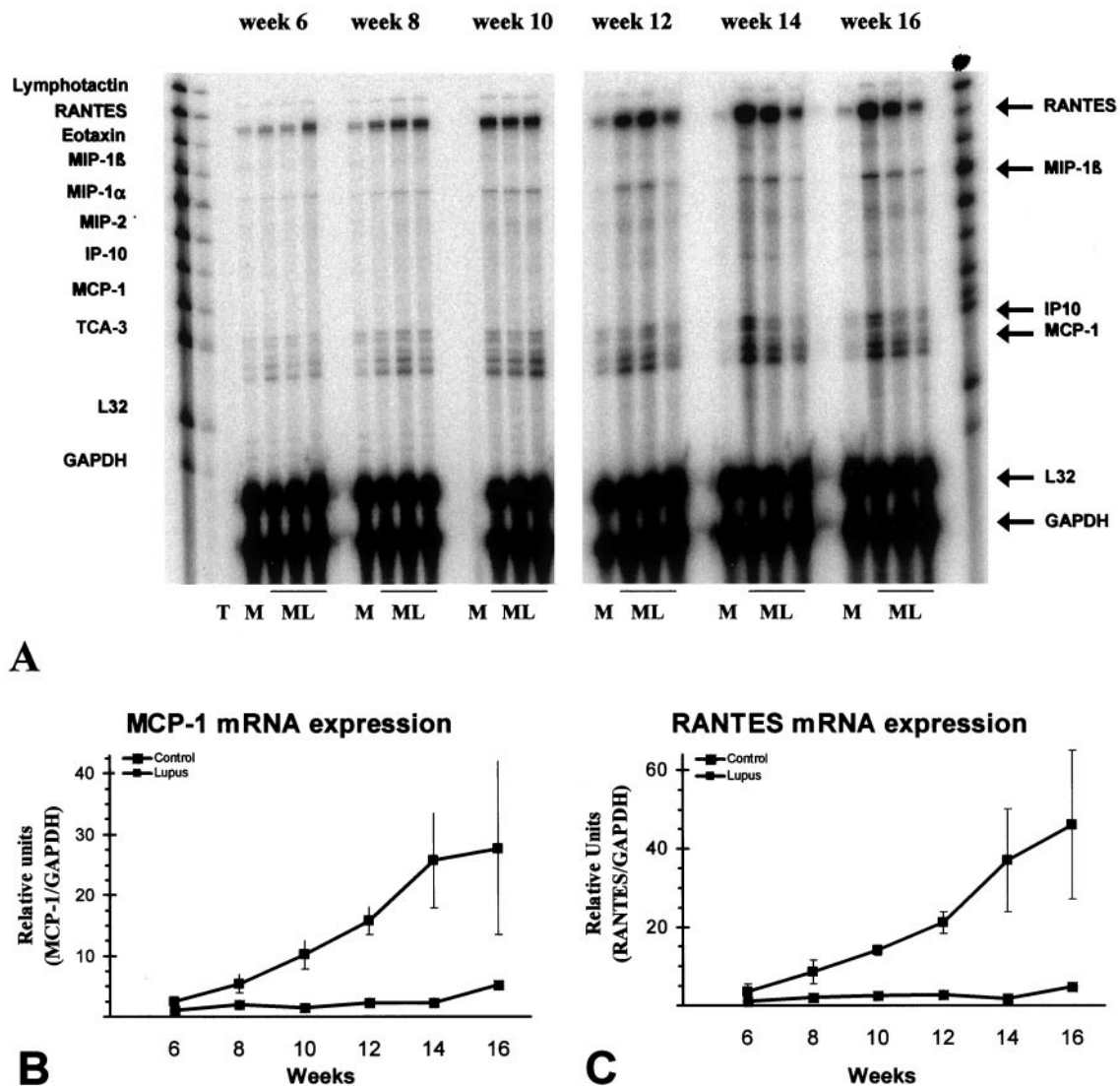


Figure 3. Time course of renal chemokine mRNA expression. Twenty μg of total RNA isolated from whole kidney was analyzed using the mCK5 ribonuclease protection assay (RPA) kit from Pharmingen. (A) Representative RPA gel. Samples were organized in time groups, and each group was separated from the others by an empty lane. For each group, samples were loaded on the gel using the following scheme: first lane, MRL control sample (M); in the next three lanes, samples from three different MRL/lpr mice (ML). T, tRNA control sample (20 μg). Expression of the chemokines regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted (RANTES) protein, macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), inducible protein of 10 kD (IP-10), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was increased in MRL/lpr mice, compared with the respective control animals, beginning at early time points (weeks 6 to 8). A maximal increase in expression was reached at the 14th week, and expression remained high for the remainder of the study period. (B and C) Densitometric analyses of MCP-1 (B) and RANTES (C) expression. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TCA-3, T-cell activation protein 3.

MCP-1 and RANTES, the tissue distributions remained unaltered throughout the study period for the MRL/lpr mice. Some patchy tubulointerstitial MCP-1 and RANTES staining was occasionally noted. Finally, positive tubular staining localized to the brush border or the tubular lumen was also occasionally observed. No specific MCP-1 or RANTES staining was noted in samples from control MRL mice at any of the time points or in MRL or MRL/lpr samples stained with preimmune serum (data not shown).

In Situ Hybridization. To further localize the sites of MCP-1 and RANTES production, *in situ* hybridization analy-

ses were performed. With this method, MCP-1 and RANTES mRNA was observed within the glomeruli and tubulointerstitium. Figure 4 (C and D) presents the *in situ* hybridization results for MCP-1 mRNA expression in MRL ($n = 1$) and MRL/lpr ($n = 2$) mice. Figure 4 (G and H) demonstrates the corresponding RANTES expression. Occasionally, signals for either chemokine could be observed in the tubules or in the interstitial inflammatory cell infiltrate. Therefore, the *in situ* localization data corroborate the immunohistologic localization of MCP-1 and RANTES predominantly in the glomeruli and in some tubulointerstitial areas. No consistent signals could be detected with sense riboprobes.

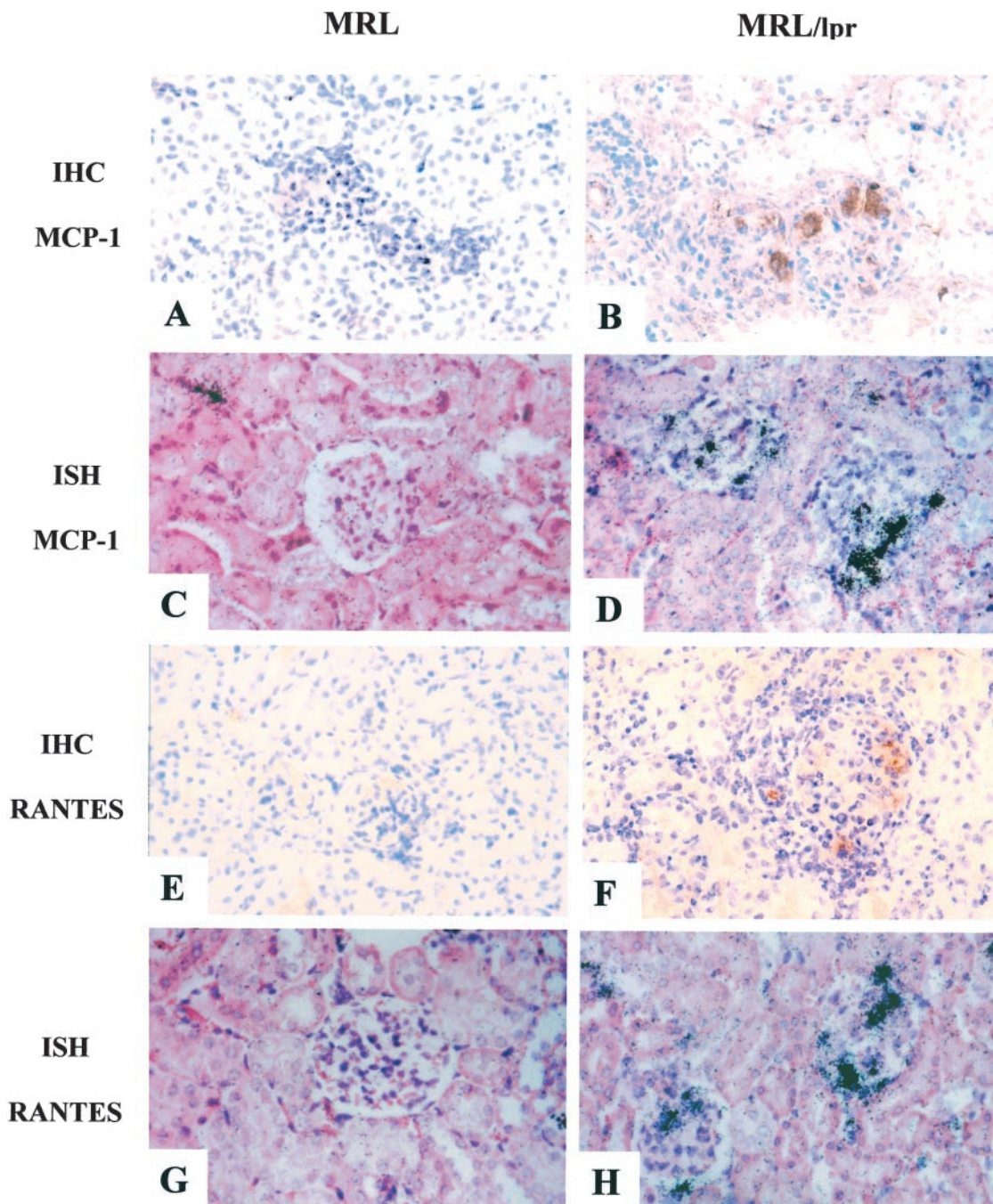


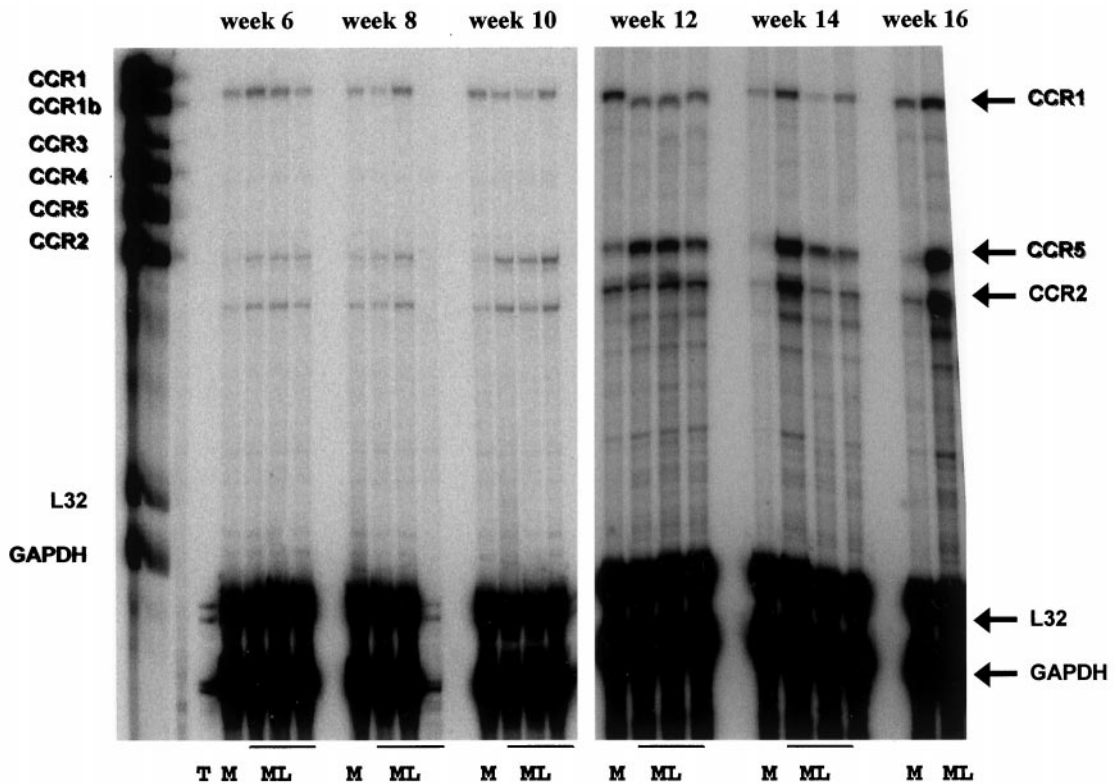
Figure 4. Renal tissue expression of MCP-1 and RANTES at week 14. Representative microphotographs demonstrate the renal expression of the chemokines MCP-1 and RANTES in MRL (A, C, E, and G) and MRL/lpr (B, D, F, and H) mice. MCP-1 expression was detected at the protein level by immunohistochemical (IHC) assays (A and B) or at the mRNA level by *in situ* hybridization (ISH) analyses (C and D). RANTES expression was also detected at the protein level by immunohistochemical assays (E and F) or at the mRNA level by *in situ* hybridization analyses (G and H). Magnification, $\times 400$.

Renal Chemokine Receptor Expression

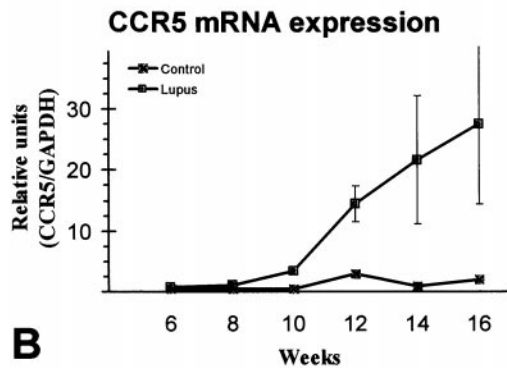
Renal Chemokine Receptor mRNA Expression. By RPA, CCR2 and CCR5 were noted to be upregulated in MRL/lpr mice (Figure 5). CCR2 and CCR5 expression increased beginning at week 12 (CCR2, twofold; CCR5, 3.5-fold; $n = 3$) and progressively increased until week 16 (CCR2, ninefold; CCR5, 12-fold; $n = 6$). The constitutive expression of CCR1 increased with age in both control MRL and lupus MRL/lpr

kidneys. Later, a consistent difference in renal CCR1 expression could be observed between the two groups of mice. A threefold increase in CCR1 mRNA levels at week 14 ($n = 6$) and a fourfold increase at week 16 ($n = 6$) were detected in MRL/lpr kidneys, compared with MRL control kidneys ($n = 3$).

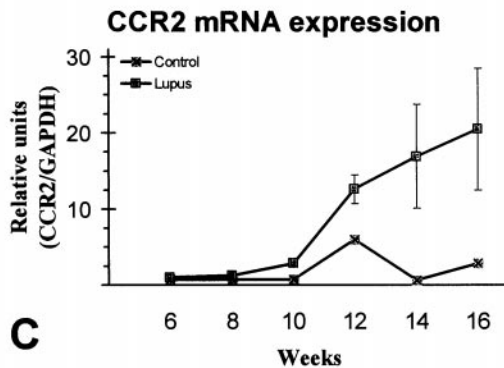
In Situ Hybridization. For localization of CCR2 and CCR5 mRNA, *in situ* hybridization analyses were per-



A



B



C

Figure 5. Time course of renal chemokine receptor mRNA expression. Fifty micrograms of total RNA isolated from whole kidney was analyzed using the mCR5 RPA kit from Pharmingen. (A) Representative RPA gel. Samples were organized in time groups, and each group was separated from the others by an empty lane. For each group, samples were loaded on the gel using the following scheme: first lane, MRL control sample (M); in the next three lanes, samples from three different MRL/lpr mice (ML). T, tRNA control sample (50 μg). Expression of chemokine receptor 5 (CCR5) and CCR2 was increased in MRL/lpr mice, compared with the respective control animals, beginning at weeks 10 to 12. CCR1 expression was upregulated beginning at week 14. (B and C) Densitometric analyses of CCR5 (B) and CCR2 (C) expression.

formed for each gene in kidneys from 14-wk-old MRL/lpr (*n* = 2) or MRL (*n* = 2) mice. As shown in Figure 6, MRL/lpr mice demonstrated slight tubulointerstitial signals for both chemokine receptors, *i.e.*, CCR5 (Figure 6A) and CCR2 (Figure 6B). The signals co-localized with the interstitial cell infiltrate and were occasionally detected within hypercellular glomeruli and in periglomerular mononuclear cell infiltrates, but no mRNA expression could be detected in tubular cells. CCR2 was mainly localized to mononuclear

cells that were CD3-negative (Figure 6D), whereas CCR5 was primarily expressed on CD3-positive lymphocytes (Figure 6C). No signals could be detected with the sense probes (data not shown).

Proinflammatory Cytokine Expression

Renal mRNA Expression. Because several cytokines seem to play a role in lupus nephritis, proinflammatory cytokine mRNA expression was analyzed by multiprobe RPA

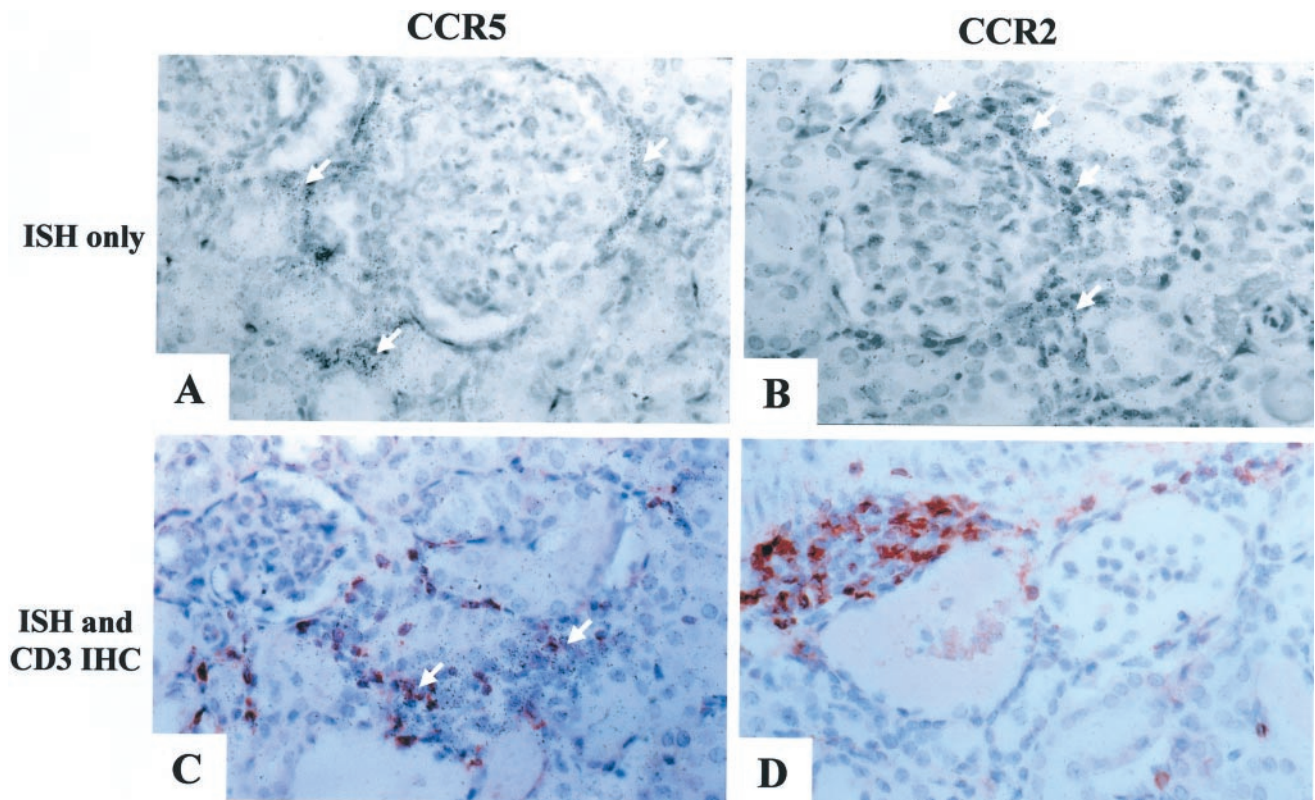


Figure 6. Renal tissue expression of CCR5 and CCR2 at week 14. Representative photomicrographs demonstrate renal chemokine receptor mRNA expression (arrows) in MRL/lpr mice, as detected by *in situ* hybridization analyses. CCR5 (A) and CCR2 (B) signals distributed in the mononuclear cell infiltrate. CCR5 signal co-localizes with CD3-positive cells (C; arrows), whereas no co-localization between CCR2 mRNA and CD3-positive cells was observed (D). Magnification, $\times 600$.

using the mCK2b and mCK3 template sets. Kidneys from lupus mice exhibited significant increases in mRNA expression levels for IL-1 β and its corresponding negative regulator IL-1 receptor antagonist (Figure 7A), beginning at weeks 12 to 14. In addition, MRL/lpr mice exhibited higher levels of lymphotoxin- β , TNF- α , IFN- γ , and IFN- β at weeks 10 to 12 (Figure 7B). The observed upregulation of TNF- α , IFN- γ , and IFN- β expression at week 10 preceded the upregulation of lymphotoxin- β and IL-1 β observed in lupus mice at week 12.

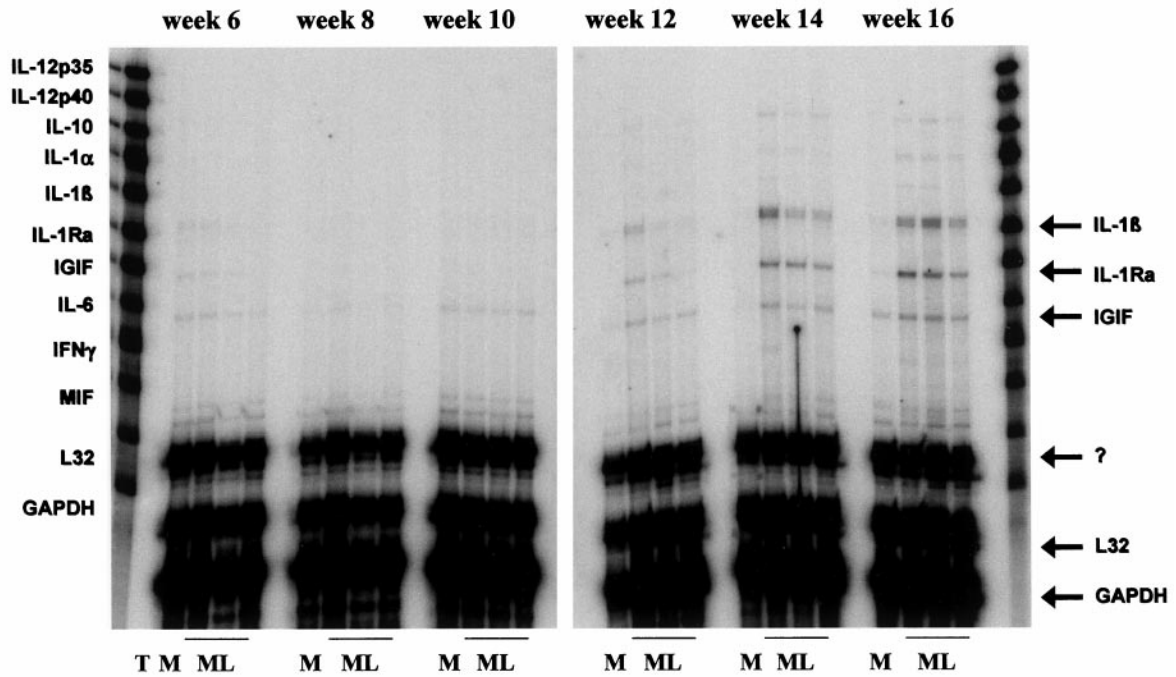
TGF- β has been proposed to mediate the progression of fibrosis in renal diseases. Interestingly, the renal mRNA levels for this cytokine increased equally with age in MRL/lpr mice and MRL control mice. This finding was noted for both isoforms examined, *i.e.*, TGF- β 1 and TGF- β 2.

Discussion

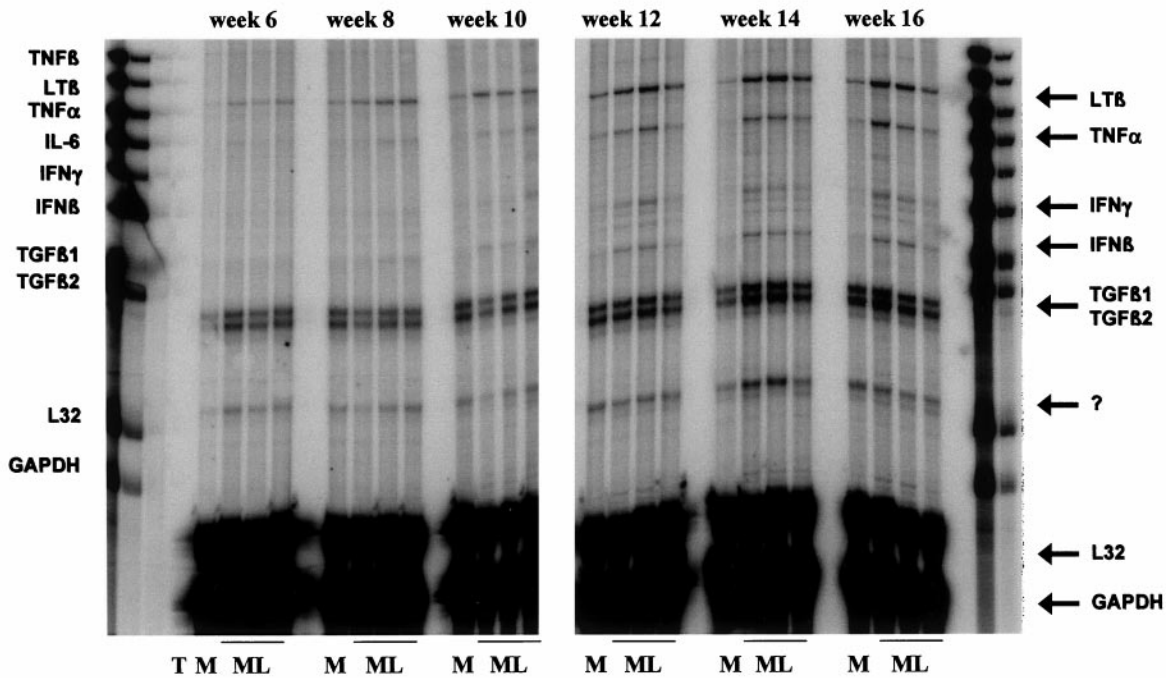
In this study, we systematically characterized the expression of a series of chemokines, proinflammatory cytokines, and chemokine receptors during the initiation and progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. Our results indicate that (1) renal chemokine expression is upregulated in parallel with IC deposition but upregulation occurs before cellular infiltration, proteinuria, and kidney damage; (2) the expression of chemokines is restricted to glomeruli and the interstitium, *i.e.*, the sites of cellular infiltration; and (3) the proinflammatory cytokines are upregulated in parallel with inflammatory cell infil-

tration and the associated expression of chemokine receptors but after the upregulation of chemokines. The time course of the events places the generation of chemokines at a very early point in the course of lupus nephritis, consistent with their proposed role as early mediators of renal inflammation.

The expression of some chemokines has been linked to lupus nephritis in patients and in animal models of the disease. Biopsies from patients with lupus nephritis have demonstrated the presence of the chemokine MCP-1 in endothelial, mononuclear, and cortical tubular epithelial cells (16,17). Several authors reported increased MCP-1 urinary excretion by patients with SLE (17,18,39). The elevated urinary MCP-1 excretion reflected lupus nephritis disease activity. Zoja *et al.* (18), with NZB/W mice, and Tesch *et al.* (19), with MRL/lpr mice, observed increased renal MCP-1 expression before the onset of proteinuria. Our results confirm that proteinuria occurs after 12 wk of age, whereas chemokine expression is already upregulated at 8 wk of age. In MRL/lpr mice made genetically deficient for MCP-1, Tesch *et al.* (19) observed a marked decrease in macrophage and T cell recruitment, with concordant reductions in kidney pathologic features and proteinuria, resulting in increased overall survival rates. Therefore, that study provides strong evidence for an important contributory role for MCP-1 in the initiation of the renal inflammatory process. No reduction of circulating IC levels or renal Ig and complement deposits was observed for the MCP-1-knockout



A



B

Figure 7. Time course of renal proinflammatory cytokine mRNA expression. Twenty micrograms of total RNA isolated from whole kidney was analyzed using the mCK2b (A) and mCK3 (B) RPA kits from Pharmingen. Samples were organized in time groups, and each group was separated from the others by an empty lane. For each group, samples were loaded on the gel using the following scheme: first lane, MRL control sample (M); in the next three lanes, samples from three different MRL/lpr mice (ML). T, tRNA control sample (20 μg). (A) Increased expression of mRNA for interleukin-1β (IL-1β) and its corresponding regulator IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), as well as for interferon-γ inducible factor, in MRL/lpr mice, compared with MRL mice, starting at week 12. (B) Higher levels of lymphotoxin-β, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ), and IFN-β expression in MRL/lpr mice, compared with the age-matched control animals. TGFβ, transforming growth factor-β; MIF, macrophage migration inhibitory factor.

mice, suggesting that activation of complement alone is not sufficient to promote leukocyte recruitment. This observation supports the generally accepted pathophysiologic mechanism of IC-mediated nephritis, in which MCP-1 is expressed secondary to the deposition of IC and the activation of complement. Exposure of mesangial cells to IC has been demonstrated to stimulate the generation of chemokines such as MCP-1 and RANTES (40). As pointed out by Tesch *et al.* (19), the MCP-1 deficiency led to marked improvement of the glomerular pathologic features but to only partial reduction of the overall infiltration and especially the perivascular infiltration. This observation raises the issue of the potential role of other chemokines, in addition to MCP-1, in lupus nephritis. The recruitment of different leukocyte subpopulations is regulated by different chemokines, and our data provide clear evidence for this possibility, because multiple chemokines were upregulated.

In previous studies of human biopsies, predominantly CCR5-positive infiltrating mononuclear cells could be detected (21). Similarly, CCR5, CCR2, and CCR1 are upregulated in experimental IC nephritis in mice (41). Interestingly, CCR5 binds RANTES and MIP-1 β , whereas MCP-1 binds to CCR2 and RANTES also binds to CCR1. All of these chemokines and chemokine receptors were upregulated in the MRL/lpr mice. Furthermore, IP-10 (a chemokine belonging to the CXC chemokine subfamily) was also upregulated. This is of interest because Romagnani *et al.* (42) reported that IP-10 causes proliferation of cultured mesangial cells. Furthermore, those authors demonstrated that mesangial cells express CXC chemokine receptor 3, the receptor for IP-10, and that CXC chemokine receptor 3 is upregulated in mesangial proliferative human IgA nephritis (42).

If chemokines are major factors contributing to the cellular infiltration, then their site of production should co-localize with the infiltrate. It has been reported that essentially all renal cells can be stimulated to produce certain types of chemokines *in vitro* (22–24). In the IC-mediated nephritis in MRL/lpr mice, we observed MCP-1 and RANTES expression located mainly within the glomerular mesangium and in subendothelial areas with the most prominent IC deposition. *In vitro*, IC have been demonstrated to stimulate chemokine expression by mesangial cells (40). *In vivo*, the administration of IgG Fc fragments prevents glomerular injury in IC nephritis by reduction of the expression of the chemokines MCP-1, IP-10, and CINC-1 (43). Together, these findings support a role for IC deposits in the initiation of chemokine expression.

Some peritubular and tubular staining for MCP-1 and RANTES localized to the brush border or tubular lumen was occasionally observed in immunohistochemical analyses. The luminal and brush border staining might be explained by nonspecific absorbance of urinary MCP-1 and RANTES. The fact that no tubular MCP-1 or RANTES expression was detected by *in situ* hybridization argues against chemokine production by tubular cells, at least at the time points examined.

Although there is overall concordance between our observations on MCP-1 expression in MRL/lpr mice and those described by Tesch *et al.* (19) for MRL/lpr mice and Zoja *et al.*

(18) for NZB/W lupus mice, the latter authors also noted major MCP-1 expression in tubules, which we did not observe. The reasons for this discrepancy may be related to the age of the mice examined and differences in the methods and antibodies used. Furthermore, immunolocalization of chemokines does not necessarily indicate the site of production, because chemokines are soluble mediators that diffuse from the site of production and bind to the extracellular matrix. Chemokines can also be filtered (especially with proteinuria) and subsequently taken up by proximal tubular cells. On the basis of our results using *in situ* hybridization, tubular cells do not seem to contribute significantly to MCP-1 or RANTES production in MRL/lpr mice at the time point examined, *i.e.*, 14 wk of age. Possibly, the degree of chronicity influences tubular chemokine production. Tesch *et al.* (19) observed tubular MCP-1 expression predominantly in 5-mo-old MRL/lpr mice, whereas our last time point was 16 wk of age. In fact, Zoja *et al.* (18) reported that renal expression in NZB/W mice was different at early and later time points. At 2 mo of age, mainly glomerular MCP-1 expression was detected, whereas tubular expression predominated in 6-mo-old mice. It has been proposed that proteinuria itself is able to induce tubular cells to express MCP-1 (44). Our findings of initial glomerular and subsequent interstitial chemokine production are consistent with a model in which glomerular injury initially causes glomerular chemokine production and infiltration, with the subsequent proteinuria leading to tubulointerstitial damage and hence to chemokine synthesis, resulting in turn in interstitial inflammatory cell infiltration and damage (45).

It has been proposed that, after chemokine production by local cells, the infiltrating leukocytes become a source of chemokine production, resulting in an amplification loop. This hypothesis would explain why mRNA expression continuously increased in the MRL/lpr mice. As observed using *in situ* hybridization, only a few cells in the prominent interstitial infiltrates expressed chemokines. Potentially, these few cells could be sufficient to cause an amplification loop.

Because MCP-1, RANTES, and MIP-1 β were upregulated early in our lupus model, the subsequent upregulation of mRNA for CCR2 and CCR5 at week 12 and of mRNA for CCR1 by week 14 in the MRL/lpr mice is not unexpected. As indicated by data from human biopsies, the chemokine receptors CCR2 and CCR5 are present only on infiltrating leukocytes (21). The idea that this is also the case in mice is supported by the observation that increased levels of mRNA for CCR2 and CCR5 in lupus kidneys are apparent only at time points at which prominent cell infiltration can be observed. In addition, expression of both CCR2 and CCR5 mRNA could be detected by *in situ* hybridization only in the cell infiltrate. Within glomeruli, we cannot totally exclude the possibility of the localization of *in situ* signals to resident glomerular cells, *e.g.*, mesangial cells. To date, however, we have not been able to localize chemokine receptors to mesangial cells in either human or murine systems. CCR2 was mainly localized to mononuclear cells that were CD3-negative, whereas CCR5 was primarily expressed on CD3-positive lymphocytes. In contrast, CCR1 upregulation did not parallel CCR2 and -5 upregu-

lation and leukocytic infiltration in the lupus model but occurred only at later time points (after 14 wk). Furthermore, as presented in Figure 5A, CCR1 is constitutively expressed in both MRL/lpr lupus mice and MRL control mice even at early time points. CCR1 can be expressed on cultured mesangial cells, and its expression can be stimulated by IFN- γ (22). The late upregulation of CCR1, after the enhancement of renal IFN- γ expression, would be consistent with these *in vitro* findings. The role of CCR1 in inflammatory diseases remains unclear. The late upregulation of CCR1 might be part of an anti-inflammatory response, an hypothesis that requires further testing. It is hoped that the future availability of antibodies will allow a cell type assignment for CCR1 in lupus nephritis.

After the initial IC insult and the early expression of chemokines, a leukocyte infiltrate and proteinuria appeared in MRL/lpr mice. Only at that time point did we observe upregulation of several proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IFN- γ , IFN- β , interferon- γ inducible factor, and IL-1 β (Figure 7). These proinflammatory cytokines have been demonstrated to participate in some of the pathophysiologic processes in lupus mice, such as leukocyte activation and induction of cell adhesion molecule expression. For example, IFN- γ has been demonstrated to be required for lupus nephritis; IFN- γ -deficient MRL/lpr mice were protected from lymphadenopathy and early death, and the severity of renal damage was markedly reduced (27,46,47). In kidney biopsies from patients with lupus nephritis, TNF- α and IL-6 mRNA expression was found to be elevated (48). In addition, the administration of anti-TNF- α antibodies was able to abrogate mercuric chloride-induced lupus-like autoimmune disease in rats (49). Because the expression of these proinflammatory cytokines is increased only in weeks 10 to 12, *i.e.*, significantly later than the first increase in chemokine levels, these proinflammatory cytokines do not seem to play a role in the earlier events in disease initiation. Nevertheless, some differences in temporal expression patterns could be observed. For example, we observed that the pattern of TNF- α and IL-1 β mRNA expression was sequential, in concordance with the observations by McHale *et al.* (26), who also described sequential expression of these two cytokines and related it to intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression in MRL/lpr mice. The infiltrating leukocytes may be the source of cytokine production, and the combination of glomerular leukocyte accumulation and cytokine production may contribute to the initiation of proteinuria.

Another observation that deserves comment is the equal expression of TGF- β 1 and - β 2 in kidneys from MRL control mice and MRL/lpr mice. TGF- β mRNA levels increased with age in both types of mice but did so equally. Elevated TGF- β levels have been implicated as a major factor responsible for glomerulosclerosis and renal fibrosis in various forms of renal disease, but TGF- β also acts as an anti-inflammatory cytokine (50). Because TGF- β is present in the matrix in an inactive form, our data on TGF- β mRNA levels cannot rule out a potential role of this cytokine in the progressive renal damage of murine lupus nephritis. In any case, our data on the equal TGF- β expression in control and lupus mouse kidneys raise the

issue of the contribution of this cytokine in this form of renal disease.

In conclusion, our results strongly support the hypothesis that the expression of specific chemokines is an initiating event in experimental lupus nephritis. The time course analysis of chemokines during murine lupus nephritis suggests that they are early mediators required for the recruitment of mononuclear cells into the kidney. In addition, during the initiation and progression phases, chemokines are preferentially localized to the tissue compartments with IC deposition, *i.e.*, the glomeruli and to some extent the interstitium. These are also the areas of subsequent mononuclear cell infiltration. Therefore, chemokines are early mediators of renal injury, and studies with antagonists for the respective chemokine receptors not only may provide a “proof of concept” but also may expand the limited repertoire of immunosuppressive drugs for the treatment of lupus nephritis.

Acknowledgments

G.P.d.L. and H.M. contributed equally to this work. G.P.d.L. was supported by a postdoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Cultura (Grant EX 97 7230290). We thank Dr. Peter J. Nelson for careful reading of the manuscript, Dr. Ignacio Arribas Gómez for technical advice regarding clinical chemistry and for comments on the manuscript, and V. Senger and A. Becher for dedicated care of the animals. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to B.L. and from the Fondo de Investigación Sanitaria (Grant 00/0246) and the Comunidad de Madrid (Grant 08.4/0015/98) to F.M.

References

1. Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB, Cameron JS: Lupus nephritis: Correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney Int* 37: 100–109, 1990
2. Cameron JS: Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 10: 413–424, 1999
3. Churg J, Bernstein J, Glasscock RJ (editors): *Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Diseases*, 2nd Ed., New York, Igaku-Shoin Medical Publishers, 1995, pp 151–178
4. Vyse TJ, Kotzin BL: Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 8: 843–851, 1996
5. Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev* 55: 179–216, 1981
6. Cohen PL, Eisenberg RA: Lpr and gld: Single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 9: 243–269, 1991
7. Chu JL, Drappa J, Parnassa A, Elkon KB: The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J Exp Med* 178: 723–730, 1993
8. Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S: Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1756–1760, 1993
9. Merino R, Iwamoto M, Fossati L, Izui S: Polyclonal B cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZB \times NZW) F_1 and MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J Immunol* 151: 6509–6516, 1993
10. Premack BA, Schall TJ: Chemokine receptors: Gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 2: 1174–1178, 1996

11. Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K: Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J* 10: 1418–1425, 1996
12. Feng L, Xia Y, Yoshimura T, Wilson CB: Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody. *J Clin Invest* 95: 1009–1017, 1995
13. Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB: Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1: Rapid communication. *Kidney Int* 56: 612–620, 1999
14. Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RA: Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 51: 770–776, 1997
15. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A: Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest* 73: 804–809, 1995
16. Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J: Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 71: 536–542, 1994
17. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi K, Matsushima K: Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 49: 761–767, 1996
18. Zoja C, Liu XH, Donadelli R, Abbate M, Testa D, Corna D, Taraboletti G, Vecchi A, Dong QG, Rollins BJ, Bertani T, Remuzzi G: Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *J Am Soc Nephrol* 8: 720–729, 1997
19. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR: Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 190: 1813–1824, 1999
20. Gong JH, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I: An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med* 186: 131–137, 1997
21. Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D: Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 56: 52–64, 1999
22. Banas B, Luckow B, Moller M, Klier C, Nelson PJ, Schadde E, Brigl M, Halevy D, Holthofer H, Reinhart B, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 10: 2314–2322, 1999
23. Deckers JG, Van Der Woude FJ, Van Der Kooij SW, Daha MR: Synergistic effect of IL-1 α , IFN- γ , and TNF- α on RANTES production by human renal tubular epithelial cells *in vitro*. *J Am Soc Nephrol* 9: 194–202, 1998
24. Kakizaki Y, Waga S, Sugimoto K, Tanaka H, Nukii K, Takeya M, Yoshimura T, Yokoyama M: Production of monocyte chemoattractant protein-1 by bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 48: 1866–1874, 1995
25. Kitamura M: Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF- β 1. *J Immunol* 159: 1404–1411, 1997
26. McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO: TNF- α and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Immunol* 163: 3993–4000, 1999
27. Haas C, Ryffel B, Le Hir M: IFN- γ is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J Immunol* 158: 5484–5491, 1997
28. Schwarting A, Moore K, Wada T, Tesch G, Yoon HJ, Kelley VR: IFN- γ limits macrophage expansion in MRL-Fas(lpr) autoimmune interstitial nephritis: A negative regulatory pathway. *J Immunol* 160: 4074–4081, 1998
29. Anders H-J, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Segerer S, Luckow B, Weller L, Gröne H-J, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12: 919–931, 2001
30. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976
31. Bartels H, Bohmer M, Heierli C: Serum creatinine determination without protein precipitation. *Clin Chim Acta* 37: 193–197, 1972
32. Hoffmann JP: Stability of blood, serum and urine. *Ther Umsch* 28: 662–665, 1971
33. Pisetsky DS, Peters DV: A simple enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to native DNA. *J Immunol Methods* 41: 187–200, 1981
34. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987
35. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE: Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 25: 689–695, 1984
36. McCluskey RT, Collins AB, Niles JL: Kidney. In: *Diagnostic Immunopathology*, edited by Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, New York, Raven Press, 1995, pp 109–125
37. Mampaso FM, Wilson CB: Characterization of inflammatory cells in autoimmune tubulointerstitial nephritis in rats. *Kidney Int* 23: 448–457, 1983
38. Luckow B, Maier H, Chilla S, Pérez de Lema G: The mCK-5 multiprobe RNase protection assay kit can yield erroneous results for the murine chemokines IP-10 and MCP-1. *Anal Biochem* 286: 193–197, 2000
39. Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Lee S, Hishikawa T, Sekigawa I, Tokano Y, Takasaki Y, Hirose SI, Hashimoto H: Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 26: 568–573, 1999
40. Hora K, Satriano JA, Santiago A, Mori T, Stanley ER, Shan Z, Schlöndorff D: Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1745–1749, 1992
41. Topham PS, Csizmadia V, Soler D, Hines D, Gerard CJ, Salant DJ, Hancock WW: Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* 104: 1549–1557, 1999
42. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, Lasagni L, Luconi M, Galli G, Cosmi L, Maggi E, Salvadori M, Pupilli C, Serio M: Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10: 2518–2526, 1999
43. Gomez-Guerrero C, Duque N, Casado MT, Pastor C, Blanco J, Mampaso F, Vivanco F, Egido J: Administration of IgG Fc

- fragments prevents glomerular injury in experimental immune complex nephritis. *J Immunol* 164: 2092–2101, 2000
44. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 8: 1537–1545, 1997
 45. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11: 152–176, 2000
 46. Schwarting A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelley VR: IFN- γ receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol* 161: 494–503, 1998
 47. Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN: Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest* 101: 364–371, 1998
 48. Herrera-Esparza R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Diaz E: Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis. *Lupus* 7: 154–158, 1998
 49. Molina A, Sánchez-Madrid F, Bricio T, Martín A, Escudero E, Alvarez V, Mampaso F: Abrogation of mercuric chloride-induced nephritis in the Brown Norway rat by treatment with antibodies against TNFalpha. *Med Inflamm* 4: 444–451, 1995
 50. Kitamura M, Suto TS: TGF-beta and glomerulonephritis: Anti-inflammatory versus prosclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant* 12: 669–679, 1997

**Access to UpToDate on-line is available for additional clinical information
at <http://www.jasn.org/>**