

3

Pilar Millán Pastor

*"ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE DIFERENTES INMUNOSUPRESORES (AZATIOPRINA,  
CICLOSPORINA Y PREDNISONA) SOBRE EL EJE ADRENO-GONADAL Y  
FUNCIONALIDAD HEPÁTICA Y RENAL EN CONEJOS NZW"*

Departamento de Fisiología Animal  
Universidad Complutense de Madrid

1998

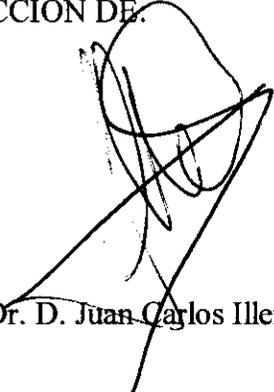
*A mi marido y mi hijo*

*A mis padres*

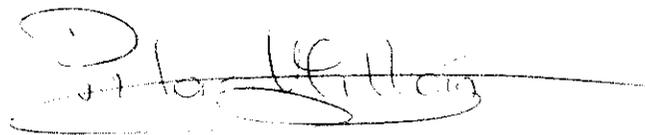
*"ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE DIFERENTES  
INMUNOSUPRESORES (AZATIOPRINA,  
CICLOSPORINA Y PREDNISONA) SOBRE EL  
EJE ADRENO-GONADAL Y FUNCIONALIDAD  
HEPÁTICA Y RENAL EN CONEJOS NZW"*

MEMORIA presentada para la colación  
del grado de Doctor, por la Licenciada en  
Veterinaria Dña. Pilar Millán Pastor

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA  
DIRECCIÓN DE.

Prof. Dr. D.  Illera del Portal

Licenciada Dña. Pilar Millán Pastor,  
aspirante al grado de Doctor en  
Veterinaria.



Madrid, Mayo, 1998

# **AGRADECIMIENTOS**

- *En primer lugar quisiera dar mi mayor agradecimiento a mi director de Tesis y amigo, el Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, por todo el tiempo y el interés que siempre ha mostrado en este trabajo; por su apoyo y tesón en todo momento (más, si acaso, en los que fueron menos gratos), por su afán de perfeccionismo y sus conocimientos; por todo el trabajo realizado en la iconografía de esta Tesis; por "no echarse para atrás" en ningún momento; por tantas cosas, que sólo puedo decir, gracias Juanqui.*
  
- *Al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Catedrático y Director del Departamento de Fisiología Animal, a "mi profesor", por haber puesto a mi alcance todos los medios necesarios para llevar a cabo esta Tesis, y por todas sus lecciones, de las que siempre he sacado provecho.*
  
- *A la Prof<sup>a</sup>. Dra. D<sup>a</sup>. Gema Silván Granado y amiga, por todo lo que me ha enseñado al cabo de estos años; por las horas pasadas en el laboratorio peleando con las placas; por soportar los rollos que la he metido; por estar ahí.*
  
- *Quiero dar las gracias a todos mis compañeros del Departamento, a Maria del Mar por aguantarme muchiiiisimas veces, por darme su apoyo y cariño; a Pedro por su gran ayuda con los animales y en todo aquello que he necesitado; a Alicia, Ana P, Ana H (mi compi de despacho), M<sup>a</sup> José I, Luis (por sus "contactos"), Olga, Rosana, Ana B y a todos aquellos que, en algún momento, pasaron por el Departamento; así como a M<sup>a</sup> José M, por todos los ratos que hemos pasado juntas peleando con (y por) el ordenador y la ortografía. No quiero olvidarme de dar las gracias a Bene, que siempre estuvo pendiente de la salud y las condiciones de mis animales, y a Jesus que también a estado pendiente de lo que necesitara.*
  
- *A los Médicos del Departamento de Bioquímica y Hematología del Hospital "La Paz" de Madrid (Dra Viloría y Dra La Rocha), por el apoyo e interés en analizar las muestras que les hemos remitido y por la curiosidad demostrada en esta especie, tan distinta a la humana, como es el conejo.*

- *A todos aquellos veterinarios y amigos (Nacho, Antonio, Elena...) que en algún momento han pasado por mi vida y de los que siempre he aprendido algo.*
  
- *A mi familia, a Carlos que se ha ganado el cielo, apoyándome animándome, soportándome, a cada momento y en todo momento; a mi hijo Carlos al que no he querido quitar tiempo de dedicación (espero que haya sido el mínimo) y que siempre me ha respondido con un beso; a mis padres y hermanos, por su empeño y empuje, por todo el cariño que me han dado; A mis suegros, Pepe y Matilde y a la familia Alfonso Álvarez, por tenerles siempre ofreciéndome su ayuda para poder llevar trabajo, familia y Tesis; a todos, muchas gracia.*

*Tal vez todo ésto comenzó hace mucho tiempo, posiblemente desde que decidí entrar en esta Facultad de Veterinaria (hoy casi mi casa). Desde entonces, he tenido la oportunidad de encontrarme a tantos amigos de los que he recibido su apoyo y cariño que espero no olvidarme de nadie, y si así fuera, que no me lo tuvieran en cuenta. Desde estas páginas, quiero agradecer a todas aquellas personas que me he ido encontrando a lo largo de este "camino" su apoyo y ayuda para poder seguir y llevar a cabo esta Tesis.*

# **ACRÓNIMOS**

---

AA	Adjuvant Arthritis - <i>Artritis adyuvante</i>
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone - <i>Hormona adrenocorticotropa</i>
ADCC	Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity <i>Citotoxicidad celular mediada por anticuerpo</i>
ALAT	Alanine Amino Transferase - <i>Alanina amino transferasa</i>
AMPc	Adenosine Monophosphate cyclic - <i>Monofosfato de adenosina cíclico</i>
APC	Antigen Presenting Cell - <i>Célula presentadora de antígenos</i>
ASAT	Aspartate Amino Transferase - <i>Aspartato amino transferasa</i>
BMDP	Biomedical Data Program - <i>Programa de datos biomédicos</i>
BSA	Bovine Serum Albumine - <i>Albúmina de suero bovino</i>
CD	Cluster of diferenciación - <i>Grupo de diferenciación</i>
CRH	Corticotropin-releasing Hormone - <i>Hormona liberadora de corticotropina</i>
CV	Coefficient of Variation - <i>Coficiente de variación</i>
DES	Diethylstilbestrol - <i>Dietilestilbestrol</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid - <i>Ácido desoxirribonucleico</i>
DHT	Di- Hidro- Testosterona
DS	Deviation Standar - <i>Desviación estándar</i>
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid - <i>Ácido etilendiaminotetracético</i>
EIA	Enzyme Immuno Assay - <i>Enzimoimmunoanálisis</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay <i>Análisis enzimático ligado a un inmunoabsorbente</i>
ESM	Error Standard Mean - <i>Error estándar de la media</i>
Fab	Fragment antigen-binding - <i>Fragmento que se une al antígeno</i>
Fc	Fragment Crystalline - <i>Fragmento cristalino</i>
FSH	Follicle-stimulating Hormone - <i>Hormona estimulante de los folículos</i>
GH	Growth Hormone - <i>Hormona de crecimiento</i>
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormone - <i>Hormona liberadora de gonadotropina</i>
GOT	Glutamic Oxalacetic Transaminase - <i>Transaminasa glutámico-oxalacética</i>
HPA	Hypotalamy pituitary adrenal - <i>Hipotálamo-hipófisis-adrenal</i>

---

HPG	Hypotalamy pituitary gonadal - <i>Hipotálamo-hipófisis-gonadal</i>
HPLC	High performance liquid chromatography <i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>
HRP	Horseradish peroxidase - <i>Peroxidasa de rábano picante</i>
IFN	Interferon - <i>Interferón</i>
Ig	Immunoglobulin - <i>Inmunoglobulina</i>
IGF	Insulin-like Growth Factor - <i>Factor de crecimiento semejante a la insulina</i>
IL	Interleukin - <i>Interleucina</i>
K	Killer - <i>Células agresoras</i>
LH	Luteinizing Hormone - <i>Hormona luteinizante</i>
LHRH	Luteinizing Hormone-releasing Hormone <i>Hormona liberadora de la hormona luteinizante</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex <i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>
MP	Mercaptopurine - <i>Mercaptopurina</i>
NK	Natural Killer - <i>Células destructoras naturales</i>
NZW	New Zealand White - <i>Blanco de Nueva Zelanda</i>
PBS	Phosphate-buffered normal Saline - <i>Salina-fosfato tamponada (solución)</i>
PG	Prostaglandin - <i>Prostaglandina</i>
PHA	Phyto-haemoagglutinin - <i>Fitoheмоaglutinina</i>
Pm	Peso molecular
POMC	Pro-opiomelanocortin - <i>Propiomelanocortina</i>
PSI	Pounds per Square Inch - <i>Libras por pulgada cuadrada</i>
RE	Endoplasmic Reticulum - <i>Reticulo endoplásmico</i>
RNA	Ribonucleic Acid - <i>Ácido ribonucleico</i>
SIDA	Acquired Immune Deficiency Syndrome <i>Síndrome de Inmundeficiencia Adquirida</i>
SRP	Signal recognizing protein - <i>Proteína de reconocimiento de la señal</i>
Tc	T citotoxic - <i>Célula T citotóxica</i>
Th	T helper - <i>Célula T cooperadora o coadyuvante</i>

TMB	Tetrametilbenzidina
TSH	Tyroid-stimulating Hormone - <i>Hormona estimulante de la tiroides</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor - <i>Factor de la necrosis tumoral</i>

# **CONTENIDO**

<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>I. SISTEMA INMUNOLÓGICO E INMUNOSUPRESION FARMACOLÓGICA</b> .....	8
1.- Respuesta Inmunologica	
2.- Agentes Inmunosupresores	
<b>II. SISTEMA INMUNOLÓGICO: LAS INMUNOGLOBULINAS</b> .....	18
1.- Estructura Básica de las Inmunoglobulinas.	
2.- Propiedades y Estructura de las Diferentes Clases de Inmunoglobulinas	
3.- Producción de Inmunoglobulinas	
4.-Características Específicas de las Inmunoglobulinas de Conejo	
4.1.- Inmunoglobulina G	
4.2.- Inmunoglobulina M e IgA	
<b>III. INTERACCION ENTRE LOS SISTEMAS INMUNE Y NEUROENDOCRINO</b> .....	30
<b>A. SISTEMA INMUNOLOGICO Y HORMONAS GLUCOCORTICOIDES</b>	
1.- Estrés e Inmunidad	
2.- Efecto de las Citoquinas en la Respuesta al Estrés	
y en los Ejes Neuroendocrinos	
<b>B. SISTEMA INMUNOLOGICO Y HORMONAS GONADALES</b> .....	36
1.- Efecto de las Hormonas Gonadales en el Sistema Inmune	
<b>C.- INTERCONEXIONES ENTRE LOS EJES HPA, REPRODUCTOR</b>	
<b>Y EL SISTEMA INMUNE</b> .....	43
1.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada	
2.- Interacción entre los Ejes HPA, Reproductor	
y el Sistema Inmune	
<b>IV. EFECTO DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES SOBRE EL SISTEMA</b>	
<b>ENDOCRINO, INMUNE Y FUNCIONALIDAD ORGÁNICA</b> .....	46
1.- Acción de los Agentes Inmunosupresores sobre el Sistema Endocrino	

2.- Efecto de los Inmunosupresores sobre los Niveles de Inmunoglobulinas

3.- Inmunosupresores y Funcionalidad Orgánica

**MATERIAL Y MÉTODOS** ..... 56

**I. ANIMALES**

1.- Elección del Animal

2.- Condiciones de Alojamiento

**II PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN** ..... 58

1.- Grupos Experimentales

2.- Fases de la Experimentación

3.- Preparación de los Animales: Tranquilización

4.- Administración de los Inmunosupresores

5.- Extracción Sanguínea y Procesado de las Muestras

**III. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y METODOLOGÍA UTILIZADA** ..... 63

1.- Determinación de Inmunoglobulina G (IgG)

2.- Determinación de las Concentraciones de Hormonas Esteroides: Cortisol,  
Corticosterona, Androstenodiona, Testosterona y Estradiol

3.- *Análisis de Parámetros Bioquímicos: Perfil Bioquímico*

**IV ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS** ..... 84

1.- Análisis de la Varianza

2.- Test de Mann-Wittney

**RESULTADOS** ..... 85

**I VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ELISA  
SANDWICH Y DE COMPETICIÓN**

1.- Validación y Puesta a Punto de la Técnica ELISA Sandwich para la  
Determinación de Inmunoglobulina G de Conejo

2.- Validación y Puesta a Punto de la Técnica ELISA de Competición para  
las Hormonas Esteroides: Cortisol, Corticosterona, Androstenodiona,

Testosterona y 17b-Estradiol de Conejo

II. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IGG .....	91
III. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE GLUCOCORTICOIDES ADRENALES .....	96
1.- Corticosterona	
2.- Cortisol	
IV. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE HORMONAS ESTEROIDES GONADALES	104
1.- Androstenodiona	
2.- Testosterona	
3.- 17b-Estradiol	
V. CONCENTRACIONES DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	116
1.- Pruebas de Funcionalidad Hepática	
2.- Pruebas de Funcionalidad Renal	
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>144</b>
1.- Elección de la Especie Animal y de los Fármacos Inmunosupresores	
2.- Concentraciones de Inmunoglobulina G de Conejo	
3.- Efecto de la Inmunosupresión sobre el Eje Adreno-Gonadal	
4.- Funcionalidad Orgánica	
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>176</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>184</b>

# **JUSTIFICACIÓN**

El Sistema Inmune dentro de los sistemas reguladores del organismo es uno de los más importantes, complejo y aún, en parte, desconocido. Además, todas las funciones de este sistema, están en continua comunicación con el resto de las funciones orgánicas.

En los últimos años, la Inmunología ha experimentado un gran avance, debido a la necesidad de conocer mejor el funcionamiento del sistema inmune, para poder resolver importantes alteraciones orgánicas producidas por un desajuste en las funciones inmunológicas, sobre todo desde la aparición de ciertas enfermedades como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

La farmacología ha intervenido (e interviene) en la resolución de las diferentes alteraciones en este campo, mediante la obtención de sustancias tan importantes como los agentes inmunosupresores y citostáticos, de gran valía en la prevención del rechazo en los trasplantes o en ciertas enfermedades autoinmunes y oncológicas.

La revisión bibliográfica de las relaciones existentes entre el Sistema Inmunológico y otros sistemas orgánicos, nos desveló la influencia que éste ejerce sobre el Sistema Endocrino, y viceversa. Estas relaciones llegan incluso a mantener contacto con el Sistema Nervioso. En efecto, se sabe que las células neuroendocrinas liberan hormonas que influyen en los linfocitos, ya que éstos poseen receptores para una amplia variedad de hormonas. Además, las células linfoides pueden producir por sí mismas hormonas que pueden actuar interviniendo en la respuesta inmune. Es interesante resaltar que un punto importante de discusión sobre las interacciones neuroendocrinas e inmunes es el estrés; así, se conoce que ciertas hormonas tienen carácter inmunoestimulante mientras otras son inmunosupresoras. Ciertas citocinas, factores solubles producidos por las células del sistema inmune, también ejercen su efecto en la regulación de la comunicación bidireccional inmune-endocrina, como es, su actuación en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Por otro lado, los estudios del efecto de las hormonas gonadales sobre el sistema inmune también indican una estrecha relación en las funciones de las diferentes hormonas con la respuesta inmune, siendo tanto estrógenos como progestágenos

o andrógenos capaces de regular dicha respuesta.

El interés que despierta el conocimiento de estas relaciones nos llevó a considerar la posibilidad de estudiarlas sobre un animal sano, administrándole diferentes sustancias inmunosupresoras, con distintos mecanismos de acción. Así se eligieron la *ciclosporina*, de gran importancia en este tipo de terapias y uno de los más selectivos; la *azatioprina*, agente muy utilizado en cirugía como preventivo del rechazo a diferentes tipos de trasplantes orgánicos, con un mecanismo de acción diferente al anterior; y la *prednisona*, representante de los glucocorticoides sintéticos y siempre presentes en este tipo de terapias y en otras de más amplio espectro.

El primer objetivo de nuestro trabajo es comprobar si efectivamente los tres inmunosupresores provocan una disminución en la respuesta inmune en conejos (*Oryctolagus cuniculus*); para ello, se estudiarán las concentraciones de Inmunoglobulina G a lo largo de la fase de tratamiento, comprobando si después de la retirada de los diferentes tratamientos, los niveles de IgG regresan a concentraciones semejantes a las de la fase previa al mismo. Para una mejor valoración de la acción inmunosupresora de los diferentes fármacos y debido a los pocos datos existentes e incluso contradictorios de los mismos, los niveles obtenidos con los animales tratados se compararán con un grupo de animales a los que no se les administrará ningún tratamiento inmunosupresor.

Una vez comprobado si los fármacos provocan la inmunosupresión deseada, se verificará si un cambio en el estado inmunológico de los animales, puede ejercer alguna acción sobre el sistema endocrino, fundamentalmente sobre el eje adreno-gonadal. Así se estudiará la corteza adrenal, tan importante en la regulación de los mecanismos implicados en el estrés, mediante la determinación de los niveles de hormonas adrenales: corticosterona y cortisol. También se evaluará la influencia que puede tener el agente inmunosupresor sobre la funcionalidad gonadal, para intentar dilucidar si el agente tiene capacidad para provocar alguna alteración del sistema reproductor. Para ello analizaremos los perfiles de las hormonas

implicadas en la esteroidogénesis testicular, como son: androstenodiona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol. Además, se estudiará si el efecto que pueden tener dichos fármacos sobre cada una de las glándulas repercute sobre la otra, ya que como se ha indicado en diferentes trabajos, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal puede regular el eje hipotálamo-hipófisis-gonada y viceversa.

Por otro lado, los estudios referentes a la administración de tratamientos inmunosupresores, se realizan sobre animales o personas sometidas a un trasplante o que padecen alguna enfermedad autoinmune, lo cuál puede afectar a nivel sistémico. Sin embargo existen muy pocos datos de referencia sobre el efecto del agente inmunosupresor en la funcionalidad orgánica en una persona o animal sano. Por esta razón, se hace necesaria la determinación de una serie de parámetros bioquímicos que nos puedan orientar sobre el estado del fisiologismo del animal. De esta forma, se intentará valorar las repercusiones del tratamiento en un animal sano y así poder asumir los posibles cambios producidos por el tratamiento inmunosupresivo sobre la funcionalidad del organismo de estos animales.

Para ello, se realizarán una serie de pruebas que establecerán el estado funcional de los diferentes órganos. Así, se determinarán diversas pruebas de la funcionalidad hepática basándonos en el análisis de diferentes parámetros dependiendo de las distintas funciones del hígado, teniendo en cuenta que estas sustancias se metabolizan por vía hepática.

Para evaluar la funcionalidad hepática se determinará la actividad enzimática de las siguientes enzimas: alanino amino transferasa y aspartato amino transferasa. Para la valoración de las funciones bioquímicas específicas que ejerce el hígado, se determinarán diferentes parámetros que afectan al metabolismo de las proteínas como, por ejemplo, la concentración sérica de las proteínas totales. El metabolismo de los lípidos se evaluará mediante la determinación del colesterol total y las concentraciones de los triglicéridos.

El conjunto de las pruebas realizadas nos dará una evaluación de la actividad hepática y de otras funcionalidades orgánicas relacionadas con ella.

Por otro lado, parece conveniente determinar parámetros bioquímicos relacionados con la funcionalidad renal y comprobar si los diferentes fármacos, ciclosporina, azatioprina y prednisona influyen en dicho funcionalismo y si ésto puede influir directa o indirectamente sobre otras constantes fisiológicas y también sobre el sistema endocrino. Con este motivo se determinarán la urea y creatinina séricas.

Con el conjunto de las diferentes pruebas anteriormente mencionadas y contrastándolas con los resultados de los animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento inmunosupresor, se podrán evaluar las posibles repercusiones de los tratamientos con ciclosporina, azatioprina y prednisona, sobre la funcionalidad orgánica de los animales y de esta forma, poder establecer y esclarecer la relación existente entre el sistema inmune y el eje adreno-gonadal.

# **INTRODUCCIÓN**

El Sistema Inmune no sólo se debe presentar como un sistema desarrollado en los seres vivos, partiendo de la necesidad que tienen de protegerse frente a todo aquello que les es extraño, sino también como una unidad orgánica cuyas actividades normales no están bajo la influencia de la estimulación externa, realizando una serie de funciones, que implican el mantenimiento de la integridad física, lo que conlleva una serie de relaciones con otros sistemas orgánicos, bien a través de la acción de las propias células (fagocitosis) como a través de componentes humorales (anticuerpos) y hormonales (linfocinas).

Desde finales del siglo XVIII, cuando Jenner descubrió la posibilidad de "vacunar" contra la viruela, la importancia de la Inmunología ha ido en aumento. A principios de este siglo se pensaba que todos sus mecanismos eran defensivos, y fue entonces cuando Richet y Portier descubrieron efectos no deseados del sistema inmune, *la anafilaxia*; lo que permitió comenzar a intuir la complejidad del sistema. Un conocimiento mejor del sistema inmune y sus relaciones con otros sistemas ha contribuido, de forma importante, a progresos en el conocimiento, no sólo de las enfermedades infecciosas, su profilaxis y tratamiento, sino también a los avances de la medicina moderna como sucede en los trasplantes de órganos, en las enfermedades autoinmunes, o en enfermedades neoplásicas; así como en las alteraciones provocadas por un déficit de este sistema, como por ejemplo ocurre en las enfermedades donde se produce una inmunosupresión tanto congénita, farmacológica o infecciosa, como ocurre en el tan preocupante Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

El sistema inmune no se encuentra en modo alguno aislado de los otros sistemas de control del organismo; de hecho, existen numerosas posibilidades de comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario como sucede, por ejemplo, en el estrés donde los niveles hormonales producen un efecto sobre el sistema inmune, así como a su vez, las células inmunes son capaces de producir hormonas inmunorreactivas. Las correlaciones entre estos sistemas de control, son importantes para explicar una serie de fenómenos que se producen en el organismo, en diferentes situaciones fisiológicas relacionadas con los perfiles hormonales y la respuesta inmune que provocan.

## ***I. SISTEMA INMUNOLÓGICO E INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA***

El sistema inmune se halla organizado en un conjunto de células que forman tejidos y órganos que constituyen el sistema linfoide y en un grupo de células linfocitarias y del sistema mononuclear fagocitario, que se encuentran circulando por el organismo.

### **1.- Respuesta Inmunológica**

El organismo ante la presencia de una sustancia extraña, que se comporta como antígeno, va a producir una respuesta, la respuesta inmunológica. Dependiendo de los factores que intervengan, se puede dividir en dos tipos de respuesta: respuesta humoral y respuesta mediada por células.

La respuesta humoral depende de la interacción del antígeno con el anticuerpo. Los anticuerpos son capaces de reconocer el antígeno siempre que tengan acceso a él y activar mecanismos muy eficaces de defensa. El apelativo de "humoral" no indica que no intervengan células, ya que para que se produzca esta respuesta es necesaria la activación de los linfocitos B, que se transformarán en células plasmáticas que producirán los anticuerpos y de los linfocitos T que producen factores solubles necesarios en la activación de los linfocitos B. Además, para que se logre su objetivo, la eliminación de aquel antígeno que inició la respuesta, es necesario atraer y dirigir a las células fagocitarias al lugar donde deben de realizar su cometido (Gomez de la Concha, 1992).

La respuesta mediada por células, se inicia a partir de la activación de los linfocitos T y se desarrolla con el fin de eliminar los antígenos que se encuentran "escondidos" en el interior de las células, que no pueden ser atacados por los anticuerpos. Por tanto, aunque en ocasiones colaboran los dos tipos de respuesta, otras veces, dependiendo del tipo de infección, actuará una sobre otra (Feldmann y Male, 1991).

El desarrollo de la respuesta inmunitaria, tras la activación inducida por el antígeno

incluye, el complejo proceso por el cual los linfocitos estimulados específicamente por éste, proliferan y se diferencian hacia células efectoras.

### 1.1.- Activación de los linfocitos T

En la activación de los linfocitos T se pueden diferenciar dos: inducción y expansión (véase figura 1).

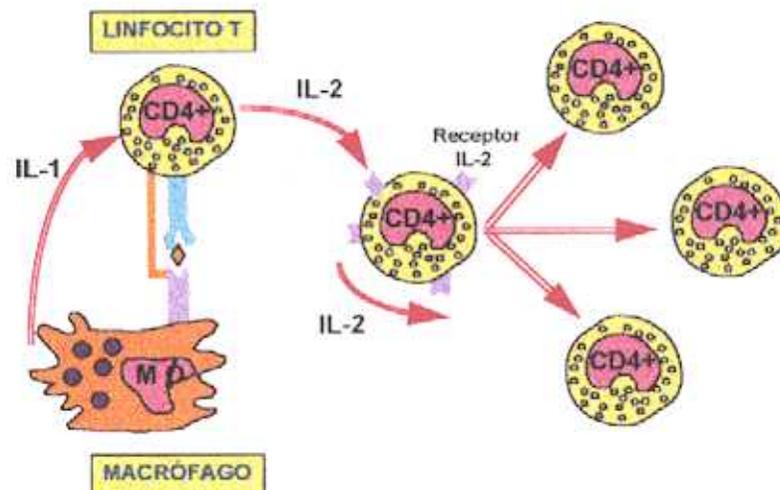


Figura 1

#### 1.1.1.- Inducción

El linfocito T para poder ser activado por un antígeno necesita ser reconocido en la superficie de una célula, en presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y así ser captados por células presentadoras de antígenos (APC), siendo modificados en su citoplasma, este mecanismo se denomina procesamiento antigénico (Engelhard, 1994).

Entonces, la célula accesoria, generalmente monocito/macrófago segrega al medio interleucina-1 (IL-1), que interacciona con el receptor del linfocito. Ésto produce, por un lado, un incremento de la producción de IL-1 y, por otro, una amplificación en la respuesta bioquímica intracelular inducida en la célula T produciéndose la activación del

correspondiente clon linfocitario T (Shevach, 1990; Alvarez de Mon y Garcia, 1992).

### 1.1.2.- Expansión

Las células T activadas incrementan la expresión de receptores para IL-2. Simultáneamente, la IL-2 segregada al medio, actúa sobre la población que expresa el receptor para la IL-2 (IL-2R). Tras la unión al receptor, el complejo IL-2 y IL-2R se internaliza en la célula (véase figura 1). El resultado final de este proceso es la proliferación y expansión del correspondiente clon de linfocitos T cooperadores (Th) y la síntesis de linfocinas que regulan la proliferación y diferenciación de las células B, NK y T citotóxicas (Tc) (Smith, 1990).

### 1.2.- Activación de los Linfocitos B

Generalmente, la activación de los linfocitos B, requiere la interacción con el antígeno y la colaboración de los linfocitos T cooperadores. La activación de los linfocitos B se divide en diferentes fases (véase figura 2).

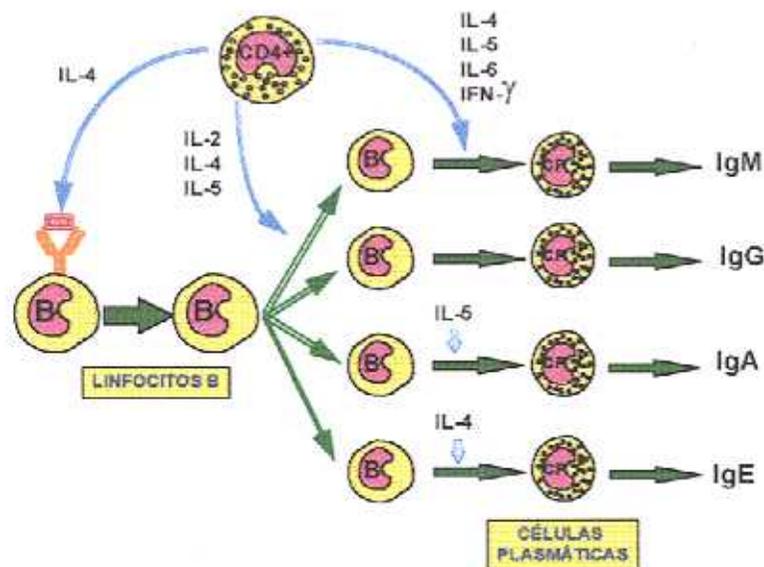


Figura 2

### ***1.2.1.- Activación***

Los linfocitos B reconocen específicamente el antígeno por medio de las inmunoglobulinas de superficie. También se produce la endocitosis del complejo antígeno-inmunoglobulina por el linfocito B, el cuál lo metaboliza y reexpresa en su membrana los determinantes antigénicos, a modo de APC.

### ***1.2.2.- Proliferación***

De forma similar a la de los linfocitos T, los B, proliferan gracias a la interacción de linfocinas (IL-2, IL-4, interferón- $\gamma$  y linfotóxina) y monocinas (IL-1 y factor de necrosis tumoral) con sus receptores. Parece ser que algunas subpoblaciones de linfocitos B pueden secretar linfocinas, regulando de forma autocrina su propia proliferación (Feldmann y Male, 1991).

### ***1.2.3.- Diferenciación de los Linfocitos B en Células Productoras de Inmunoglobulinas***

A lo largo de los diferentes ciclos de proliferación de los linfocitos B, algunos adquieren la capacidad de diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Este proceso se debe, en parte, a la adquisición de receptores para citocinas inductoras de esta diferenciación que progresará irreversiblemente hacia célula plasmática (véase figura 2).

Entre las linfocinas y monocinas capaces de regular la diferenciación de los linfocitos B, clonalmente activados por el antígeno hacia células plasmáticas, se incluyen la Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, factor de necrosis tumoral y linfotoxinas (Alvarez de Mon y García, 1992).

## **2.- Agentes Inmunosupresores**

Se puede denominar inmunosupresión a una alteración del sistema inmune que deprime, en parte o completamente, las acciones que tiene encomendadas. La causa puede ser de diferente tipo: por motivos genéticos, infecciosos o ser provocado por el efecto de ciertos agentes farmacológicos que inhiben o alteran la respuesta inmunológica.

Después del gran avance que supuso para la medicina clínica el tratamiento quirúrgico de ciertas enfermedades mediante el trasplante de órganos, surgió el problema de cómo evitar la respuesta inmune del hospedador frente al injerto; es decir, el rechazo del órgano trasplantado. Fue a partir de la década de los 60, cuando se inicia el uso de fármacos que pudieran disminuir esos efectos indeseados. Surgieron compuestos utilizados para tal fin, como la azatioprina; posteriormente, se aplicaron otros compuestos como corticoides, ciclosporina, anticuerpos inmunosupresores y más recientemente, otros inmunomoduladores de nueva generación. El fin de la terapia producida con estos fármacos es inhibir, en algún paso, la respuesta inmunológica. Cada uno de los diferentes tipos de fármacos van a actuar en distintos momentos de la respuesta inmunológica.

### **2.1.- Ciclosporina**

Es un polipéptido cíclico de 11 aminoácidos que se aisló de cultivos del hongo *Tolipocladium inflatum* Gams (Borel *et al.*, 1976; Wenger, 1985; Wenger *et al.*, 1986). Su acción se centra, de forma selectiva, preferentemente sobre el linfocito T activado, inhibiendo la producción de linfocinas. La ciclosporina interfiere en la señal que induce la activación del linfocito T sensibilizado después del contacto con el macrófago presentador del antígeno, por lo que dicho linfocito T no queda activado (White *et al.*, 1979; Lafferty *et al.*, 1983). Si ya se ha establecido esta activación, la ciclosporina actúa sobre el linfocito T activado inhibiendo la producción de linfocinas, en especial el interferón- $\gamma$  y la interleucina-2 y sin ninguna acción directa sobre los linfocitos citotóxicos (Borell y Ryfell, 1985; Yoshimura *et al.*, 1988). La disminución de Interleucina-2 conlleva que no se

produzca la clonación de los linfocitos citotóxicos (linfocitos CD8, células agresoras naturales NK), y además, no se produce la expresión de los receptores para la Interleucina-2 de los linfocitos (Thompson, 1983) (véase figura 5).

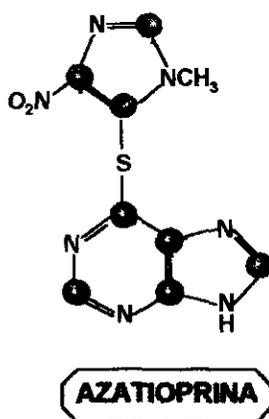
La disminución del interferón gamma comportará el que no aumente el número de células presentadoras de antígeno, con lo que disminuirá el número de linfocitos activos o sensibilizados al antígeno.

La ciclosporina es un potente inmunosupresor, aunque presenta efectos nefrotóxicos y hepatotóxicos; la introducción por Calne y White (1977) de este fármaco en la prevención del rechazo, es uno de los mayores logros producidos en los últimos años.

## 2.2.- Análogos de la Purina

En 1959, Schwartz y Dameshek demostraron que un antimetabolito análogo de la purina, la 6-mercaptopurina (6-MP), suprimía la respuesta inmune en conejos. Posteriormente Calne (1960), demostró que la 6-MP inmunosuprimía profundamente el rechazo del injerto renal en perros. En un esfuerzo por reducir los efectos tóxicos de este compuesto, Hitchings y Ellion desarrollaron la azatioprina como un derivado imidazólico de la 6-MP (Schwartz y Dameshek, 1959; Calne, 1960; Hitchings y Ellion, 1963).

### 2.2.1.- Azatioprina



La azatioprina es una sustancia sintética derivada de la 6-mercaptopurina, a la que se le adiciona un anillo imidazólico. La composición química es la 6-(1-Metil-4-nitroimidazol-5-tio) purina (véase figura 3).

La supresión de la respuesta inmune por la administración sistémica de los análogos de la purina como azatioprina ó 6-

Figura 3

mercaptopurina, se produce por una inhibición dirigida hacia los mecanismos de formación de anticuerpos, produciendo un debilitamiento del sistema de respuesta inmune, probablemente por interferencia directa con el metabolismo de la purina en el tejido linfoide, durante la fase temprana de inducción de la reacción inmune (Sterz, 1960). Este antimetabolito afecta a los linfocitos en proliferación (y no a los que están en reposo) y puede suprimir la respuesta de anticuerpos, tanto primarios como secundarios, si se suministra después de la exposición al antígeno.

La azatioprina posee una importante acción antiinflamatoria, debido a su capacidad de inhibir la producción de macrófagos. Carece de efectos directos sobre la producción de mediadores solubles, por parte de los linfocitos, y afecta por igual a los linfocitos T y B (véase figura 5).

Desde los primeros estudios de Hitchings *et al.*, que se iniciaron en 1942, muchos análogos de bases, nucleósidos y nucleótidos naturales de purina se han examinado en gran variedad de sistemas biológicos y bioquímicos. Estas amplias investigaciones han permitido la aparición de varios fármacos, no sólo útiles para el tratamiento de enfermedades malignas (mercaptopurina, tioguanina) sino también para la terapéutica inmunosupresora (azatioprina) y antiviral (acyclovir, vidarabina). El análogo de hipoxantina, alopurinol, un potente inhibidor de la xantinaoxidasa, es un importante subproducto de estos esfuerzos. Un desarrollo muy prometedor, es el descubrimiento de poderosos inhibidores de adenosina desaminasa, por ejemplo eritrohidroxinoniladenina y pentostatina (2'-desoxicoformicina) (Elion y Hitchings, 1965; Elion, 1967; Loo y Nelson, 1982; McCormack y Johns, 1982).

### **2.3.- Glucocorticoides**

Los corticosteroides constituyen una parte importante de la mayoría de los regímenes inmunosupresores. Pese a la extensa experiencia clínica con estos fármacos, aún no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los corticoides en la inmunomodulación. Parte de la razón de esta falta de conocimiento es el elevado número

de funciones biológicas distintas que poseen los corticoides. Además de sus bien conocidas propiedades antiinflamatorias, los corticoides tienen un efecto estabilizador de membrana que puede reducir la capacidad del sistema inmunitario para presentar antígenos. Esto puede, también, producir cambios en los patrones del tráfico celular. En concreto, hay cambios acusados en la distribución de las células T, con la aparición de un número muy reducido de ellas en la circulación (Claman, 1987; Zubiaga *et al.*, 1992). Los corticosteroides también pueden enlentecer la división celular e influir en el tamaño global del conjunto de linfocitos (Weston *et al.*, 1973; Haynes y Murad, 1986) (véase figura 5).

Los estudios sobre el efecto en la producción de anticuerpos han sido controvertidos, se indican datos de que altas concentraciones pueden producir una ligera disminución de la IgG en humana, como consecuencia tanto de un decrecimiento en la síntesis como de un incremento en el catabolismo (Butler y Rossen, 1973).

### 2.3.1.- Relación Estructura-actividad

La estructura básica de un glucocorticoide consta de 21 átomos de carbono en distribución pregnano, doble enlace  $C_4 = C_5$  y un oxígeno en los carbonos  $C_3$ ,  $C_{11}$  y  $C_{20}$ . A partir de dicha estructura, la molécula se ha modificado y así, han surgido diferentes

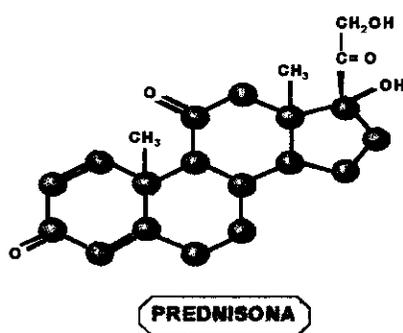


Figura 4

glucocorticoides sintético: los de primera generación, son los que tienen una modificación con un doble enlace entre  $C_1 = C_2$  aumentando la actividad biológica, la vida media y disminuye la actividad mineralocorticoide, entre ellos los más utilizados son, la prednisona y uno de sus derivados, la prednisolona (véase figura 4). Posteriormente, aparecieron los glucocorticoides sintéticos de segunda y tercera generación, en estos grupos se encuentran la dexametasona y el deflazacort (Haynes y Murad, 1986).

Las propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras de estos productos hacen que

sean muy útiles en la prevención de las reacciones inmunológicas adversas. Sin embargo, su empleo está limitado por los graves efectos secundarios con los que están asociados (Weston *et al.*, 1973; Nieto *et al.*, 1992).

**2.4.- Anticuerpos como Inmunosupresores.**

La idea de la utilización de anticuerpos, frente a linfocitos para suprimir el sistema inmunológico, comenzó con el empleo de anticuerpos policlonales antilinfocíticos y antitimocíticos y, más tarde, anticuerpos monoclonales producidos en roedores, dirigidos contra los antígenos de diferenciación, bloqueando las funciones de la célula T, pero aún, sólo se utilizan como "dosis única", ya que una segunda dosis podría ser neutralizada por la acción de anticuerpos producidos tras la primera exposición (Casinni *et al.*, 1981).

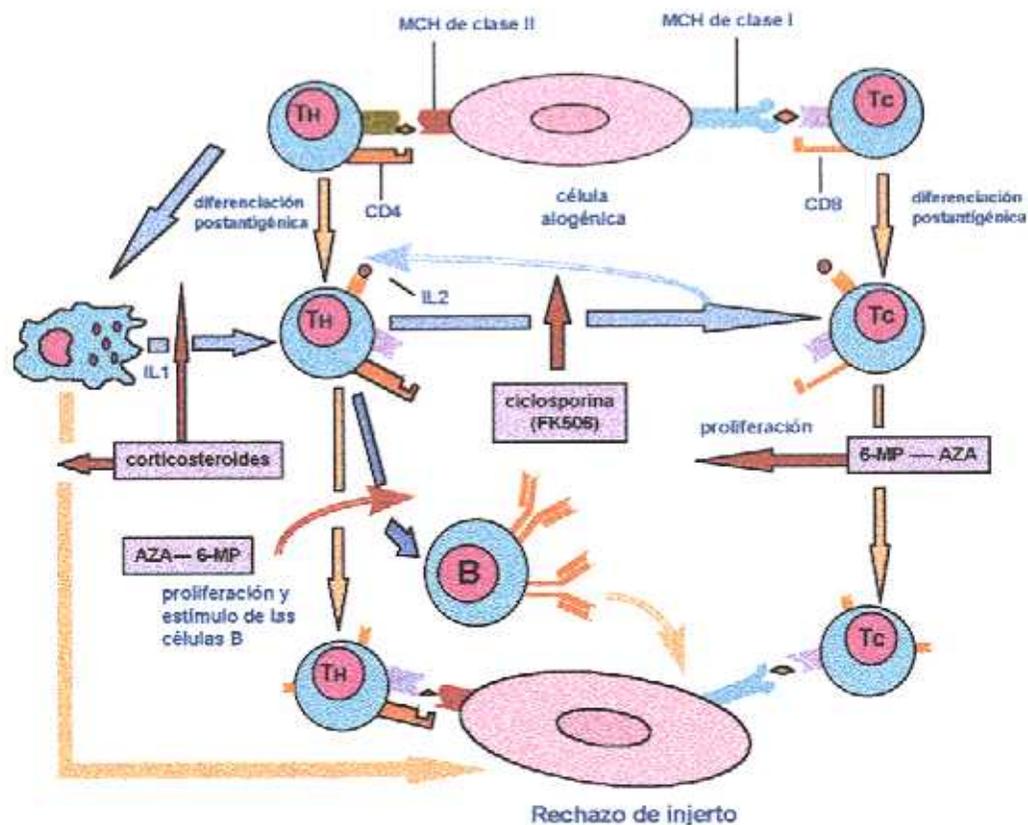


Figura 5

### **2.5.- FK506**

Es un macrólido aislado del *Streptomyces tsukubaensis* en Japón en 1983. Impide la activación de los linfocitos T inhibiendo la producción de interleucina, es un fármaco eficaz y con pocos efectos secundarios a corto plazo, con un mecanismo de acción semejante al de la ciclosporina (McCaulley *et al.*, 1990; Murase *et al.*, 1990; Gorski *et al.*, 1991) (vease figura 5).

## **II. SISTEMA INMUNOLÓGICO: LAS INMUNOGLOBULINAS**

El fundamento de una respuesta inmunitaria es el reconocimiento de marcadores químicos que distingan lo propio de lo ajeno. Las moléculas implicadas en esta labor son proteínas con una característica especial, su gran variabilidad. Esto permite que cada molécula sea capaz de reconocer un modelo específico de efector. Las proteínas de reconocimiento implicadas en la respuesta humoral son las inmunoglobulinas o anticuerpos, glucoproteínas séricas sintetizadas por los vertebrados para actuar frente a los diferentes antígenos.

Los linfocitos B son las células productoras de anticuerpos. Su modo de acción fundamental se recoge en *La Teoría de la Selección Clonal* propuesta por Macfarlane Burnet. Conforme madura la célula B en la médula ósea, queda comprometida en la síntesis de anticuerpos que reconocen un antígeno, o modelo molecular, específico. Todos los descendientes de esa célula, formarán un clon inmunológicamente idéntico. Los anticuerpos producidos por la célula B permanecen anclados en la superficie celular a modo de moléculas receptoras. Cuando un antígeno se une a este receptor, la célula B se activa y comienza un proceso de proliferación de dicha célula. Parte de la descendencia de los clones seleccionados permanece en forma de linfocito B circulante, comportándose como células de la memoria que en una segunda exposición al antígeno actuarán provocando una respuesta más rápida. Otra parte de las células del clon, sufre un proceso de diferenciación, dejan de reproducirse, aumentan de tamaño y comienzan la producción y secreción de inmunoglobulinas específicas, son las células plasmáticas (Jerne, 1955; Burnet, 1957; Jerne, 1974).

En esencia, cada molécula de inmunoglobulina es bifuncional; una región de la molécula interviene en la unión específica con el antígeno, mientras que otra es la responsable de la unión a los tejidos y moléculas del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario, células fagocíticas y componentes del sistema de complemento (Tonegawa, 1985).

### 1.- Estructura Básica de las Inmunoglobulinas.

En la mayoría de los mamíferos superiores se conocen cinco clases o tipos distintos de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que difieren unas de otras en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de glúcidos, proporcionando unas características físicas y químicas diferentes.

Una molécula básica de anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras L idénticas, de unos 220 aminoácidos y Pm de 25.000 daltons y dos cadenas pesadas H idénticas, de 330 ó 440 aminoácidos y Pm de 50.000 ó 77.000 daltons. Las cuatro cadenas se mantienen unidas entre sí por puentes disulfuro, enlaces covalentes y no covalentes, formando una estructura en forma de Y (Porter, 1973).

La estructura tridimensional de las inmunoglobulinas ha sido determinada por el método de difracción simple de rayos X, observándose que las inmunoglobulinas son *proteínas multiméricas unidas por puentes disulfuro inter e intracatenarios que delimitan subunidades globulares o dominios* con unas características similares en su estructura secundaria y terciaria de lámina  $\beta$  plegada antiparalela, que proporciona al volumen interno de estas subunidades una fuerte unión por restos hidrofóbicos. La cadena L posee dos dominios y la cadena H cuatro o cinco dependiendo del tipo de inmunoglobulina. Cada puente disulfuro abarca un asa peptídica de unos 60 ó 70 aminoácidos que presentan una notable homología entre asas, se denominan regiones homólogas y representan la porción central de un dominio de aproximadamente 110 residuos aminoacídicos. En cada región de homología reside una propiedad biológica determinada (Poljak, 1975).

Tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras, el extremo N terminal está constituido por una secuencia de aminoácidos donde reside la mayor diferencia entre los anticuerpos, es lo que constituye la región variable ( $V_L$  y  $V_H$ ), mientras que las demás subunidades estructurales o dominios mantienen una semejanza común en todas las inmunoglobulinas, constituyendo la región constante de las cadenas ligera  $C_L$  y pesada  $C_H$ .

De esta forma, la cadena ligera estará dividida en dos subunidades,  $V_L$  y  $C_L$ , y las cadenas pesadas en  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  en las IgG, IgA e IgD y además  $C_{H4}$  en IgM e IgE. Las regiones constantes, son altamente homólogas entre si y las regiones variables también lo son entre si (Edelman et al., 1969) (véase figura 6). En el dominio  $C_{H2}$  es donde tiene lugar la unión al primer componente del complemento ( $C1q$ ), y es la región que controla el catabolismo de las inmunoglobulinas (Yasmeen et al., 1976; Dorrington, 1985).

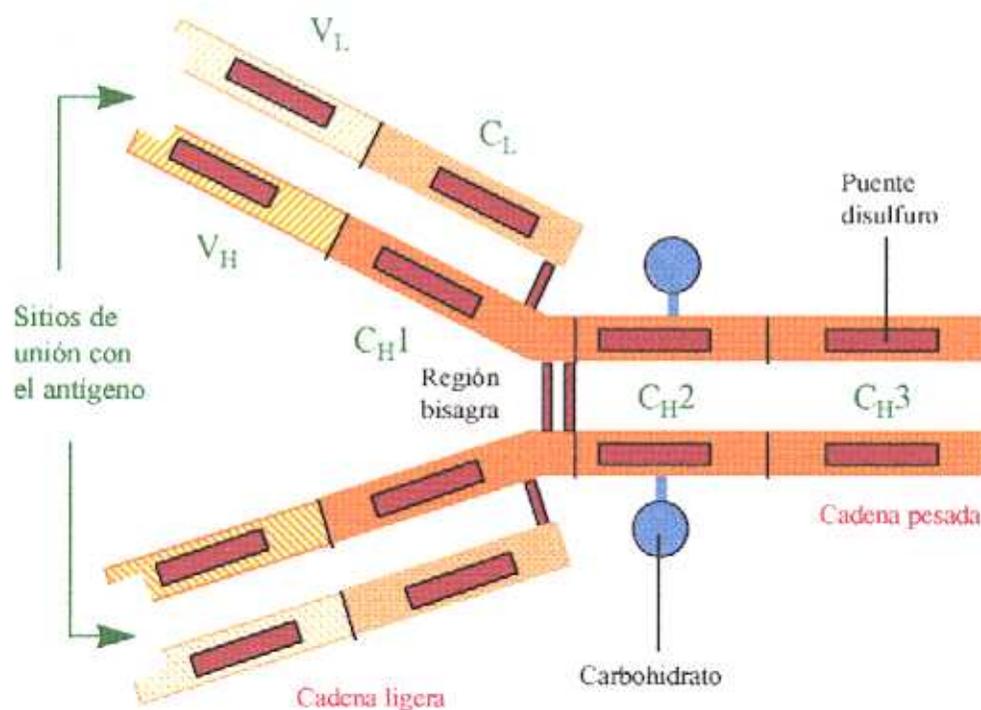


Figura 6

Dentro de la región variable de cada cadena, se encuentran tres pequeños segmentos, cuyas secuencias de aminoácidos son especialmente diversas. Estos segmentos "hipervariables" se reúnen al final de cada brazo, formando una hendidura que actúa de sitio de unión con el antígeno. La especificidad de la molécula depende de la forma de la hendidura y de las propiedades de los grupos químicos que recubren sus paredes; por tanto, la naturaleza del antígeno, reconocido por un anticuerpo, está determinada, fundamentalmente, por la secuencia de aminoácidos de las regiones hipervariables (Wu y Kabat, 1970) (véase figura 6).

Se denomina *región bisagra* a un pequeño segmento de la cadena pesada, entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ , donde están situados los puentes disulfuro que unen las dos cadenas pesadas, este área tiene una cierta flexibilidad que permite que varíe la distancia entre los dos sitios de unión con el antígeno, haciendo posible que operen independientemente (Frangione y Milstein, 1967; Amzel y Poljak, 1979).

## **2.- Propiedades y Estructura de las Diferentes Clases de Inmunoglobulinas**

Aunque las inmunoglobulinas son muy similares en lo que a la estructura general y funciones se refiere, unas difieren de otras en sus propiedades físicas y químicas.

### **2.1.- Tipos o Isotipos y subclases**

En la región constante de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas existen pequeñas diferencias que pueden ser clasificadas antigénicamente por isotipos o clases:

- \* Isotipo de regiones constantes en la cadena ligera: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ).
- \* Isotipo de regiones constantes de la cadena pesada: mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), y alfa ( $\alpha$ ).

Los diferentes isotipos de las cadenas pesadas son las que dan lugar a las diferentes clases de inmunoglobulinas. La IgG tiene una cadena pesada  $\gamma$ , la IgM una  $\mu$ , la IgA una  $\alpha$ , la IgD una  $\delta$  y la IgE tendrá una cadena pesada del isotipo  $\epsilon$ .

Cualquiera de los tipos de cadenas ligeras se pueden combinar con cualquiera de los de cadenas pesadas, pero en una misma molécula las dos ligeras son siempre del mismo tipo y no existen moléculas híbridas naturales.

Los anticuerpos que poseen las mismas regiones variables, pero diferentes clases de

cadena pesada, reconocen a los mismos antígenos pero desempeñan papeles diferentes en la respuesta inmunitaria. Así, los anticuerpos unidos a la membrana que sirven de receptores en la célula B llevan incorporadas cadenas  $\mu$  o  $\delta$ , mientras que la mayoría de los anticuerpos secretados en respuesta a un antígeno contienen cadenas  $\gamma$  o  $\alpha$ .

Se han encontrado diversas subclases de inmunoglobulinas G con pequeñas variaciones en la secuencia aminoacídica de la región constante de la cadena pesada y en las uniones intercadena por puentes disulfuro de la IgG, que comporta cierta variación estructural y, en algunos casos, variaciones en las funciones. La aparición de estas subclases parece ser posterior a la formación de las especies y así, en la humana aparecen 4 subclases diferentes: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 pero las características y funciones de éstas no son comparables, por ejemplo, con las 4 subclases identificadas en el ratón. En otras especies animales, incluso pueden faltar alguna de las subclases. En ciertas especies animales se han descrito dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, como el conejo, mientras que de IgM, IgE e IgD, no se conoce ninguna ( Nisonoff et al., 1975; Bankert y Mazzaferro, 1989; Turner, 1991).

### 2.1.1.- Variabilidad Genética de las Inmunoglobulinas

Esta variabilidad viene determinada mediante el estudio antigénico de las diferentes partes de las inmunoglobulinas; según la revisión de Figueredo Delgado *et al.* (1992) es de tres tipos, que son los siguientes (véase figura 7):

- ◇ 1. **Isotipos** (Individuos misma especie, por variaciones en las cadenas pesadas y ligeras).
- ◇ 2. **Alotipos** (diferentes alelos en un mismo locus).
- ◇ 3. **Idiotipos** (variaciones en las secuencias de las regiones).

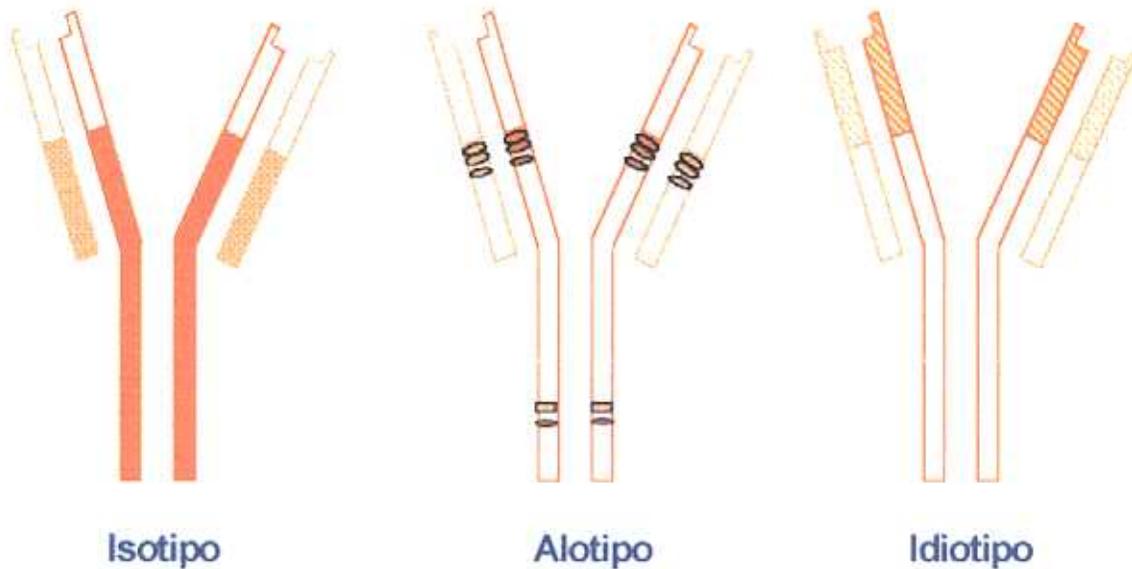


Figura 7

## 2.2.- Inmunoglobulina G (IgG)

### 2.2.1.- Propiedades Generales y Estructura

Es la inmunoglobulina principal en el suero de la mayoría de las especies y representa alrededor del 75% del reservorio total de inmunoglobulinas. Es una proteína monomérica con un coeficiente de sedimentación de 7S y Pm de 146.000 daltons. Se halla distribuida uniformemente entre los espacios intravascular y extravascular, es la predominante en la respuesta secundaria de anticuerpos y es la única que actúa como antitoxina. Puede dar lugar a fenómenos de opsonización, aglutinación, precipitación de antígenos y es capaz de activar la cascada del complemento.

Aunque la estructura básica de cuatro cadenas de la IgG es un modelo útil para todas las inmunoglobulinas, existen ligeras diferencias en cada subclase con respecto al número y distribución de los enlaces disulfuro entre las cadenas (véase figura 6).

Si tratamos la IgG con una enzima como la papaina, la molécula se escinde por la región bisagra, dividiéndose en tres regiones con semejante peso molecular (50.000) y

formándose los fragmentos Fab (se une al antígeno) y Fc (cristalizable) con características y funciones diferentes (Porter, 1959; Nisonoff et al., 1960; Edelman et al., 1969; Porter, 1973) (véase figura 8).

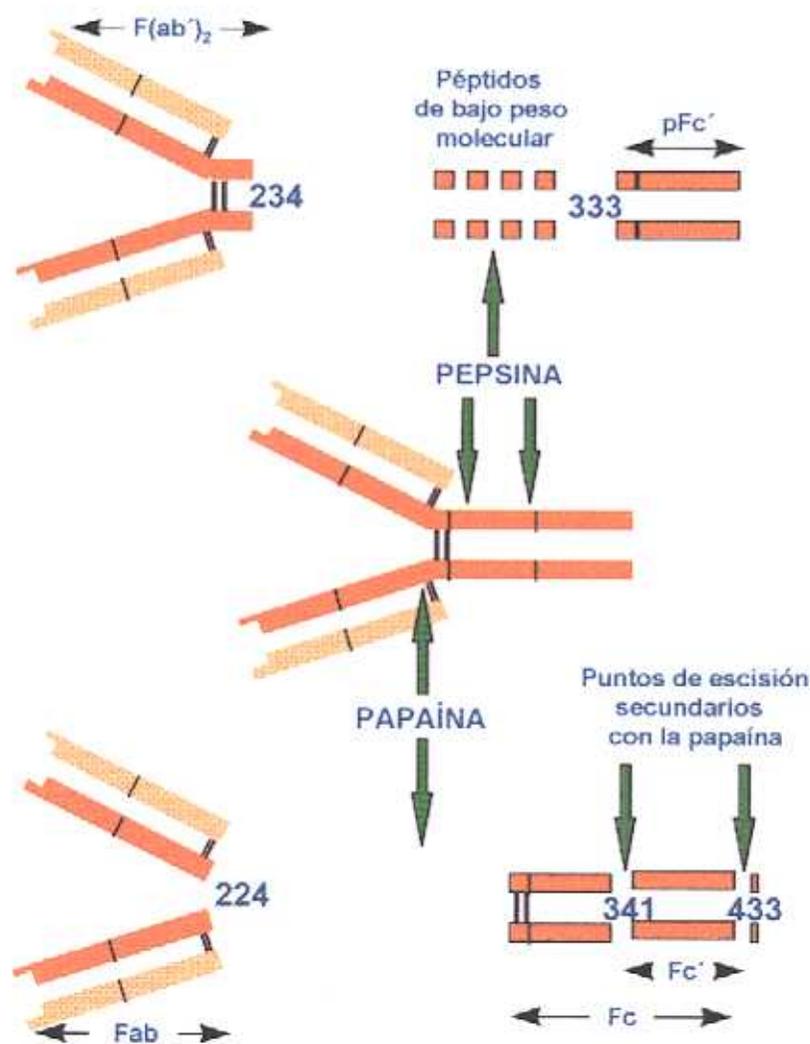


Figura 8

La pepsina escinde la molécula de inmunoglobulina por otro lugar, obteniéndose un fragmento  $F(ab')_2$  compuesto por 2Fab que retiene su actividad bivalente y que por reducción de un enlace disulfuro puede convertirse en dos fragmentos univalentes (Nisonoff *et al.*, 1960; Porter, 1973). También se puede fragmentar con tripsina, quimotripsina y más recientemente con bromuro de cianógeno (Goveric *et al.*, 1985; Dorrington, 1985) (véase figura 8).

### 2.3.- Inmunoglobulina M (IgM)

Representa alrededor del 10% del reservorio total de inmunoglobulinas, tiene una estructura pentamérica con un Pm de 970.000 daltons y coeficiente de sedimentación de 19S, aunque pueden encontrarse pequeñas cantidades de IgM en forma de monómero como unidades simples, conocidas como IgM-7S o IgMs. Esta inmunoglobulina, confinada prácticamente al espacio intravascular, es la predominante en la respuesta primaria de anticuerpos contra los microorganismos infecciosos antigénicamente complejos. Una sola molécula de IgM unida al antígeno, es capaz de iniciar la cascada del complemento, también es eficaz en reacciones de aglutinación, opsonización y neutralización de virus, aunque su papel es de poca importancia en la protección de fluidos tisulares y secreciones corporales (Mestecky y Schorruhenloher, 1974; Hayzer y Jatón, 1985).

### 2.4.- Inmunoglobulina A (IgA)

Supone alrededor del 15% de las inmunoglobulinas séricas, puede presentarse como un monómero, como un dímero e incluso formando polímeros y es rica en glúcidos. La forma dimérica tiene un coeficiente de sedimentación de 11S y el trímero de 13S. Es la inmunoglobulina predominante en las secreciones como la saliva, secreciones digestivas, traqueobronquiales, leche, calostro y secreciones genitourinarias (Delacroix *et al.*, 1982). La IgA secretora (IgAs), es la más abundante en las secreciones seromucosas, suele ser la forma dimérica 11S y se asocia a otra proteína que conforma el componente secretor. Éste es sintetizado por las células epiteliales y se añade al dímero cuando atraviesa el epitelio. Tiene la función de proteger a la IgA de la proteólisis por las enzimas gastrointestinales. Su presencia aislada en las secreciones parece indicar que su síntesis es independiente de la secreción de inmunoglobulinas (Mostov *et al.*, 1984; Figueredo Delgado *et al.*, 1992).

La IgA no actúa como opsonina ni es capaz de activar la cascada del complemento; sin embargo, aglutina partículas antigénicas y neutraliza virus, su misión principal es la de prevenir la adherencia del antígeno a la superficie corporal (Mestecky y Kilian, 1985).

### **2.5.- Inmunoglobulina D (IgD)**

En el plasma representa menos de un 1%, pero se sabe que existe en grandes cantidades en la membrana de los linfocitos B circulantes, actuando como receptor antigénico. Parece ser que interviene en la diferenciación linfocitaria desencadenada por antígenos (Spiegelberg, 1985).

### **2.6.- Inmunoglobulina E (IgE)**

Se encuentra en la membrana de los basófilos y mastocitos de todos los individuos. Parece ser que actúa en la inmunidad activa frente a los parásitos como helmintos, también se asocia a procesos de hipersensibilidad inmediata en donde se produce la unión con el antígeno provocando la degranulación de los mastocitos y la liberación de aminas vasoactivas (Ishizaka, 1985; Turner, 1991).

## **3.- Producción de Inmunoglobulinas**

Antes de que llegue a sintetizarse la proteína del anticuerpo, es necesario eliminar los intrones del RNA primario transcrito. Parece ser que existen unas secuencias que indicarian los lugares donde deben de actuar las enzimas para que las escisiones y reempalmes de RNA se realicen con precisión, de tal forma que se transcriba un RNAm eficaz (véase figura 9).

El RNAm sale del núcleo y entra en el citoplasma, donde se une a un ribosoma. La secuencia conductora (L) es traducida y el producto se une a la proteína de reconocimiento de la señal (SRP) que bloquea la traducción. El complejo proteína/ribosoma que reconoce la señal migra al retículo endoplásmico (RE), donde la SRP se une a la proteína en un lugar vacante del RE. Ahora puede continuar la traducción, y la cadena sintetizadora atraviesa la membrana en el RE. La secuencia conductora es eliminada y la cadena formada queda libre para unirse al resto de las cadenas. En un paso posterior, la proteína se unirá al aparato de

Golgi donde se añaden glúcidos mediante la acción de unas enzimas. Una vez que se ha completado la molécula, ésta es secretada al exterior por exocitosis (Hay, 1991).

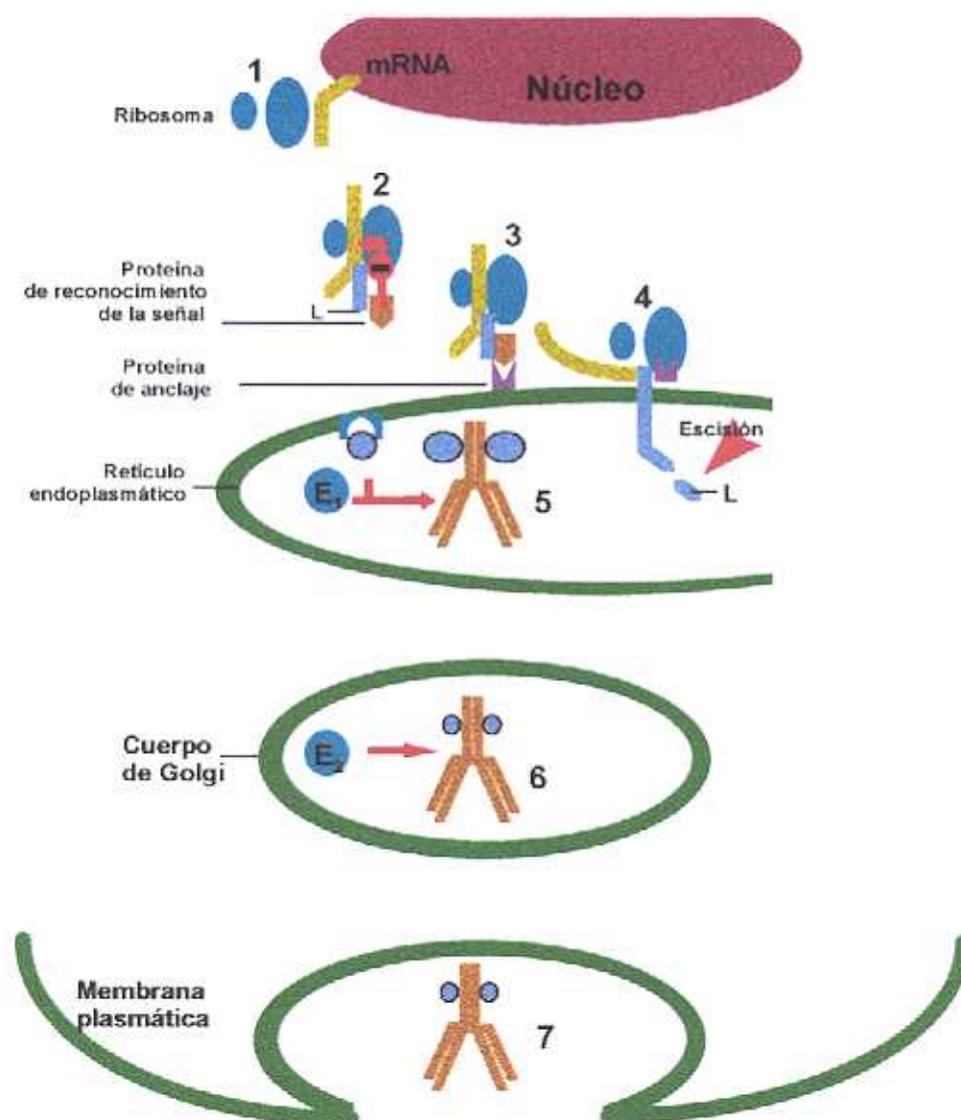


Figura 9

#### 4.-Características Específicas de las Inmunoglobulinas de Conejo

##### 4.1.- Inmunoglobulina G

Este isotipo posee una gran diversidad con respecto al número de subclases en casi todas las especies; sin embargo, en el conejo sólo se han identificado dos isotipos o subclases denominadas IgG1 e IgG2 (Bankert y Mazzaferro, 1989). En el conejo las uniones por puentes disulfuro intercatenarios difieren de las de otras especies, en que sólo existe una unión por puentes disulfuro (Nisonoff *et al.*, 1975).

La IgG de conejo está compuesta prácticamente de un solo subtipo de IgG, por lo que los preparados para cristalización del fragmento Fc son muy homogéneos (Porter, 1959).

##### 4.2.- Inmunoglobulina M e IgA

La IgM en todas las especies, existe de forma pentamérica con un coeficiente de 19S, constituida por una subunidad básica de 7S. La cadena J está asociada a la IgM de la mayoría de las especies incluido el conejo (Lamm y Small, 1966).

La inmunoglobulina A puede encontrarse como monómero o formando polímeros asociándose a una cadena J. La forma secretada es generalmente un dímero unido por la cadena J y un componente secretor con alto contenido en glúcidos, sintetizado por las células epiteliales, con la función de trasportar la IgA a través de dichas células y protegerla de la acción proteolítica de las enzimas que la acompañan en las secreciones (Mostov *et al.*, 1984).

El componente secretor de la IgA del conejo está asociado a esta molécula por fuertes enlaces no covalentes, pero no posee ningún puente disulfuro de unión como en otras especies (Halpern y Koshland, 1970). En pocas especies, se han definido diferentes

subclases de IgA; sin embargo, el conejo posee dos isotipos, IgA1 e IgA2 (Bankert y Mazzaferro, 1989).

### Propiedades de las Inmunoglobulinas de Conejo

Clases y Subclases de Inmunoglobulinas						
	IgG 1	IgG2	IgA	IgM	IgE	IgD
Coeficiente de						
Sedimentación:	7S	7S		19S	8S	8S
PesoMolecular:	150K	150K	>150K	900K	180K	190K
Vida media (días):		7 - 9		34		
Concentración						
Sérica (mg/ml):	mínima	9 - 12	< 1	< 1	< 0,01	
Transferencia						
Placental:		+	ND	+	ND	
Unión a Proteína A:		+	ND	+		

ND = No Determinado

(Deichmiller y Dixon, 1960; Bambell, 1966; Bankert y Mazzaferro, 1989)

**III. INTERACCIÓN ENTRE LOS SISTEMAS INMUNE Y NEUROENDOCRINO**

El sistema inmunitario no se encuentra en modo alguno aislado de los otros sistemas de control del organismo; de hecho, existen numerosas posibilidades de comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario. En efecto, las células neuroendocrinas liberan hormonas que pueden influir sobre los linfocitos. Los mismos linfocitos poseen receptores para una amplia variedad de hormonas, incluidos los corticoesteroides, catecolaminas, endorfinas y hormona del crecimiento. Además, prácticamente todas las hormonas estudiadas ejercen algún efecto sobre el sistema inmunitario, aunque no todos estos efectos sean muy directos (Taylor, 1991).

Los sistemas nervioso o endocrino poseen múltiples oportunidades para controlar, no sólo la intensidad, sino también la modalidad, la cinética y la localización de las respuestas inmunitarias. Debe indicarse que las células linfoides pueden producir por sí mismas hormonas inmunorreactivas, tales como la hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), que pueden ejercer ulteriores acciones moduladoras sobre la respuesta inmunitaria (Blalock y Smith, 1985; Alvarez-Mon *et al.*, 1985; Blalock, 1989).

**A. SISTEMA INMUNOLÓGICO Y HORMONAS GLUCOCORTICOIDES**

Durante muchos años, las acciones inhibitorias de los glucocorticoides sobre el sistema inmune fueron consideradas desde el punto de vista farmacológico, ya que se administran a dosis elevadas para que se manifiesten sus efectos. Sin embargo, actualmente se sabe que, tanto en individuos sanos como durante los procesos infecciosos o tumorales, los glucocorticoides juegan un papel importante frenando la respuesta del sistema inmunitario para que ésta no sea excesiva (Fauci *et al.*, 1980).

Los glucocorticoides tienen acciones muy marcadas sobre los macrófagos y linfocitos T. Los macrófagos, además de participar en la respuesta inflamatoria, juegan un

papel muy importante en la inmunidad específica, liberan la interleucina 1 (IL-1) que aumenta la proliferación de los linfocitos T en respuesta a un antígeno. La interleucina 2 (IL-2), liberada por los linfocitos T activados, al igual que la IL-1, estimula el desarrollo de los linfocitos T y la producción de interferón. El interferón a su vez, estimula la actividad de los macrófagos y de las células NK. Los glucocorticoides a dosis fisiológicas inhiben la síntesis y liberación de IL-1 y IL-2, de este modo atenúan toda la serie de reacciones expuestas anteriormente (Guillis *et al.*, 1979; Palacios y Sugawara, 1982). A dosis elevadas, los glucocorticoides pueden producir la muerte de los linfocitos, por lo que órganos como el timo, bazo y ganglios linfáticos involucionan y disminuyen de tamaño (Nieto *et al.*, 1992).

Los factores liberados de las células inmunológicas, la IL-1, la IL-2, el interferón y los factores tímicos actúan sobre el eje adrenal, produciendo un aumento de los corticoides plasmáticos. Éstos a su vez, al inhibir la actividad del sistema inmunitario y la secreción de sus factores, previenen o modulan la intensidad de la respuesta inmunológica. Se forma así un circuito regulador, perfectamente controlado y el sistema inmunitario, a pesar de tener una autorregulación intrínseca, queda bajo la dependencia del sistema neuroendocrino (Brown y Blalock, 1990).

Las acciones de los glucocorticoides sobre los linfocitos B son menos marcadas que sobre los T. Los corticoides, a dosis fisiológicas, aumentan la síntesis de inmunoglobulinas, pero en dosis farmacológicas disminuyen el número de inmunoglobulinas circulantes, la producción de células B y también pueden producir su citolisis (Lopez-Calderón, 1992).

### **1.- Estrés e Inmunidad**

Un elemento esencial de discusión sobre las interacciones neuroendocrinas e inmunes es el estrés. El estrés se puede definir como "una condición dinámica y compleja en la cual la homeostasis normal, está alterada o amenazada". Desde 1936, cuando Selye describió el síndrome general de adaptación, se sabía que el estrés crónico producía atrofia del timo e involución de los órganos linfoides por lo que, actualmente, el efecto

inmunosupresor del estrés crónico es bastante claro (Selye, 1936; Selye, 1973).

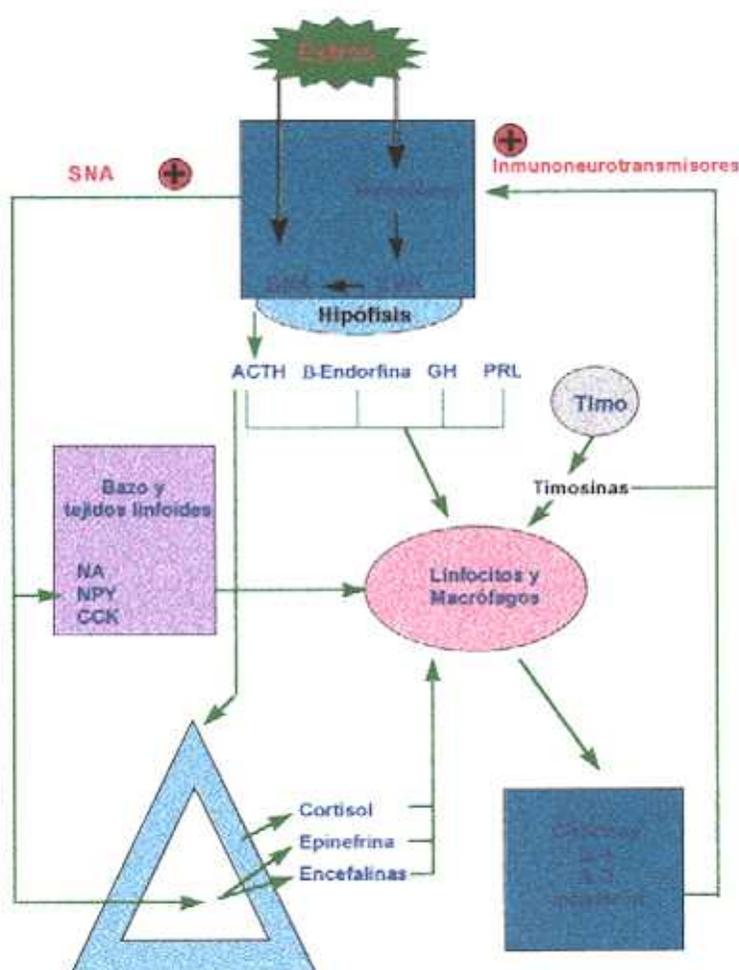


Figura 10

Clásicamente, los efectos del estrés sobre la inmunidad han sido atribuidos al aumento de la secreción de glucocorticoides que se produce en dichas situaciones. Los linfocitos poseen receptores para diversas hormonas, entre las que se incluyen: hormona del crecimiento (GH), prolactina, ACTH y catecolaminas. Mientras que la prolactina y la GH poseen claras acciones inmunoestimulantes, las hormonas relacionadas con el eje simpático-adrenal (catecolaminas y glucocorticoides), tienen acciones inmunosupresoras (véase figura 10). En las situaciones de estrés crónico se produce un aumento de la secreción adrenal de catecolaminas y glucocorticoides, mientras que la secreción de GH y prolactina se encuentra disminuída (Lopez-Calderón, 1992).

Los mediadores más importantes en la respuesta producida frente al estrés, parecen ser, la hormona liberadora de corticotropinas (CRH), el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo a nivel del núcleo cereleus cerebral (Chrousos y Gold, 1992).

La CRH hipotalámica juega un papel central en la integración del sistema de respuesta al estrés. La activación del eje hipotálamo-hipófisis incluye la secreción de la corticotropina hipofisaria ACTH y de los corticoides adrenales. Por otro lado, la CRH activa el sistema nervioso simpático liberándose epinefrina y norepinefrina. Como consecuencia, se produce un incremento en los niveles de la glucosa sanguínea, en la gasto cardiaco y de la presión sanguínea, mientras que son inhibidos, el sistema inmune y antiinflamatorio. La activación del sistema nervioso simpático también estimula la liberación de CRH hipotalámica. De esta forma, el sistema de respuesta al estrés parece funcionar como un circuito de retrofuncionalidad bidireccional positivo (Wilder, 1995).

### **1.1.- Interacción de la Respuesta al Estrés con los Ejes Neuroendocrinos**

La activación de la respuesta al estrés también incluye los sistemas hipotálamo-hipófisis-prolactina y -hormona del crecimiento, así como el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y -gonadal. El estrés agudo puede incrementar la secreción de hormona del crecimiento hipofisaria mientras que el estrés crónico parece inhibir la secreción de dicha hormona, como respuesta a la liberación de somatostatina estimulada por la CRH. El estrés crónico inhibe la expresión del RNAm de prolactina. Es decir, hay un aumento de la secreción de las hormonas inmunosupresoras y una disminución de las hormonas con acción inmunoestimulante, lo cual nos ayuda a comprender el efecto global inmunosupresor del estrés crónico. La secreción de somatostatina inhibe la secreción hipofisaria de hormona estimulante de la tiroides (TSH); además, los glucocorticoides inhiben la conversión de tiroxina a triyodotironina. Estas respuestas se producen durante el estrés, probablemente como una consecuencia adaptativa con el fin de limitar el gasto energético (Chrousos y Gold, 1992).

## 2.- Efecto de las Citocinas en la Respuesta al Estrés y en los Ejes Neuroendocrinos

Aunque la coordinación entre los sistemas nervioso y endocrino en la respuesta adaptativa al estrés se conoce desde hace tiempo, el concepto de integración, coordinación y regulación bidireccional inmune-neuroendocrina de la respuesta al estrés, es de desarrollo reciente.

Las interleucinas -1 (IL-1) y -6 (IL-6), son las citocinas más intensamente estudiadas en relación a su función reguladora de la comunicación bidireccional del sistema neuroendocrino-inmunológico, sin embargo también juegan un papel importante otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-2 e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) entre otras (Imura y Fukata, 1994).

### 2.1.- Interleucina -1

Besedovsky *et al.* (1986) fueron de los primeros investigadores interesados en el estudio de las características de la IL-1, comprobando que dicha citocina estimula, temporalmente, la producción de glucocorticoides por activación del eje HPA por acción de la CRH (Sapolsky *et al.*, 1987). La producción de interleucina -1 está regulada, a su vez, por los glucocorticoides. Así, se confirma el importante papel que juega el eje HPA en prevenir una excesiva amplificación de la activación de las células del sistema inmune. El circuito de retrofuncionalidad entre la producción de IL-1 del sistema inmune y el eje HPA han sido extensivamente revisados (Denckla, 1978; Brown y Blalock, 1990; Ansar Ahmed y Talal, 1990; Holaday, 1991; Geenen *et al.*, 1991; Wilder, 1995; Torpy y Chrousos, 1996; Chikanza, 1996). El concepto fundamental que sugieren dichos estudios es que tanto IL-1 como CRH juegan un papel central como mediadores en la comunicación entre sistema inmune, endocrino y nervioso. Por otro lado, se ha demostrado en ratas que la IL-1 estimula directamente la producción adrenal de corticoides (Andreis *et al.*, 1991). Se han detectado receptores de alta afinidad para la IL-1 en varias zonas del cerebro y de órganos endocrinos, incluyendo hipófisis, ovarios y testículos (Cunningham y De Souza, 1993).

## 2.2.- Interleucina -6

La IL-6, como la IL-1, es un potente estimulador de la secreción de corticoides adrenales a través de la intervención de la CRH y de la activación del eje HPA. Si se requiere una estimulación mas prolongada, entonces puede estimular directamente la hipófisis y liberar ACTH (Lyson y McCann, 1992). En la glándula adrenal, la producción de IL-6 es estimulada por IL-1, ACTH y angiotensina II; parece ser que la glándula adrenal es un importante punto de integración de los sistemas neuroendocrino e inmunológico. Además, la producción local de IL-6 y de otras citocinas participan en la regulación de la ovulación y en la función de las células de sertoli del testículo (Schobitz *et al.*, 1993; Brannstrom *et al.*, 1994; Broockfor y Schwarz, 1991).

## B. SISTEMA INMUNOLOGICO Y HORMONAS GONADALES

La importancia de las relaciones entre el sistema inmunológico y el endocrino, ha sido objeto de diversos estudios y revisiones por diferentes autores. Desde hace tiempo, se han observado diferente tipo e intensidad de respuesta inmunológica dependiendo de que el individuo fuera macho o hembra, comprobándose que la respuesta inmunológica en las hembras era mayor que la observada en los machos (Terres *et al.*, 1968). En los últimos años las investigaciones en este área se han intensificado con un número suficiente de revisiones que confirman un incremento en el interés de varios de los aspectos de esta "interdisciplina" (Grossman, 1984; Grossman, 1985; Ansar Ahmed *et al.*, 1985; Slijvic, 1986; Mooradian *et al.*, 1987; Blalock, 1989; Schuurs y Verheul, 1990; Ansar Ahmed y Talal, 1990; Wilder, 1995; Torpy y Chrousos, 1996).

El conjunto de tantas evidencias indica que es muy probable que estas diferencias en la respuesta inmunológica entre los sexos estuviera mediada por la acción de las hormonas esteroides sexuales y que de alguna manera éstas ejercieran un control sobre la población celular inmunocompetente.

### 1.- Efecto de las Hormonas Gonadales en la Inmunidad

Para determinar si la funcionalidad gonadal juega un papel importante en la regulación inmunológica, los investigadores estudiaron el tejido linfoide y la respuesta inmune en animales enteros y gonadectomizados (Castro 1974; Kittas y Henry, 1979).

En la mayoría de los trabajos realizados para estudiar el efecto que producen las hormonas sexuales sobre el tejido linfoide, se observó que se producían cambios morfológicos en el timo, incluso antes de que se conociera la importancia de este órgano en la competencia inmunológica. Las primeras observaciones se realizaron con animales gonadectomizados machos y hembras, antes de la pubertad. En ellos, aparecían timos con un tamaño mayor que el normal, asociado a un incremento de la celularidad. El comienzo

de la involución tímica con la madurez sexual del animal y la aparente pérdida de la involución en animales gonadectomizados parecía significar que las hormonas sexuales tenían un importante papel en la involución fisiológica del timo (Castro 1974; Kittas y Henry, 1979).

Trabajos realizados en ratones castrados, para comprobar la reacción de los animales frente a un alotrasplante de piel, produjeron un acelerado y marcado rechazo del injerto, comparándolo con un grupo control, comprobándose además que éste rechazo se puede prevenir con la administración de andrógenos (Castro, 1974). Sin embargo, cuando los animales eran orquiectomizados y timectomizados, no presentaban rechazo al trasplante (Castro, 1975).

Para determinar cual es el papel que ejercen las hormonas esteroides sobre las células linfoides, se realizaron diversos estudios *in vitro* en cultivos de linfocitos T, a los que se añadió sueros procedentes de ratas macho en diferentes circunstancias. Primeramente, se adicionó suero de rata macho gonadectomizado, comprobándose que se producía un estímulo de la mitosis cinco veces mayor que en un cultivo control. Si al cultivo celular se le añadía suero de animales adrenalectomizados, la mitosis se incrementaba hasta siete veces. El suero de los animales con la doble ablación producía una elevación de la mitosis llegando a ser superior a 10 veces. Este estudio sugiere que las hormonas esteroides producidas, tanto en las gónadas como en la glándula adrenal, son capaces de deprimir la función de los linfocitos T, por lo que una eliminación de estas hormonas puede estimular la respuesta de los linfocitos T (Grossman et al., 1982).

Por otra parte, Nelson y Steinberg (1987) y Astorquiza *et al.* (1987) comprobaron en machos roedores castrados que se producía un incremento de los niveles de inmunoglobulinas y de la respuesta inmune mediada por células. Estos resultados parecían indicar que los niveles de hormonas esteroides pueden ser importantes en el control de la producción de anticuerpos (Stimson, 1987).

Se realizaron diversos estudios para comprobar cómo podría influir sobre la respuesta inmunológica y el tejido linfático, la administración de estrógenos, progestágenos y andrógenos. Kochakian (1976) comprobó cómo se producía la involución del timo tras la administración de estrógenos y andrógenos. Además indicó que la involución tímica, era debida a los efectos directos de dichas hormonas, y no estaba mediada por las corticotropinas hipofisarias ni por los corticosteroides ya que, tanto estrógenos como testosterona, producen una reducción del peso del timo también en animales adrenalectomizados. Por otro lado, se observó que la administración de progesterona no influía sobre el tamaño tímico (Nelson *et al.*, 1967; Shobon 1974)

### **1.1.- Acción de los Estrógenos en la Inmunidad Humoral y Celular**

Stern y Davidsohn (1955), describe la influencia de los estrógenos en el incremento en la producción de anticuerpos. En ratas hembra, la producción de estrógenos parece regular la síntesis de IgA e IgG uterinas, observándose incrementos espontáneos del nivel de inmunoglobulinas durante el ciclo estral que podrían ser el resultado de la acción del estradiol en el útero (Wira y Sandoe, 1980).

El estradiol es capaz de inhibir la actividad de las células T supresoras, lo cuál provoca un incremento en la maduración de las células B y un aumento en la producción de anticuerpos (Paavonen *et al.*, 1981; Stimson, 1987). Puesto que la blastogénesis de las células B ocurre en los tejidos linfáticos, no sorprende encontrar un aumento de la respuesta proliferativa al antígeno en el bazo y nódulos linfáticos como resultado a un tratamiento estrogénico.

Tratamientos con mayores o iguales dosis fisiológicas de estradiol, en roedores machos y hembras, enteros o castrados, producen un incremento en la respuesta de anticuerpos a varios antígenos, tanto T-dependientes como T-independientes (Myers y Peterson, 1985; Brick *et al.*, 1985).

Para identificar el mecanismo por el cual los estrógenos, u otras hormonas sexuales, son capaces de deprimir la inmunidad celular, es necesario revisar los estudios en los que los efectos de compuestos estrogénicos u otros esteroides, son evaluados *in vitro* utilizando cultivos de linfocitos tímicos blastogénicos. En dichos cultivos, la mitosis de los linfocitos es estimulada por la adición de sustancias mitogénicas como la fitohemoaglutinina (PHA) o la concavanina A (con A), el incremento de la síntesis de DNA se comprueba por la incorporación de un nucleótido [ $H^3$ ], generalmente timidina [ $H^3$ ].

En estudios en los que se añade estradiol a los cultivos linfocíticos, se produjo una marcada depresión de la estimulación de PHA en la transformación blastogénica (Wyle y Kent, 1977; Mendelsohn et al., 1977). Los mismos autores obtuvieron resultados semejantes añadiendo al medio de cultivo progesterona y testosterona, igualmente sucedió con dietilestilbestrol (DES) (Ablin et al., 1974). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en todos estos estudios se agregó una concentración de hormonas al medio de cultivo muy superior al valor fisiológico.

Grossman *et al.* (1982) realizaron una serie de trabajos añadiendo al medio de cultivo preparados séricos de ratas castradas, produciéndose un marcado efecto estimulador de la blastogénesis de los linfocitos T. Cuando se realizó la experimentación utilizando sueros preparados de ratas castradas y pretratadas *in vivo* con concentraciones fisiológicas tanto de estradiol como de testosterona, se produjo un efecto marcadamente inhibitorio de los linfocitos T. Cuando se utilizaron sueros procedentes de animales castrados y timentomizados, se produjo la pérdida de la capacidad para estimular los linfocitos T (Grossman, 1984). Estos resultados sugirieron que, tal vez, los estrógenos (o la testosterona metabolizada a estrógenos) inhiben la eliminación de factores tímicos séricos que regulan la función de los timocitos. Puesto que estos factores estimulan normalmente la función de los linfocitos T, en ausencia de dichos factores la actividad de los linfocitos T está deprimida (Grossman et al., 1982; Grossman y Rosell, 1983; Grossman et al., 1983).

Los estrógenos pueden tener un efecto directo sobre las células B (Myers y

Peterson, 1985), inhibir la función de los linfocitos supresores (Paavonen et al., 1981) o facilitar la maduración de los linfocitos cooperadores (Ansar Amhed et al., 1985) y pueden influir en la maduración de los macrófagos y su función (Barak et al., 1986; Hu et al., 1988; Schreiber et al., 1988).

### 1.2.- Acción de los Andrógenos en la Inmunidad Celular y Humoral

Los andrógenos también están implicados en la regulación de la función inmune. En estirpes de ratón con elevada sensibilidad a los andrógenos, los machos tienen menores niveles de IgM e IgG<sub>2</sub> circulantes que las hembras, mientras que las hembras producen mayor cantidad de anticuerpos frente al antígeno albúmina sérica bovina (Cohn, 1979a; Cohn, 1979b; Cohn, 1986). Las hembras de hamster también poseen mayor actividad primaria y secundaria en la inmunidad mediada por anticuerpos, comparándolo con los machos (Blazkovec et al., 1973; Orsini y Blazkovec, 1974; Blazkovec y Orsini, 1976). Además, esta depresión de la función inmune en el hamster macho se produce poco después de la madurez sexual (Blazkovec y Orsini, 1976).

La testosterona no es el único andrógeno que se conoce que altere la función inmune. La 5 $\alpha$ -androsteno-3,17-diona, parece ser que deprime ciertas funciones del sistema inmunológico mediado por células (Skowron-Cendrzak et al., 1975).

Otro andrógeno de interés, es la dihidrotestosterona la cuál, en algunos tejidos, es el andrógeno fisiológicamente activo. Este compuesto deprime *in vitro*, la estimulación blastogénica de la PHA en los linfocitos tímicos (Grossman y Roselle, 1983; Grossman et al., 1983). Aparentemente, los andrógenos reducen y los estrógenos incrementan, tanto los anticuerpos producidos espontáneamente como los inducidos por alteraciones autoinmunes, en los ratones híbridos de la estirpe NZB. Los tratamientos de las hembras del mismo híbrido con testosterona o dihidrotestosterona retardan el proceso de la autoinmunidad mientras que los estrógenos producen una marcada aceleración del proceso (Steinberg et al., 1979).

La testosterona también puede inhibir la regeneración de áreas timo-independientes de los tejidos linfoides periféricos, pobladas fundamentalmente por linfocitos B, lo que sugiere que la testosterona actúa en la diferenciación de las células primordiales de la población de linfocitos B, derivados de la médula ósea (Fujii et al., 1975)

En general, estos estudios sugieren que los andrógenos, al igual que los estrógenos, son capaces de regular la respuesta inmune. Los andrógenos ejercen sus efectos en la respuesta inmune alterando el desarrollo de las poblaciones T y B, y regulando la función de las células T inmunocompetentes. Dicha regulación, va acompañada de una modulación de las hormonas tiroideas. Sin entrar en los mecanismos por los cuales los andrógenos ejercen su acción sobre las células T, éstos producen una depresión en la respuesta de los linfocitos T. Parece ser que la actividad inmunosupresora, inducida por la testosterona, puede estar regulada genéticamente (Ansar Ahmed et al., 1987).

En las conclusiones de una revisión sobre el tema realizadas por Shuurs y Verheul (1990), se indica que los andrógenos pueden interferir en los procesos de maduración de las células B (Hirota et al., 1980; Grossman et al., 1984) y de las células T supresoras (Holdstock, et al., 1982), influyendo en los precursores de las células T y B en la médula ósea (Weinsten y Berkuvitch, 1981) lo que producirá un incremento de la función de los linfocitos T supresores (Ansar Ahmed et al., 1985).

### **1.3.- Acción de la Progesterona en la Inmunidad Celular.**

Al igual que sucede con las hormonas anteriores, se han publicado diversos trabajos sobre el efecto de la progesterona en la respuesta inmunológica. En trabajos en los que se utiliza progesterona o acetato de medroxiprogesterona, ésta puede suprimir la función inmune del bazo tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a la acción específica sobre dichas células (Sekiya et al., 1975). En estudios *in vivo* se ha demostrado que la progesterona aumenta la actividad de las células supresoras (Holdstock et al., 1982). La progesterona y la 20 $\alpha$ -dihidroprogesterona también inhiben la acción de la PHA (Mori et al., 1977).

Así como la progesterona parece afectar a la regulación del sistema inmune, éste a su vez, es también capaz de regular el metabolismo de la progesterona, al igual que el de otros esteroides. En ratas hembras a las que se les produjo una inmunodeficiencia por timectomía y radiación, se determinaron los niveles de progesterona y estradiol, encontrándose concentraciones de ambas hormonas significativamente inferiores con respecto al grupo control (Williams et al., 1978). Los autores sugieren que la causa de esta disminución podría estar producida por los daños causados en los ovarios, pero otras explicaciones también pueden ser posibles. De acuerdo con otras informaciones posteriores, las hormonas tóxicas pueden regular la secreción de hormona luteinizante (LH) de la hipófisis, modificar la funcionalidad ovárica y disminuir los niveles de progesterona circulante (Rebar et al., 1981; Rebar et al., 1983; Michael et al., 1981a; Michael et al., 1981b).

La progesterona (y otros esteroides) es a la vez inmunorregulada e inmunorreguladora. Los elevados niveles de progesterona circulantes encontrados en la gestación en muchas especies, incluida la mujer, parecen indicar el importante papel inmunorregulador que tiene esta hormona durante la gestación (Siiteri y Stites, 1983).

## **C.- INTERCONEXIÓN ENTRE LOS EJES HPA, REPRODUCTOR Y EL SISTEMA INMUNE**

### **1.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada**

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo, regula la secreción de gonadotropinas hipofisarias LH o FSH. La FSH estimula la producción de estrógenos y dicho esteroide modifica la secreción de GnRH y FSH por un mecanismo de retrofuncionalidad positiva y negativa. La LH en el macho estimula la producción de testosterona por las células de Leydig y dicho esteroide actúa negativamente sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG).

La activación del eje HPA inhibe el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en múltiples niveles. La CRH suprime la secreción de hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) del núcleo arcuato hipotalámico, tanto directa como indirectamente por la estimulación de  $\beta$ -endorfinas o de los glucocorticoides. Además, los glucocorticoides pueden inhibir directamente la liberación de LH hipofisaria y la producción gonadal de esteroides como estrógenos, progesterona y testosterona. Además, también inhiben los tejidos efectores de los esteroides gonadales (Rivier y Rivest, 1991; Chrousos y Gold, 1992). Por el contrario, el estradiol parece ejercer un efecto positivo en la producción de CRH tanto en hipotálamo como en tejidos periféricos (Torpy y Chrousos, 1996). El tiroides y los esteroides sexuales modulan la actividad del eje HPA enfatizando la conexión bidireccional de estos sistemas (vease figura 11). La conexión de los ejes HPG y HPA y las diferencias funcionales relacionadas con el sexo en respuesta a estos sistemas, son importantes para poder entender el desarrollo de ciertas anormalidades del sistema inmune, como son las enfermedades autoinmunes; éstas son mucho más frecuentes en las hembras y, además, tienden a desarrollarse en períodos de cambios de la actividad funcional del eje HPG como son la pubertad, gestación, postparto, menopausia o en momentos de estrés psicológico. Estas situaciones están relacionadas con cambios en las secreciones hipotalámicas de GnRH, hipofisarias de LH, esteroides sexuales y otras hormonas. Además

el fenómeno de la autoinmunidad tiende a incrementarse con la edad paralelamente a los cambios producidos en la función neuroendocrina. La actividad de los ejes HPA y HPG, así como del eje tiroideo, declina en individuos viejos y la formación de autoanticuerpos se incrementa ostensiblemente en edades avanzadas (Denckla, 1978; Wilder, 1995; Torpy y Chrousos, 1996).

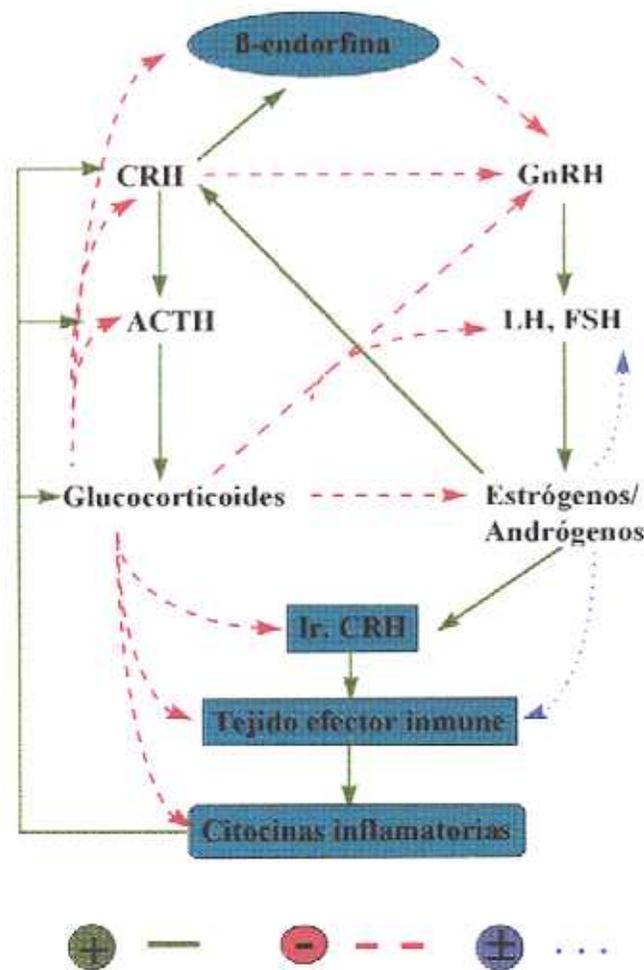


Figura 11

## 2.- Interacción entre el Eje HPA, Sistema Reproductor e Inmune

Generalmente, las hembra poseen una mayor actividad del eje HPA que los machos. Posiblemente ésto sea por la regulación del eje HPA por los esteroides gonadales de ambos. Los estrógenos regulan negativamente la unión de los receptores de los glucocorticoides

en la hipófisis e hipotálamo lo cual puede tender a incrementar la actividad del eje HPA por interferencia con la regulación de los glucocorticoides (Turner 1990; Turner, 1992). La progesterona tiene un efecto opuesto (Carey *et al.*, 1995). La retirada de los andrógenos en los machos provoca un incremento en la actividad del eje HPA, el efecto se vuelve reversible con el remplazamiento de dichas hormonas. La castración incrementa los niveles de CRH (Volpe *et al.*, 1986).

El eje HPA inhibe el eje reproductor a varios niveles. La CRH inhibe la secreción de GnRH directamente o vía  $\beta$ -endorfinas (Chrousos y Gold, 1992). Como las neuronas productoras de GnRH no tienen receptores para los estrógenos (Shivers *et al.*, 1983), el estradiol puede actuar a través de la CRH hipotalámica para inhibir la secreción de GnRH y ejercer un efecto de retrofuncionalidad negativa a través de este mecanismo. Los glucocorticoides inhiben la secreción de GnRH así como la de gonadotropinas y la producción y acción de los esteroides gonadales. Por el contrario, el estradiol parece ejercer un efecto positivo en la producción de CRH tanto en hipotálamo como en tejidos periféricos (Torpy y Chrousos, 1996) (véase figura 11).

## **IV. EFECTO DE FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES SOBRE LOS SISTEMAS ENDOCRINO E INMUNE Y FUNCIONALIDAD ORGÁNICA**

### **1.- Acción de los Agentes Inmunosupresores Sobre el Sistema Endocrino**

La revisión bibliográfica efectuada sobre el tema nos indica que la depresión del sistema inmune por agentes farmacológicos y la repercusión de las acciones de éstos sobre el sistema endocrino, parecen no estar suficientemente aclaradas.

Por un lado, la mayoría de los estudios se efectúan sobre personas o animales a los que se les ha sometido a un trasplante y en los que se ha utilizado una triple terapia inmunosupresora, generalmente azatioprina, glucocorticoides y ciclosporina. Por lo cual, los efectos encontrados en la funcionalidad gonadal o adrenal, generalmente, no es posible achacarlos a uno de los inmunosupresores utilizados. Por otro lado, hay que tener en cuenta el estado general en el que se encuentra un paciente sometido a un trasplante de órganos o con una enfermedad autoinmune, ya que de por sí, presenta alguna alteración en su fisiologismo.

Zipf *et al.* (1980) investigaron el efecto de la terapia con prednisona y la retirada de tratamiento y la relación hormonal en 6 pacientes adolescentes con hiperplasia adrenal congénita debido a una deficiencia de la enzima 21 hidroxilasa. El tratamiento continuado con prednisona, suprime la liberación adrenal de 17 alfa hidroxiprogesterona en 4 pacientes y controla la excreción de 17 oxoesteroides en 5 de ellos. La concentración sérica de dehidroepiandrosterona sulfato no se incrementó durante o después de la retirada del tratamiento. Según los autores, la prednisona no suprimió la secreción de GH y la retirada del tratamiento se asoció a una disminución en la proporción FSH/LH en 5 pacientes y un incremento en testosterona sérica en 4.

Shek y Sabiston (1983), estudiaron, en el ratón, la relación entre la formación de anticuerpos, tras una inmunización, con los niveles de corticoesterona circulante, encontrando que en los animales inmunizados, las concentraciones de corticoesterona se incrementaron.

Esto les sugirió una correlación directa entre la respuesta inmune y los cambios hormonales. Además, fue evidente un cambio en el ritmo circadiano de la corticoesterona en los animales inmunizados, mostrando un patrón contrario a los controles. Comprobaron además, que la respuesta de la corticosterona, inducida por la inmunización, puede ser bloqueada por la administración de diazepam, un efecto que podría implicar un control central hipotálamo-hipofisis.

Los trabajos de Rees *et al.* (1988) realizados con niños en edad puberal, tratados con glucocorticoides y azatioprina o ciclosporina, indicaron una disminución de la velocidad de crecimiento y un retraso en la aparición de los caracteres sexuales secundarios. Los análisis de los perfiles hormonales mostraron un despuntamiento (Blunting) en la pulsatilidad de la GH y de las gonadotropinas. Los autores concluyeron indicando que el tratamiento a largo plazo con glucocorticoides tras el trasplante, induce a un cuadro clínico y endocrino de retraso en la pubertad.

Los estudios realizados para determinar la causa de la hipertriosis producida por el tratamiento con ciclosporina, mostraron niveles de hormonas hipofisarias, testiculares y adrenales dentro de un margen normal. Parece ser que la ciclosporina puede provocar hipertriosis por una vía independiente de las hormonas sexuales (Lindholm *et al.*, 1988).

Sikka *et al.* (1988) utilizando ratas macho adultos intactas, indicaron que la ciclosporina induce una disminución significativa de la testosterona sérica, LH sérica y testosterona intratesticular. El estudio del mecanismo por el cual la ciclosporina puede provocar hipogonadismo hipogonadotrópico, parece estar mediado a través del eje hipotálamo-hipofisis, y es modulado por la testosterona y/o sus metabolitos.

Los trabajos realizados para evaluar el eje HPA, determinando cortisol, en pacientes trasplantados de riñón que recibieron un tratamiento inmunosupresor con prednisolona y ciclosporina, indicaron una disminución de la concentración de cortisol en el periodo de acumulación de prednisolona (Hirano *et al.*, 1991).

Krueger *et al.* (1991) indicaron que uno de los efectos secundarios de la ciclosporina incluye la disfunción testicular y la disminución de la testosterona circulante. Sin embargo, los mecanismos no están suficientemente aclarados debido a discrepancias entre los trabajos concernientes a los niveles de gonadotropinas circulantes y a los estudios incompletos sobre la esteroidogénesis intratesticular. Para dilucidar estos mecanismos, los autores, estudiaron la regulación endocrina de la esteroidogénesis. Para ello, inyectaron ciclosporina (a dosis de 25 ó 40 mg/kg/día) a ratas macho durante 6 días, sacrificándoles al día siguiente. El tratamiento suprimió los niveles de testosterona sérica en ambos grupos, además el contenido de testosterona intratesticular declina a dosis elevadas de ciclosporina y se comprobó que la LH y FSH séricas se elevaron de dos a cuatro veces en el grupo de tratamiento a dosis altas de ciclosporina. La determinación de los receptores testiculares para LH revelaron una disminución de los mismos y que la ciclosporina reduce la disponibilidad de los testículos a responder a niveles, tanto normales como elevados, de LH circulante.

El estudio de la esteroidogénesis testicular indicó que en animales que recibieron altas dosis del fármaco, la actividad de citocromo P450, cuyas enzimas son las encargadas de la ruptura de la cadena lateral del colesterol mitocondrial, el cual es el paso limitante en la esteroidogénesis, se redujo marcadamente hasta un 30 % del valor control. Además, la actividad del citocromo P450 dependiente de la 17- $\alpha$  hidroxilasa descendió a menos de la mitad del valor control. Estos datos sugieren que, en general, la ciclosporina tiene un efecto adverso en los citocromos P450 (Krueger *et al.*, 1991).

Por otra parte, el tratamiento de ciclosporina altera los parámetros metabólicos de grupo hemo, observándose una inhibición en la formación de este grupo hemo, lo que puede contribuir sustancialmente a reducir los niveles de citocromos P450 y las actividades esteroidogénicas que dependen de ellos. Todo esto indica un mecanismo por el cual la ciclosporina puede inducir una disfunción testicular; como resultado de la combinación en la reducción del número de receptores de LH y una supresión en la formación del grupo hemo, comprometido en las actividades enzimáticas esteroidogénicas hemoproteín-dependientes, conduciendo a una alteración en la función testicular normal (Krueger *et al.*, 1991).

En la rata, la artritis adyuvante (AA) es una enfermedad inflamatoria asociada con la estimulación crónica del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Stephanou *et al.* (1992) investigaron los efectos de la ciclosporina en los niveles plasmáticos de ACTH y corticoesterona, así como la acumulación en la hipófisis anterior de proopiomelanocortina (POMC) y mRNA-IL-6. En los animales control, la ciclosporina reduce POMC y mRNA-IL-6 produciendo una disminución del nivel plasmático de ACTH y corticoesterona. Los animales inyectados con el adyuvante y tratados con ciclosporina no mostraron signos de AA. En estudios *in vitro*, la ciclosporina reduce el contenido de mRNA-POMC del cultivo de células de la hipófisis anterior y disminuye el efecto estimulador de CRH en la expresión de mRNA-POMC y la secreción de ACTH por esas células. Ésto indica que la ciclosporina actúa directamente sobre el eje HPA y además, reduce la activación de dicho eje en la artritis inflamatoria crónica (Stephanou *et al.*, 1992).

Mazzocchi *et al.* (1994) estudiaron el efecto agudo de la ciclosporina en la actividad secretora de las células adrenocorticales de rata. Estos estudios sugieren que la ciclosporina a bajas concentraciones estimula fuertemente la conversión de colesterol a pregnenolona, mientras que concentraciones medias de ciclosporina no afectan este paso, pero interfieren específicamente con acontecimientos intracelulares, lo cual se traduce en una señal estimuladora de la angiotensina II, en el paso posterior de la producción de mineralocorticoides (la conversión de corticoesterona en aldosterona).

Trabajos recientes en niños en edad prepuberal, tratados con una terapia triple inmunosupresora (azatioprina, glucocorticoides y ciclosporina) tras el trasplante hepático o renal, realizados por Sarna *et al.* (1995) indican que no hay diferencias en la secreción de GH ni del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I). Sin embargo, la disminución encontrada en los niveles de cortisol parece indicar que se produce por la supresión de la función adrenal inducida por la terapia con glucocorticoides.

Como se ha indicado con anterioridad, la acción de los inmunosupresores sobre el sistema endocrino está todavía muy confusa.

## **2.- Efecto de los Inmunosupresores Sobre los Niveles de Inmunoglobulinas**

El efecto de los diferentes inmunosupresores sobre la inmunidad humoral, depende de la acción específica de cada uno de ellos y sobre el nivel al que actúan en la respuesta inmune. Sin embargo, no hay que olvidar que la respuesta inmunológica es un conjunto de acontecimientos en los que generalmente, actúan en coordinación la respuesta humoral y la mediada por células, por lo tanto, es lógico suponer que el efecto de cada uno de los inmunosupresores en un nivel de la respuesta inmunológica, puede afectar al resto de los componentes de dicha respuesta. En la revisión bibliográfica sobre la acción de los fármacos inmunosupresores, objeto de nuestro estudio, en relación a los niveles de inmunoglobulinas, encontramos diferentes conclusiones realizadas por los distintos autores, no pareciendo estar suficientemente aclarados la acción de estos compuestos sobre los niveles de inmunoglobulinas circulantes.

Diferentes experimentos realizados en ratón y conejo indican que la azatioprina, y su metabolito activo, la 6-mercaptopurina, afectan a los linfocitos en proliferación, suprimiendo la respuesta de los anticuerpos tanto primarios como secundarios, cuando se administra después de la exposición al antígeno (Sterlz, 1960; Berembaum, 1960).

En estudios sobre los linfocitos de sangre periférica, realizados en sujetos normales y trasplantados de riñón y tratados con azatioprina y prednisona, se determinó la actividad de las células agresoras naturales (NK) y la actividad de las células agresoras (K), comprobándose que en pacientes inmunodeprimidos, la citotoxicidad natural mediada por células fue abolida, mientras que la citotoxicidad dependiente de anticuerpos se mantuvo normal (Lipinski *et al.*, 1980).

Obminska-Domoradzka *et al.* (1995) experimentaron con conejos sometidos a estrés por frío (hipotermia) y en animales normotérmicos. Ambos grupos fueron inmunizados con diferentes inmunógenos. El estudio concluyó indicando que el estrés por frío reducía la respuesta humoral.

Schuurman *et al.* (1992) indicaron cómo podía afectar la acción de ciertos inmunosupresores sobre el timo. Los glucocorticoides actúan en los timocitos pequeños en la corteza y la ciclosporina actúa en las células dendríticas y en el epitelio de la médula. El mecanismo de toxicidad de los glucocorticoides incluye la activación de una endonucleasa dando como resultado la fragmentación del DNA (muerte celular programada o apoptosis) y la interferencia en la proliferación celular. Las consecuencias pueden ser una disminución en la producción tímica de linfocitos T de nueva generación.

Por otro lado, los trabajos de Fujita *et al.* (1991) sobre el efecto de la ciclosporina en la nefritis de ratas producida por inmunización con albúmina sérica bovina (BSA), sugieren que la ciclosporina suprime la producción de anticuerpos.

Estudios en ratas sobre el efecto de la ciclosporina en la nefritis experimental inducida por antígenos, indican que la producción de anticuerpos fue dramáticamente atenuada por la administración de ciclosporina, sin embargo, ésta no disminuye el número de leucocitos circulantes. Los efectos en la supresión de la nefritis son atribuibles al poder de depresión de la producción de anticuerpos (Nagamatsu *et al.*, 1994).

### **3.- Inmunosupresores y Funcionalidad Orgánica**

Como se indicó con anterioridad, los inmunosupresores pueden afectar a la funcionalidad orgánica por los efectos tóxicos que se les han atribuido. Diversos estudios intentan explicar muchas de las acciones secundarias de estos compuestos, indicando que efectivamente, pueden provocar alteraciones (a menudo dosis-dependiente) fundamentalmente a nivel hepático y renal y tal vez, dichas lesiones puedan interferir a nivel adrenal y/o gonadal (Glass *et al.*, 1979; Sikka *et al.*, 1988).

Entre los principales efectos secundarios de la azatioprina, se encuentran la mielotoxicidad, produciéndose leucopenia e infecciones (Kissel *et al.*, 1986); por otra parte, la azatioprina se metaboliza en hígado y puede provocar daños hepáticos (Krom *et al.*, 1987);

también se han descrito casos de pancreatitis en humana y en perros (Moriello, 1987) y casos de hipertensión en los humanos (Kullmann *et al.*, 1996).

Los efectos secundarios de los glucocorticoides son muy variados dependiendo del tejido afectado y de la dosis y el tiempo que se han utilizado. Entre los más importantes se encuentran los que afectan al metabolismo glucídico y lipídico; los que afectan a la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Halliwell y Gorman, 1989); e incluso algunos casos de pancreatitis aguda (Steinberg y Lewis, 1981); también es común encontrar casos de hepatopatías (Rogers y Reubner, 1977).

La ciclosporina es un potente inmunosupresor pero su uso puede tener diversas consecuencia. Es frecuente encontrar casos de nefrotoxicidad, hepatotoxicidad e hipertensión, así como alteraciones gingivales e hirsutismo. Por otro lado, la inmunosupresión induce a un estado de deficiencia en la respuesta a los agentes extraños, provocando infecciones e incluso el desarrollo de ciertos tumores (casos comunes al empleo de los fármacos inmunosupresores).

Diversos estudios, en los que se utilizan modelos animales o modelos *in vitro*, intentan desvelar las acciones tóxicas de compuestos como azatioprina, ciclosporina o glucocorticoides sintéticos. Wilson y Hartz (1991), estudian los mecanismos de toxicidad de la ciclosporina en cultivos de epitelio de diferentes fracciones del túbulo renal de conejo y humano, comprobando que el túbulo contorneado proximal y el túbulo recto proximal son muy sensibles; sin embargo, el asa de Henle es menos sensible y el túbulo colector es relativamente resistente.

Para estudiar los efectos nefrotóxicos de la ciclosporina se utilizó, como modelo animal el conejo, comprobando que se producían alteraciones similares a las provocadas en humana, siendo mejor modelo que los roedores, animales utilizados hasta el momento (Thliveris *et al.*, 1991).

El trabajo realizado por Esmatjes *et al.* (1991) sugiere que la ciclosporina, a dosis normal, no tiene ningún efecto sobre las células  $\beta$  pancreáticas, indicando que la evidencia

indirecta de la resistencia a la insulina observada en pacientes tratados con ciclosporina y prednisona, es atribuible al tratamiento con corticoides.

Henkin *et al.* (1992) examinaron el efecto de diferentes drogas sobre los lípidos sanguíneos y los niveles de lipoproteínas. Las hormonas esteroideas con fuertes propiedades progestágenas y androgénicas, así como otros compuestos como la ciclosporina, son potencialmente aterogénicos. Las hormonas esteroideas con propiedades predominantemente estrogénicas son potencialmente antiaterogénicas. Los corticoides parecen elevar todos los niveles de lipoproteínas del colesterol. Además, los estrógenos orales y los corticoides también parecen que puedan elevar los niveles de triglicéridos.

Se examinó, utilizando dos modelos animales (rata y conejo machos), el efecto de la ciclosporina sobre el sistema microsomal renal citocromo P450. Los animales fueron tratados con aceite sólo o con ciclosporina a una dosis de 30 mg/kg/día durante 14 días. En la rata, los niveles séricos de urea y creatinina aumentaron, indicando el desarrollo de una nefrotoxicidad a los 14 días. En el conejo, los niveles de urea y creatinina se incrementaron a los 7 días de tratamiento. El P450 renal también aumentó en las dos especies tratadas (Yoshimura *et al.*, 1993).

Ferguson *et al.* (1993) pretenden establecer un modelo animal (rata) para el estudio de la nefrotoxicidad producida por ciclosporina utilizando dosis semejantes a las de humana y durante un periodo suficiente. Obtuvieron a dosis de 5 mg/kg/día una alteración de la filtración glomerular, a dosis de 7,5 mg /kg/día se produjo una disminución del flujo efectivo del plasma renal, a dosis de 10mg/kg/día la fracción de filtración declinó significativamente y en el examen histológico se comprobó una dilatación tubular.

Otros autores estudian la valoración de la nefrotoxicidad por ciclosporina en el conejo, explorando los mecanismos de esta toxicidad con especial atención en las alteraciones del metabolismo del glutatión y los niveles de citocromo P450 en el riñón. Se observó un incremento del citocromo P450 en la corteza renal posiblemente debido al efecto de la

ciclosporina (Massicot *et al.*, 1994).

Parece ser que la ciclosporina produce una disminución en el flujo tubular distal, reduciéndose la excreción de  $K^+$ , provocando hipercalemia (Laine *et al.*, 1994; Laine y Holberg, 1995).

Thliveris *et al.* (1995) utilizaron, en sus estudios, conejos a los que se le practicó un trasplante heterotópico de corazón. Para evitar el rechazo, a los animales se les administró ciclosporina y rapamicina, evaluando las posibles alteraciones que pueden provocar. En dicho estudio, se observó una atrofia tubular y fibrosis intersticial en el riñón de los que recibieron el tratamiento con ciclosporina.

Diversos estudios revisan las posibles causas que provocan hipertensión en pacientes tratados con ciclosporina. Grady *et al.* (1988) estudian en pacientes con trasplante hepático, los efectos que la terapia inmunosupresiva ejerce sobre diferentes parámetros orgánicos como son; los valores séricos de las enzimas hepáticas, las concentraciones de creatinina en sangre y la funcionalidad renal, así como la presión sanguínea, comprobándose una elevada incidencia de pacientes con hipertensión. Estudios semejantes, se han realizado en pacientes con trasplante renal, comprobando las posibles alteraciones en la funcionalidad renal y las relaciones con el incremento de la presión arterial (Kiberd, 1989).

Nell *et al.* (1996) estudian el crecimiento gingival asociado al tratamiento con ciclosporina en rata, conejo y humanos, comprobando que se produce una inhibición en la síntesis de prostaglandina I<sub>2</sub>, la cual ejerce una actividad antiproliferativa via elevación del AMPc. La ciclosporina induce la inhibición de la prostaglandina PGI<sub>2</sub> siendo responsable de la hipertrofia gingival.

Aunque se conocen los efectos de la ciclosporina sobre el músculo liso vascular provocando hipertensión, no se conoce la acción del fármaco sobre el músculo liso de la uretra y vejiga. Kitani *et al.* (1996) utilizan como modelo el conejo, indicando que la ciclosporina

puede causar una alteración urinaria por incrementar la resistencia de la uretra.

Nadeu *et al.* (1996), en ratas con trasplante de riñón y tratadas con ciclosporina, comprobaron morfológicamente a las 24 semanas de tratamiento, alteraciones de las arterias a nivel renal y glomeruloesclerosis, atribuidas a los efectos nefrotóxicos de la ciclosporina.

La bibliografía revisada sobre el efecto de los diferentes agentes inmunosupresores sobre la funcionalidad orgánica, indica la necesidad de un control y evaluación de dicha funcionalidad mediante diversas metodologías como son las pruebas de funcionalidad orgánica, el estudio de los parámetros bioquímicos séricos u otras con carácter histológico.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## I. ANIMALES



### 1.- Elección del Animal

Para la realización de nuestro estudio se han utilizado un total de 40 conejos machos de la estirpe Blanco de Nueva Zelanda (NZW=New Zealand White). El peso de los animales estaba comprendido entre 2 y 2,5 Kg. Todos los animales proceden de B & K Universal, G.J., S. L. donde se asegura la pureza de la raza y el estado sanitario.

### 2.- Condiciones de Alojamiento

La experimentación con estos animales se realizó según lo estipulado en el RD 223/1988 del 14 de Marzo, que regula la protección de los animales utilizados en experimentación .

Los animales fueron alojados en las habitaciones destinadas para ello en el animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, que reúne los requisitos exigidos por la Comunidad de Madrid y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Animalario registrado con el número EX-011-U).

Las condiciones de alojamiento fueron las siguientes: se utilizaron jaulas individuales de acero inoxidable de 48 x 61x 46 cm; la comida se administró en forma de pellet comercial específico para lagomorfos (Purina Lab Chow) a razón de 150 g/día, el agua de bebida se administró "*ad libitum*", con la utilización de bebederos automáticos. La habitación se mantuvo con ambiente controlado: temperatura de 20-22°C, humedad relativa del aire 50-55% y 10-15 renovaciones de aire por hora. La iluminación de la habitación se reguló automáticamente utilizando un ciclo de luz/oscuridad de 12/12h, durante toda la experimentación. En estas condiciones permanecieron los animales durante el periodo de aclimatación de 15 días y el periodo experimental. Todos los animales fueron explorados y examinados diariamente para comprobar su estado de salud.

## II PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN

### 1.- Grupos Experimentales

Todos los animales se identificaron por tatuaje (tanto en la oreja derecha como en la izquierda) para no interferir las extracciones sanguíneas y se agruparon de forma aleatoria en cuatro lotes, dependiendo de los diferentes tratamientos que se les iba a administrar. De esta forma, los animales se dividieron en los siguientes grupos:

**1.1.- Grupo I (Control):** este grupo está constituido por un total de 10 animales. Forman el grupo de animales sin tratamiento. A los conejos de éste grupo no se les administró, durante todo el tiempo de la experimentación, ningún tratamiento inmunosupresor; sin embargo, recibieron la cantidad equivalente de suero fisiológico.

**1.2.- Grupos de Animales Tratados:** cada grupo se formó con 10 animales dividiéndolos en tres lotes de animales tratados con los diferentes tipos de inmunosupresores elegidos. Así, denominamos a los distintos grupos de la siguiente forma:

**1.2.1.- Grupo II (Ciclosporina A):** este lote está compuesto de igual forma que el anterior, pero a estos animales se les pondrá un tratamiento inmunosupresor con ciclosporina.

**1.2.2.- Grupo III (Azatioprina):** formado por 10 conejos machos NZW a los que se les administra azatioprina.

**1.2.3.- Grupo IV (Prednisona):** el tratamiento farmacológico que reciben

estos animales es el glucocorticoide prednisona.

## **2.- Fases de la Experimentación**

### **2.1.- Fase Pre-experimental**

La duración fue de 15 días, donde los animales estuvieron vigilados y controlados para comprobar su adaptación a las características y condiciones del alojamiento con el fin de conseguir que sus constantes fisiológicas se mantuvieran estables y disminuyera el estrés por adaptación.

### **2.2.- Fase experimental**

Este periodo tuvo una duración de 18 días en total, que se puede subdividir en diferentes etapas.

#### ***2.2.1.- Etapa Inicial***

Este período lo constituyó el primer día de la experimentación (toma nº 1) en el que se tomó una muestra de sangre a todos los animales para comprobar la homogeneidad de los grupos y partir de unos valores basales. Posteriormente, a los animales de los diferentes grupos de tratamientos, se les administró la primera dosis del fármaco inmunosupresor.

#### ***2.2.2.- Etapa de Tratamiento***

Esta etapa constó de 8 días consecutivos (tomas nº 2 - 8) durante los cuáles, a los animales de los grupos tratados, les fue administrado el fármaco.

### **2.2.3.- Etapa de Retirada del Tratamiento**

Esta fase la constituyeron los días 9, 10 y 11, (toma nº 9, 10 y 11) con el fin de valorar las posibles repercusiones de la falta de tratamiento después de 24 h y 48 h de la retirada. Dicha etapa se prolongó una semana después de la última dosis de todos los tratamientos, realizándose una última toma de muestras; toma nº 12 de la experimentación.

### **3.- Preparación de los Animales: Tranquilización**

Con anterioridad a la extracción sanguínea y a la administración del tratamiento, todos los animales fueron tranquilizados con una dosis de Droperidol (2,5 mg/kg) y Fentanilo (0,05 mg/kg) administrada por vía subcutánea, dosis suficiente para producir un efecto vasodilatador y tranquilizante para no provocar estrés a los animales y poder realizar la toma de muestra sanguínea en las mejores condiciones (Tillman y Norman, 1983).

Los animales se colocaron en cepos individuales para realizar la toma de muestras y la administración del fármaco inmunosupresor, previamente, los animales fueron aclimatados a los mismos para disminuir el factor estresante de la sujeción y manejo.

### **4.- Administración de los Inmunosupresores**

#### **4.1.- Grupo II (Ciclosporina A)**

La dosis utilizada fue de 10 mg/kg de ciclosporina A (Sandimmun, Sandoz), siendo la misma durante todos los días que duró la etapa de tratamiento. Se administró por vía intramuscular profunda, extrayendo la cantidad adecuada de ampollas que contienen una concentración de 50 mg/ml.

#### 4.2.- Grupo III (Azatioprina)

A los animales incluidos en el grupo III se les administró azatioprina (Imurel, Gayoso Wellcome), después de la extracción sanguínea con la siguiente pauta:

*Dosis inicial:* Se administró en dosis única de 4 mg/kg, por vía intravenosa utilizando la vena marginal de la oreja. Cada vial inyectable contiene el equivalente a 50 mg de azatioprina en forma de sal sódica, liofilizada. Se reconstituye con un mínimo de 5 ml de agua destilada libre de pirógenos para inyección. Por ser una solución alcalina y muy irritante, el laboratorio fabricante sugiere que se administre muy lentamente y con posterioridad, se efectúe el lavado de la vena con suero salino fisiológico.

*Dosis de mantenimiento:* se administró en dosis única diaria de 2,5 mg/kg por vía oral a todos los animales del grupo durante la etapa de tratamiento. Cada comprimido contiene 50 mg de azatioprina. Para la obtención de la dosis elegida, los comprimidos se disolvieron en la cantidad necesaria de agua destilada, esta solución se administró utilizando una sonda gástrica.

#### 4.3.- Grupo IV (Prednisona)

A este grupo de animales se les trató con 3 mg/kg de prednisona (Dacortín, Merck) diariamente por vía oral. Se utilizaron comprimidos de 30 mg que fueron adecuadamente diluidos para obtener la concentración necesaria para el tratamiento de nuestros animales.

#### 5.- Extracción Sanguínea y Procesado de las Muestras

Para la realización de nuestro estudio se tomaron muestras sanguíneas de todos los animales durante todos los días, efectuando la extracción a la misma hora, entre las 8:00-8:30h

de la mañana.

Transcurrido el tiempo necesario para que el vasodilatador haga su efecto, se realizó la extracción sanguínea en la arteria central de la oreja. Para la obtención de la sangre se utilizaron agujas de 21 G utilizando el método de Illera et al. (1990), mediante el cuál se consiguen cantidades suficientes de sangre evitando la lesión del vaso y sin forzar la salida de la sangre para no provocar hemolisis. La sangre se recogió en tubos de cristal de 5 ml sin aditivos. El tratamiento posterior de las muestras fue el siguiente:

- ◆ Las muestras de sangre recogidas en tubos sin aditivos se dejaron coagular a temperatura ambiente, manteniendo el tubo con una inclinación de 45 grados para favorecer la formación del coágulo. Tras una centrifugación en una centrífuga Minifuge RF (Heraeus) a 1.300 x g y a 4°C, durante 15 minutos, se separó el suero utilizando una pipeta pasteur (Brand) y se alicuotó en tubos de plástico de 15 x 50 mm, que se taparon y sellaron con parafilm (American Can Company).
- ◆ Cada tubo y cada alicuota se identificó y etiquetó con el número de animal, grupo, número de alicuota y fecha de recogida. El suero se almacenó y conservó a -30°C en un congelador, para su posterior análisis.

### **III. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y METODOLOGÍA UTILIZADA**

#### **1.- Determinación de Inmunoglobulina G (IgG)**

##### **1.1.- Fundamento de la Técnica ELISA Sandwich**

La técnica analítica ELISA Sandwich es un método inmunoenzimático indicado para la determinación de compuestos de elevado peso molecular, como son las proteínas globulares inmunocompetentes. En nuestro caso se va a utilizar para la cuantificación de inmunoglobulina G (IgG) de conejo.

La técnica consiste en la adhesión en la fase sólida de un primer anticuerpo, anti-IgG de conejo, producido en una especie animal diferente a la que pertenecen nuestras muestras, obteniéndose un anticuerpo anti-especie del compuesto que queremos determinar. Tras un tiempo de incubación, se efectúa la eliminación de los anticuerpos no fijados a la placa y se adiciona la muestra problema y los estándares de IgG de conejo.

Después de un período de incubación necesario para que se produzca la unión  $\text{antiIgG}_{\text{conejo}}\text{-IgG}_{\text{conejo}}$ , se añade un segundo anticuerpo, otro anti-IgG anti-especie, que puede estar producido en la misma especie que el primer anticuerpo (ELISA sandwich homólogo), o en otra distinta (ELISA sandwich heterólogo). Este segundo anticuerpo estará marcado con una enzima, ( $\text{antiIgG}_{\text{conejo}}\text{-Enzima}$ ).

Una vez producida la reacción inmunológica, se forma un doble complejo marcado con la enzima al que se le añade el sustrato y el cromógeno, de tal forma que en los complejos formados se produce una reacción enzimática con el sustrato que provoca la oxidación del cromógeno, el cuál vira de transparente a coloreado con una intensidad que es directamente proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados y, por tanto, a la cantidad de IgG de la muestra.

## 1.2.- Materiales y Reactivos Utilizados

### 1.2.1.- Material:

- Microplacas de poliestiereno de 96 pocillos de alta absorción (Nunc Maxisorp)
- Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l (Comfortips, Eppendorf).
- Puntas de pipeta multicanal, 25-250  $\mu$ l (Costar).
- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100  $\mu$ l y de 100-1000  $\mu$ l.
- Pipeta multicanal de ocho canales, de 50-250  $\mu$ l (Costar).
- Agitador (Vórtex) Reax 2.000 (Heindolph).
- Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- Selladores adhesivos de acetato para placas (ICN Biomedical Inc.)
- Tubos de ensayo de cristal de 16 x 100 mm (Beckton Dickinson).
- Lector automático de placas (Bio-Tek Instruments)

### 1.2.2.- Reactivos:

- Acido ortofosfórico:  $H_3O_4P$  (Merck)
- Agua purificada.

- Albúmina sérica bovina, fracción V: BSA (Cohn, Sigma & Co).
- Anticuerpo: cabra anti-IgG (completa) de conejo (Boehringer Mannheim Biochemicals)
- Cloruro potásico: ClK (Merck)
- Conjugado: cabra anti-IgG (completa) de conejo marcado con peroxidasa (Boehringer Mannheim Biochemicals)
- Digluconato de clorhexidina: 1'1 Hexametilenebis [5-(P-clorofenil-biguanidina)] (Sigma & Co.)
- Di-sodio etilén diamina :EDTA:  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 + 2 H_2O$  (Sigma & Co.)
- Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro:  $HNa_2O_4P$  (Merck).
- Fosfato potásico monobásico:  $KH_2PO_4$
- IgG de conejo estándar (Antibodies Incorporated, Davis, USA)
- MOPS: 3-(N-Morfolino) ácido propanosulfónico, sal sódica (Sigma & Co.)
- Sodio carbonato:  $Na_2CO_3$  (Merck).
- Sodio cloruro: NaCl (Probus).
- Sodio dihidrógeno fosfato monohidrato:  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (Merck).
- Sodio hidrógeno carbonato:  $NaHCO_3$  (Merck).

- Tetrametilbenzidina Sustrato K (TMB) (Labsystems)
- Merthiolato: Acido 2-[(etilmercurio)benzónico], sal sódica (Merck).
- Tween-20 (Merck).

### ***1.2.3.- Soluciones Tampón***

#### *1.2.3.1.- Carbonato-Bicarbonato: pH: 9,6.*

Para 1.000 ml de solución:

- \*  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 1,59 g.
- \*  $\text{NaHCO}_3$ : 2,93 g.
- \* Merthiolato 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

#### *1.2.3.2.- Solución Tampón Fosfato Salino (PBS): pH: 7,2.*

Para 1.000 ml de solución:

- \* NaCl: 8,0 gr
- \* KCl: 0,2 gr
- \*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 1,44gr
- \*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,24 gr
- \* Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

1.2.3.3.- *Solución de Lavado*: Solución concentrada.

Para 1.000 ml de solución:

- \* NaCl 1,5 M: 87,66 g.
- \* Tween-20 0,5%: 5 ml

Conservar a temperatura ambiente. Se utiliza diluida en una proporción 1:10

1.2.3.4.- *Tampón de Neutralización*:

- \* BSA al 1% en PBS

1.2.3.5.- *Tampón MOPS*: pH 7,2

Para 500 ml de solución:

- \* MOPS: 4,18 g
- \* NaCl: 2,92 g
- \* EDTA: 1,86 g
- \* Tween 20 al 0,1%: 0,250 ml
- \* Clorhexidina: 0,024 g
- \* BSA al 0,1%: 0,5 g

Conservar a 4°C

1.2.3.6.- *Sustrato-cromógeno*

Esta solución se encuentra preparada comercialmente, en la proporción necesaria:  
Tetrametilbenzidina Substrato K: TMB (Labsystems)

### 1.2.3.7.- Solución de Frenado: $H_3PO_4$ 4M

Para 500 ml de solución:

\*  $H_3PO_4$ : 28,65ml

Conservar a temperatura ambiente

## 1.3.- Condiciones del Ensayo

Siguiendo el método de Illera *et al.* (1996) para la determinación de LH de rata y Malagón *et al.* (1986) para la determinación de IgG porcina por el método ELISA sandwich y para desarrollar la técnica con nuestra molécula a determinar y para nuestra especie, fijamos las condiciones del ensayo de la siguiente manera:

### 1.3.1.- Fase Sólida

Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos de máxima adsorción (Nunc) y selladores de placas de acetato.

### 1.3.2.- Condiciones de Incubación

- ✓ Adsorción del primer anticuerpo a la fase sólida: el tiempo mínimo necesario es de 16 h a 4°C.
- ✓ Neutralización: media hora a 37°C.
- ✓ Reacción de la muestra con el primer anticuerpo: 2 h a temperatura ambiente.

- ✓ Reacción con el segundo anticuerpo marcado con la enzima: 2 h a temperatura ambiente.
- ✓ Hidrólisis del sustrato: veinte-treinta minutos a temperatura ambiente.

#### **1.4.- Curva Estándar de IgG de Conejo**

Para la realización de la curva patrón o estándar se realizaron diferentes diluciones de una solución conocida de IgG pura de conejo. Las diluciones se realizaron con tampón MOPS para obtener un margen de 1ng/ml a 1.000 ng/ml. Se utilizaron un total de 10 estándares incluyendo un estándar con 0 ng/ml que contiene únicamente el tampón de dilución utilizado (tampón MOPS).

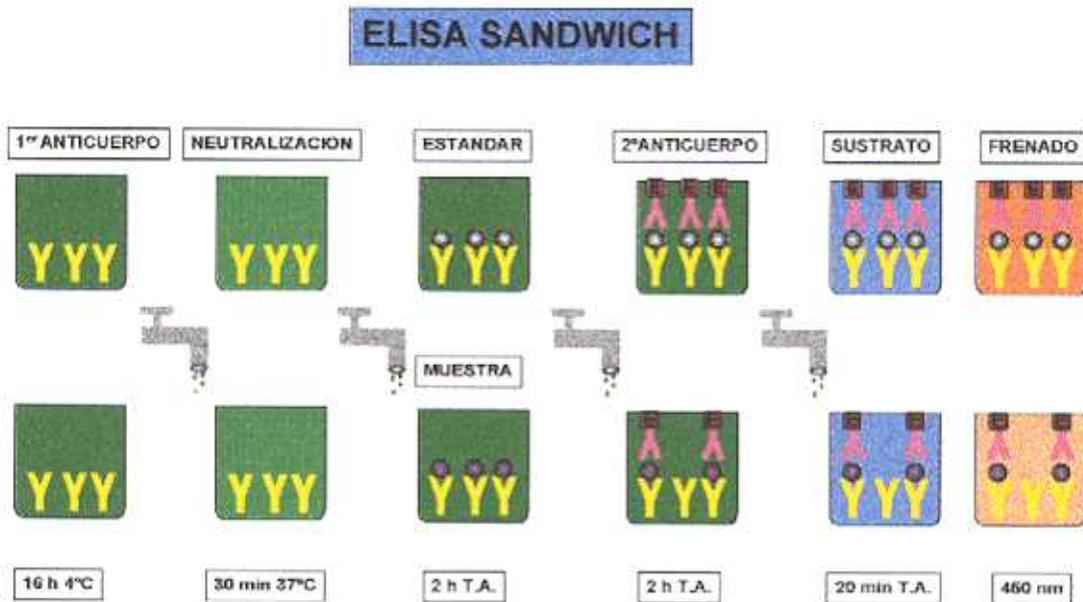
Con estas diluciones se realiza el ELISA sandwich y se traza la curva estándar tomando en un eje las concentraciones conocidas de IgG de conejo y en el otro las absorbancias obtenidas. Sobre esta curva se reflejarán las absorbancias medidas de las muestras para determinar la concentración de IgG correspondiente de cada una de ellas.

#### **1.5.- Determinación de la Dilución Óptima de Suero**

Para la determinación de la dilución óptima de los sueros, se realizaron diferentes diluciones de los mismos desde 1/1.000 a 1/500.000, cuantificándose en nuestra curva patrón.

Se eligió como dilución óptima la 1/100.000 para todas las muestras.

### 1.6.- Desarrollo de la Técnica ELISA Sandwich Homólogo



Comprende las siguientes etapas:

#### 1.6.1.- Tapizado de la Placa

A todos los pocillos placas de poliestireno de alta adsorción, excepto al pocillo 1A que actuará de blanco, se le añade una dilución que contiene un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra (1º anticuerpo).

El anticuerpo se utiliza a una dilución 1/15.000 en tampón carbonato/bicarbonato a razón de 100 µl/pocillo.

La placa se sella y se incuba 16 horas a 4°C de temperatura. Pasado dicho periodo, se realiza el lavado de la placa para eliminar el anticuerpo que no se ha adsorbido a la fase sólida.

El lavado se realiza llenando los pocillos con 200 µl de solución de lavado, posteriormente se vacía por volcado de la placa. Esta operación se realiza cinco veces y después

se seca para que no queden restos de solución.

#### ***1.6.2.- Neutralización de la Placa***

Una vez seca la placa, se añaden 200  $\mu$ l/pocillo de un tampón que contiene BSA al 1% en PBS. El periodo de incubación es de media hora a 37°C. Posteriormente se realiza el lavado de la placa 5 veces con solución de lavado.

#### ***1.6.3.- Adición de la Muestra y de los Estándares***

Se preparan las diferentes diluciones de IgG purificada de conejo (estándares) desde 0,1  $\mu$ g/ml hasta 1 mg/ml en solución tampón MOPS, y se adiciona, por duplicado, a razón de 100  $\mu$ l/pocillo. El total de estándares utilizados es de 10, incluyendo el estandar de 0 mg/ml, que contiene únicamente solución tampón. Seguidamente, en el resto de la placa se añaden 100  $\mu$ l de las diluciones de los sueros, por duplicado, utilizando la dilución 1/100.000.

El periodo de incubación es de 2 h, a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo se realiza de nuevo el lavado de las placas de la forma anteriormente descrita.

#### ***1.6.4.- Adición del Segundo Anticuerpo Conjugado con Peroxidasa***

Se prepara una dilución 1/6.000 de conjugado en solución tampón MOPS. Se añaden a la placa 100 $\mu$ l/pocillo. El tiempo de incubación es de 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se lava la placa.

#### ***1.6.5.- Adición del Sustrato***

Después de secar la placa, se añaden 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de sustrato TMB. Se le deja reaccionar de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente mientras se produce el desarrollo del color.

### **1.6.6.- Frenado y Lectura**

La reacción se frena añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de ácido fosfórico estabilizándose el color y se lee en un lector de placas ELISA a 450 nm y 600 nm.

### **1.6.7.- Procesado de los Resultados**

El procesado de los resultados obtenidos, en el análisis de las inmunoglobulinas G se realiza con la ayuda de un programa informático diseñado especialmente para la técnica ELISA en el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA). Éste programa calcula la curva patrón enfrentando las concentraciones estándar de IgG de conejo con sus respectivas diluciones (eje de abcisas) y el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo ( $E/E_0$ ) (eje de ordenadas). A continuación, el programa calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas patrón

Para expresar correctamente las concentraciones obtenidas debemos tomar en cuenta la dilución de las muestras y multiplicar el resultado por dicha dilución (100.000), denominado factor de corrección.

## **2.- Determinación de las Concentraciones de Hormonas Esteroides: Cortisol, Corticosterona, Androstenodiona, Testosterona y Estradiol**

### **2.1.- Fundamento de la Técnica ELISA de Competición**

La técnica ELISA de competición se basa en la reacción entre un anticuerpo específico fijado a una fase sólida y una muestra problema o estándar (sin marcar) y el conjugado (hormona marcada con una enzima). A continuación se mide la fracción de la hormona marcada unida al anticuerpo, mediante la reacción del sustrato-cromógeno con la enzima, lo cuál se traduce en la oxidación del cromógeno produciéndose una reacción coloreada. Posteriormente, se lee la absorbancia del color desarrollado el cuál será inversamente proporcional a la cantidad de

hormona sin marcar de la muestra (problema o estándar).

## 2.2.- Materiales y Reactivos Utilizados

El material utilizado es el mismo que para la técnica ELISA descrita con anterioridad, la única diferencia es la utilización de otro tipo de placas que en este caso son, microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano, de baja absorción y con una capacidad de 350  $\mu$ l por pocillo (Dynatech).

### 2.2.1.- Reactivos:

- X Acido ortofosfórico:  $H_3O_4P$  (Merck)
- X Agua purificada.
- X Albúmina sérica bovina, fracción V: BSA (Cohn, Sigma & Co).
- X Anticuerpos policlonales obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.): antitestosterona, anti-17 $\beta$ -estradiol, anticortisol, anticorticosterona y antiandrostenediona (Silván *et al.*, 1990; Illera *et al.*, 1992a; Illera *et al.*, 1993a; Silván *et al.*, 1993; Illera *et al.*, 1997).
- X Conjugados hormona-peroxidasa, preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.) para las hormonas anteriormente mencionadas (Silván *et al.*, 1990; Illera *et al.*, 1993a; Silván *et al.*, 1993; Illera *et al.*, 1997).
- X Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro ( $HNa_2O_4P$ ) (Merck).

- X Etanol absoluto:  $C_2H_5OH$  (Prolabo).
  
- X Hormonas esteroideas estándar (Steraloids Inc., N.H. USA):
  - \* 11,17,21-Trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona: cortisol
  - \* (11 $\beta$ )-11,21-Dihidroxipregn-4-eno-3,20-diona: corticosterona
  - \* 4-Androsteno-3,17-diona: Androstenodiona
  - \* 17 $\beta$ -Hidroxiandrost-4-en-3-ona: testosterona.
  - \* (17) $\beta$ -Estra-1,3,5 (10)-trieno-3,17-diol: estradiol.
  
- X Sodio carbonato ( $Na_2CO_3$ ) (Merck).
  
- X Sodio cloruro ( $NaCl$ ) (Probus).
  
- X Sodio dihidrógeno fosfato monohidrato ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) (Merck).
  
- X Sodio hidrógeno carbonato ( $NaHCO_3$ ) (Merck).
  
- X Tetrametilbenzidina Substrato K: TMB (Labsystems)
  
- X Merthiolato: Acido 2-[(etilmercurio)benzóico], sal sódica (Merck).
  
- X Tween-20 (Merck).

### 2.2.2.- Soluciones tampón

#### 2.2.2.1.- Carbonato-Bicarbonato

#### 2.2.2.2.- Solución Tampón EIA: pH: 7,0

Para 1.000 ml de solución:

- \*  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 5,421 g.
- \*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 8,662 g.
- \*  $\text{NaCl}$ : 8,7 g.
- \* Albúmina sérica bovina: 1,0 g.
- \* Merthiolato 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

#### 2.2.2.3.- Solución de Lavado

#### 2.2.2.4.- Sustrato-cromógeno

#### 2.2.2.5.- Solución de Frenado:

### 2.3.- Condiciones del Método

Una vez puesta a punto la técnica ELISA de competición para la determinación de testosterona,  $17\beta$ -estradiol, cortisol, corticosterona y androstenodiona se analizan las muestras de plasma de los distintos animales según el criterio de Silván (1991), Illera *et al.* (1993) e Illera *et al.* (1997):

#### 2.3.1.- Fase sólida:

Se utilizaron microplacas de poliestiereno de 96 pocillos y fondo plano con selladores de acetato.

### **2.3.2.- Condiciones de incubación:**

- Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas a 4°C.
- Reacción de competición: 2 horas a temperatura ambiente.
- Hidrólisis del sustrato: media hora en oscuridad a temperatura ambiente.

La temperatura ambiente no debe superar los 24°C ya que las reacciones enzimáticas no serían estables pudiendo aparecer variaciones en las medidas de absorbancia.

### **2.4.- Determinación de las Diluciones Óptimas de Trabajo**

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo y conjugado para las hormonas debemos enfrentar diluciones diferentes de anticuerpo y conjugado.

Las diluciones de anticuerpo empleadas para testosterona estradiol y cortisol son 1/2.000, 1/4.000 y 1/6.000 y para el conjugado 1/20.000, 1/40.000 y 1/60.000. Para androstenodiona y corticosterona las diluciones enfrentadas son 1/4.000, 1/8.000, 1/16.000 y 1/32.000 para el anticuerpo y para el conjugado de 1/40.000, 1/80.000, 1/160.000 y 1/320.000.

A continuación se seleccionan las diluciones que presenten una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984), eligiéndose las siguientes:

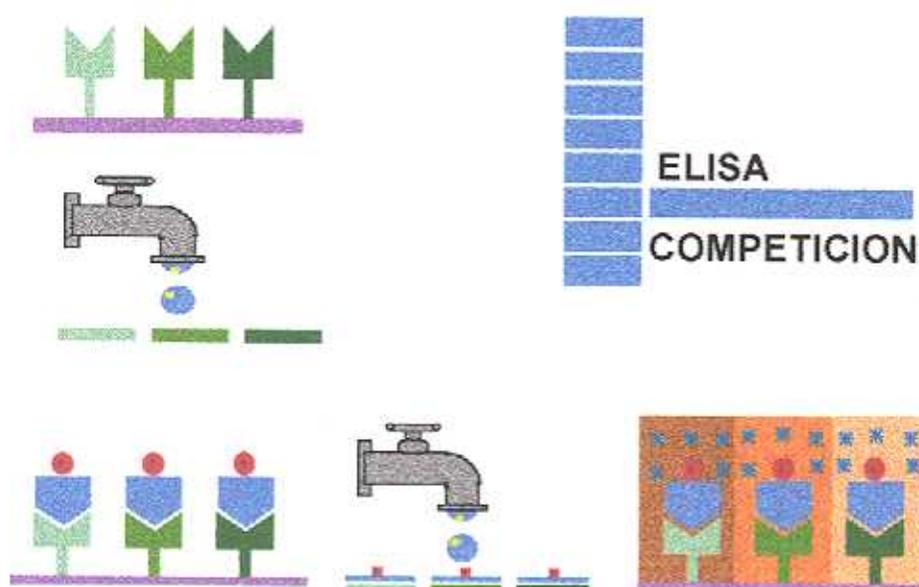
- ◆ Cortisol: 1/6.000 de anticuerpo y 1/60.000 de conjugado.
- ◆ Corticosterona: 1/16.000 de anticuerpo y 1/160.000 de conjugado.
- ◆ Androstenodiona: 1/16.000 de anticuerpo y 1/160.000 de conjugado.
- ◆ Testosterona: 1/6.000 de anticuerpo y 1/50.000 de conjugado.
- ◆ 17β-estradiol: 1/2.000 de anticuerpo y 1/20.000 de conjugado.

## 2.5.- Determinación de las Curvas Estándar

Para trazar la curva patrón o estándar de cada una de las hormonas se parte de una solución madre de concentración conocida: 2 mg/ml en etanol absoluto, la cual se va diluyendo sucesivamente hasta obtener un margen de 1 pg a 1 ng, utilizando un total de 10 estándares.

Las diluciones deben realizarse en tubos de cristal de 10 x 50 mm, en etanol absoluto, el alcohol se evapora utilizando un evaporador por corriente continua de nitrógeno (Turbo Vap LV Evaporator, Zymak) a 40° C y 6 PSI de presión de nitrógeno. A continuación se añade el conjugado a la dilución de trabajo óptima, a los distintos estándares. Posteriormente se analizan por ELISA de competición obteniéndose las diferentes absorbancias medidas a 450 nm y 600nm. Esta curva estándar o patrón, permitirá calcular la concentración de cada hormona de las muestras problemas.

El margen de la curva patrón varía en función de la concentración esperada de la hormona a determinar. En el caso de la testosterona, androstenodiona, corticosterona y el cortisol es de ng/ml, en el caso del 17 $\beta$ -estradiol es de pg/ml. La curva estándar de androstenodiona y estradiol va desde 1.000pg/pocillo a 0,1 pg/pocillo; la de testosterona y cortisol incluye estándares que van desde 1.000pg/pocillo a 0,5 pg/pocillo; la curva de corticosterona cubre un margen de 5.000pg/pocillo a 1 pg/pocillo.



## **2.6.- Desarrollo de la Técnica ELISA de Competición**

Comprende las siguientes etapas:

### ***2.6.1.- Tratamiento de las Muestras***

Para la determinación de las hormonas esteroideas testosterona y androstenodiona, no se precisó ningún tipo de tratamiento previo de los sueros.

Para analizar estradiol-17 $\beta$  se realizó la extracción del esteroide. Para ello, se diluyeron 100  $\mu$ l de suero en 2ml de dietil eter, la mezcla se agita durante 45 segundos y se congela rápidamente utilizando un baño de metanol y nieve carbónica. Una vez congelado el sedimento, el sobrenadante, donde están disueltos los esteroides, se separa y el solvente se evapora mediante un evaporador de flujo de nitrógeno.

Las muestras de suero utilizadas para determinar cortisol y corticoesterona recibieron un tratamiento previo para separar los esteroides que están unidos a las proteínas de transporte. Para ello, se toman 100 $\mu$ l de suero y se disuelven en 1 ml de etanol absoluto. Dicha mezcla, se agita y centrifuga a 3.500 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se cojerán 100  $\mu$ l para la determinación de cada hormona así procesada y se evapora como en el caso anterior.

### ***2.6.2.- Adsorción de los Anticuerpos a la Fase Sólida***

Diluimos el anticuerpo en tampón carbonato/bicarbonato hasta llegar a la dilución correspondiente. A continuación se tapizan los pocillos con 100  $\mu$ l excepto el pocillo A1 que se deja como blanco. Se sellan las placas y se incuban a 4°C durante 16 horas.

Seguidamente se lava tres veces la placa con solución de lavado (200  $\mu$ l por pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha fijado a la placa y se seca enérgicamente mediante volteo en papel de filtro.

### **2.6.3.- Reacción de Competición**

La reacción se produce entre la hormona sin marcar, ya sea de la muestra o estándar, y la hormona conjugada a la enzima.

Se diluyen los conjugados en solución tampón EIA convenientemente y se mezclan tanto la muestra problema como la estándar con la dilución apropiada de conjugado.

A continuación se procede a diluir las muestras en la solución de conjugado en diferentes proporciones: dependiendo de la hormona a determinar. En el caso de testosterona y androstenodiona se añaden 75  $\mu$ l de muestra que se diluyen en 75  $\mu$ l de conjugado en un tubo de ensayo de cristal de 25 x 70 mm y se homogeniza cuidadosamente mediante un vórtex. Se utilizan 50  $\mu$ l de esta solución junto con 50  $\mu$ l de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno.

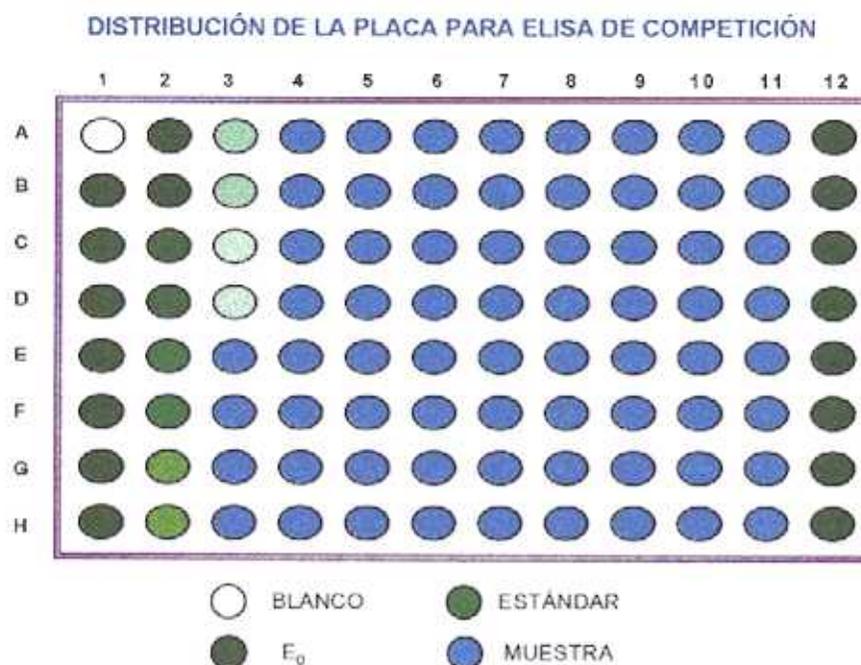
Cuando se determina estradiol-17 $\beta$ , el extracto que se evaporó en el tubo, se rediluye con 150  $\mu$ l de la dilución de conjugado. El procedimiento del tapizado es el mismo, teniendo en cuenta la buena redilución del extracto mediante una agitación enérgica.

En el caso de la determinación de los glucocorticoides cortisol y corticosterona, el procedimiento es similar al anterior, rediluyendo el producto de la evaporación en 150  $\mu$ l de conjugado.

El tiempo que transcurre desde el tapizado del primer pocillo al último, no debe sobrepasar los 10 minutos, debido a que las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra, situada al principio y al final de la placa, pueden alterar la repetibilidad de la técnica de análisis.

Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado, distribuyéndose en la placa representada en el siguiente dibujo, que incluye una primera y última fila, denominadas E<sub>0</sub>,

donde se ha añadido únicamente conjugado.



Las placas se sellan, incubándose durante un periodo de dos horas a temperatura ambiente.

#### *2.6.4.- Separación de las Fracciones de Hormona Libre y Unida a los Anticuerpos Adsorbidos en la Fase Sólida*

Se realiza por volcado de las placas y posterior lavado con 200 µl de solución de lavado por pocillo (tres veces).

#### *2.6.5.- Adición del Sustrato y del Cromógeno*

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 µl de TMB, se sella y se incuba veinte minutos a temperatura ambiente.

#### **2.6.6.- Frenado de las Placas**

Tras el tiempo necesario para que se desarrolle el color del cromógeno, se produce el frenado de la reacción añadiendo 100 ml de solución de frenado.

#### **2.6.7.- Lectura de las Placas**

Una vez frenada la reacción del sustrato, se procede a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado, para ello empleamos un lector automático de placas (ELISA) (Bio-Tek), el cuál mediante filtros de 450 y 600 nm, realiza una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción inespecífica de fondo.

#### **2.6.8.- Procesado de los Resultados**

El procesado de los resultados obtenidos en el análisis hormonal, se realiza con la ayuda de un programa informático diseñado, especialmente para ello, en el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA). Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es necesario la introducción de un factor de corrección en función de la dilución que hayamos utilizado.

### **3.- Análisis de Parámetros Bioquímicos: Perfil Bioquímico**

Las muestras de suero se analizaron utilizando el autoanalizador selectivo de bioquímica sanguínea HITACHI 747 (Hitachi) en el Departamento de Bioquímica del Hospital "La Paz" de Madrid. Las determinaciones bioquímicas sanguíneas analizadas fueron las siguientes:

#### **3.1.- Enzimas Séricas**

##### ***3.1.1.-Aspartato aminotransferasa***

o oxobutarato aminotransferasa (ASAT o GOT) EC 2.6.1.1 (standard of nomenclature), se realizó por un método U-V, expresando los resultados en U/l.

##### ***3.1.2.- Alanino aminotransferasa***

o glutamato piruvato transaminasa (ALAT o GPT) EC 2.6.1.2 utilizando un método colorimétrico enzimático ultravioleta (U-V), determinándose la actividad en U/l.

#### **3.2.- Productos Metabólicos**

##### ***3.2.1.- Urea***

Método U-V cinético, método de oxidación del NADH expresado en mg/dl.

### **3.2.2.- Creatinina**

Método de Jaffé cinético, sin desproteinización. En solución alcalina, la creatinina forma con el picrato un complejo coloreado. Se mide la velocidad del desarrollo del color y se expresa en mg/dl.

### **3.2.3.- Lípidos**

#### **3.2.3.1- Colesterol.**

Método colorimétrico y enzimático (mg/dl).

#### **3.2.3.2- Triglicéridos.**

Método enzimático y colorimétrico por hidrólisis enzimática de los triglicéridos y determinación del glicerol formado (mg/dl).

### **3.3.- Proteínas Totales.**

Método colorimétrico, basado en la reacción del Biuret: en solución alcalina, las proteínas forman con los iones de cobre un complejo coloreado, los resultados se expresan en g/dl.

## ***IV ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS***

El análisis estadístico de nuestros resultados se realizó utilizando el paquete estadístico BMDP (Biomédical Data Program = Programa de Tratamiento de Datos Biomédicos) (Dixon, 1992) en el Centro de Cálculo de Moncloa de la Universidad Complutense de Madrid.

El nivel de significación de los test estadísticos utilizados fue del 95%, correspondiente a una  $p < 0,05$ .

### **1.- Análisis de la Varianza**

Se realizó un Análisis de Varianza con medidas repetidas para cada uno de los parámetros determinados. Esta prueba nos permite comparar, indirectamente, varias medias aritméticas, por medio de la comparación directa de sus dispersiones y además nos permite comprobar la influencia que los factores grupo y tiempo tienen sobre nuestros parámetros. De esta forma se determinó:

**1.1.- Efecto grupo:** nos indica si existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los grupos de animales de nuestra experimentación.

**1.2.- Efecto tiempo:** nos indica si existe una diferencia, estadísticamente significativa, entre los diferentes días de la experimentación.

**1.3.- Interacción:** nos indica si el efecto día difiere de un grupo a otro.

### **2.- Test de Mann-Wittney**

Se realizó un análisis de diferencia de medias, no paramétrico, utilizando el test de Mann-Witney; dicho test no impone ningún requisito a la distribución de las variables. Todos los valores determinados en nuestra experimentación se incluyeron para realizar este análisis.

# **RESULTADOS**

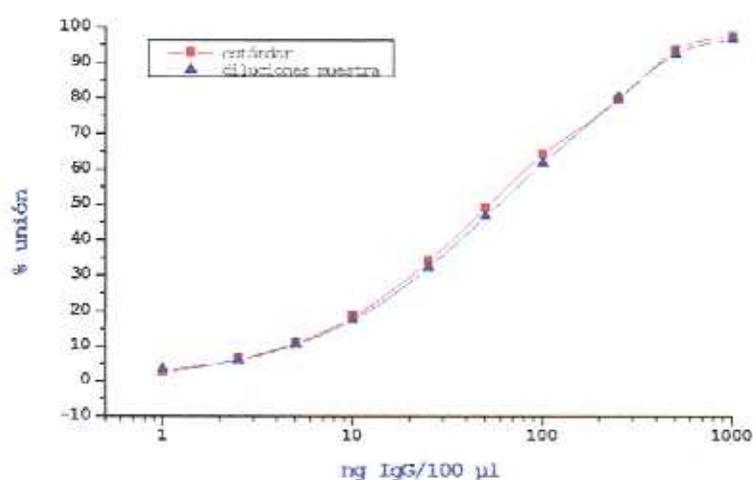
## I.- VALIDACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA ELISA SANDWICH Y DE COMPETICIÓN

### I. Validación y Puesta a Punto de la Técnica ELISA Sandwich para la Determinación de Inmunoglobulina G de Conejo

#### 1.1.- Prueba de Paralelismo

Una premisa importante para poner a punto la técnica ELISA tipo Sandwich homólogo, fue elegir la dilución óptima de suero de nuestras muestras que no produjera una saturación de proteína en el pocillo, de tal forma que las uniones con el anticuerpo fijado a la fase sólida se solaparan y se perdiera, de esta forma, precisión en la determinación.

Para ello se realizaron diferentes diluciones de las mismas muestras en el tampón de dilución elegido (tampón MOPS), comenzando por realizar la técnica utilizando suero puro para posteriormente ir diluyendo el mismo 10 veces; así se efectuaron diluciones 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Pruebas posteriores fueron encaminadas a un ajuste fino para las muestras de nuestro estudio, eligiéndose finalmente la dilución 1/100.000 que nos proporcionó



la sensibilidad y repetibilidad necesaria. Así mismo, se realizó una prueba de paralelismo enfrentando la curva estándar con las diluciones de nuestras muestras, comprobándose que las dos curvas eran paralelas.

### **1.2.- Precisión y Repetibilidad**

El coeficiente de variación (% CV) intra-ensayo se determinó valorando los resultados que nos proporcionaban las mismas muestras en un mismo análisis, mientras que el coeficiente de variación inter-ensayo se determinó de la misma manera pero con análisis realizados en diferentes días. El % CV intra-ensayo no superó el 3,7%, así mismo el % CV inter-ensayo no superó el 10%.

### **1.3.- Exactitud**

Los porcentajes de recuperación oscilaron entre 85-95% ( $p < 0,05$ ).

### **1.4.- Sensibilidad**

En ésta técnica se determina el *límites de detección*, que en el caso de la determinación de IgG de conejo por ELISA sandwich es de 1,60 ng/ml

### **1.5.- Diluciones Óptimas de Anticuerpo y Conjugado**

Para determinar las diluciones óptimas, tanto de anticuerpo como de conjugado, se efectuaron diferentes pruebas hasta elegir la dilución de trabajo para el desarrollo del ELISA sandwich, dichas diluciones fueron las siguientes:

★ Anti-IgG de conejo producido en cabra: 1/ 15.000

★ Conjugado HRP-Anti-IgG de conejo producido en cabra: 1/ 6.000

**2.- Validación y Puesta a Punto de la Técnica ELISA de Competición para las Hormonas Esteroides: Cortisol, Corticosterona, Androstenodiona, Testosterona y 17 $\beta$ -estradiol de suero de conejo.**

**2.2.- Diluciones Óptimas de Anticuerpo y Conjugado**

Los resultados obtenidos tras las pruebas realizadas para calcular la dilución de trabajo óptima de anticuerpo para EIA de competición fueron en cada caso:

**X** Anti-cortisol: 1/6.000

**X** Anti-corticosterona: 1/8.000

**X** Anti-androstenodiona: 1/16.000

**X** Anti-testosterona: 1/6.000

**X** Anti 17 $\beta$ -estradiol: 1/2.000

La determinación de las diluciones óptimas de conjugado son un factor crítico para una puesta a punto del método. Los resultados fueron los siguientes:

**✓** Conjugado HRP-cortisol: 1/60.000

**✓** Conjugado HRP-corticosterona: 1/80.000

**✓** Conjugado HRP-androstenodiona: 1/160.000

**✓** Conjugado HRP-testosterona: 1/50.000

✓ Conjugado HRP-17 $\beta$ -estradiol: 1/20.000

### **2.3.- Precisión y Repetibilidad**

Cálculo de los coeficientes intra e inter-ensayo. %CV = Desviación estándar/media x 100. En nuestro caso, los %CV intra e inter-ensayo fueron siempre menores del 10 % para todas las hormonas estudiadas.

### **2.4.- Exactitud**

Los porcentajes de recuperación oscilaron en todos los casos entre 85-95% (p< 0,05).

### **2.5.- Sensibilidad**

Se determinó de dos formas:

#### **2.5.1.- Límites de Detección:**

- ✧ Cortisol: 3 pg/pocillo
- ✧ Corticosterona: 15,4 pg/pocillo
- ✧ Androstenodiona: 15,4 pg/pocillo
- ✧ Testosterona: 6 pg/pocillo
- ✧ 17 $\beta$ -estradiol: 0,3 pg/pocillo

**2.5.2.- Sensibilidad al 50% de unión:**

✧ Cortisol: 58,82 pg/pocillo

✧ Corticosterona: 20,3 pg/pocillo

✧ Androstenodiona: 12,1 pg/pocillo

✧ Testosterona: 83 pg/pocillo

✧ 17 $\beta$ -estradiol: 8,3 pg/pocillo

## II. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IGG

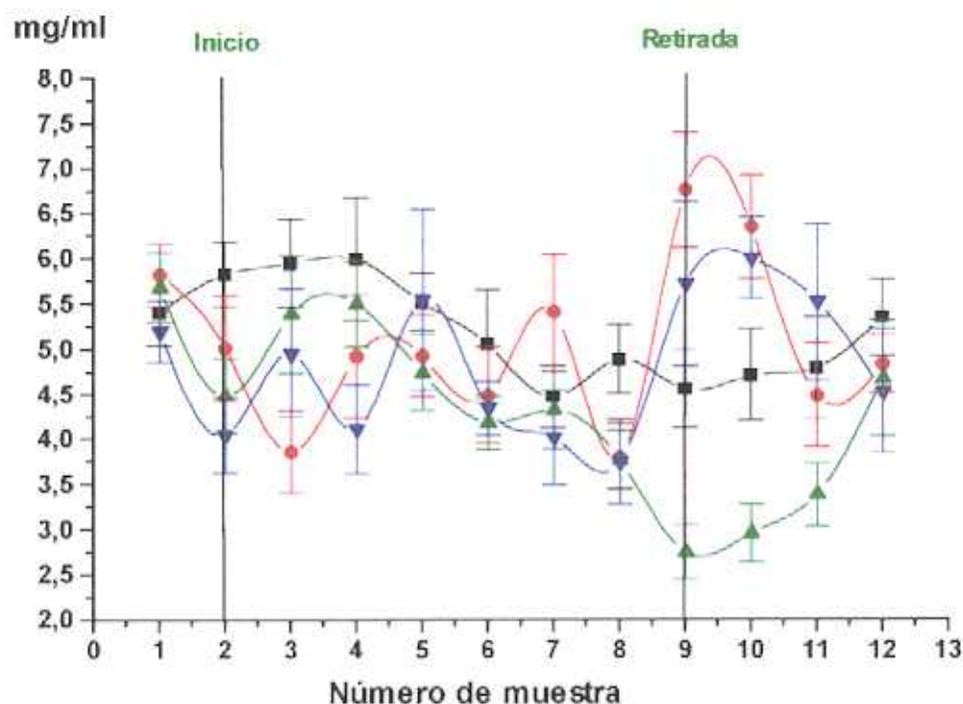
En la *Gráfica 1* y *Tabla 1*, aparecen reflejados los niveles séricos de IgG de todos los grupos experimentales, expresados como media  $\pm$  ESM en mg/ml. En dicha gráfica, se muestran las diferentes fases de la experimentación marcándose las tomas de inicio de tratamiento y de retirada del mismo.

La *Gráfica 1a*, nos muestra las concentraciones séricas de la inmunoglobulina en el Grupo II, tratado con ciclosporina, con respecto al grupo control (Grupo I), observándose que los valores del grupo tratado con ciclosporina, mantiene unos valores inferiores durante la fase experimental, teniendo significación estadística en la toma nº 3 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en la toma nº 9, una vez retirado el tratamiento, se produce un incremento en los niveles de IgG del Grupo II con  $p < 0,001$ , manteniéndose éste incremento en la siguiente toma ( $p < 0,05$ ), para posteriormente igualarse a los valores control.

La *Gráfica 1b*, compara los valores controles con los del grupo de la azatioprina, Grupo III; observándose, que ambos grupos mantienen una trayectoria similar, si bien, los valores del grupo III, son inferiores a los controles. En la fase de retirada del tratamiento, sin embargo, se comprueba que las concentraciones de IgG del grupo tratado con azatioprina continúan con valores inferiores, siendo éstos estadísticamente significativos en la toma nº 9 ( $p < 0,01$ ) y 10 ( $p < 0,05$ ), aunque la toma realizada a la semana de la retirada del tratamiento, los niveles son semejantes a los controles.

La *Gráfica 1c*, en la que están representados las concentraciones del grupo control, comparándolas con los tratados con prednisona (Grupo IV) muestran cómo, al inicio de la etapa de tratamiento, aparece una disminución de las concentraciones séricas de IgG del grupo al que se le administró prednisona, siendo estadísticamente significativo en las tomas nº 2 y 4 ( $p < 0,05$ ). En la fase final de la experimentación, los valores de IgG del Grupo IV aumentan, siendo estos valores estadísticamente significativos en la toma nº 9 ( $p < 0,05$ ), continuando su incremento hasta el final de la experimentación, toma nº 12, donde los valores son semejantes a los del grupo I.

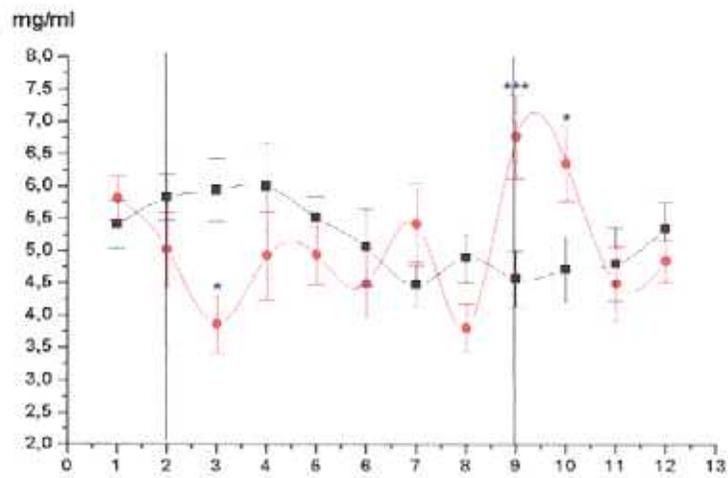
El *Histograma 1*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente, en las tomas nº 9 y 10 de la fase de retirada, debido a una disminución de las concentraciones de IgG del grupo tratado con azatioprina.



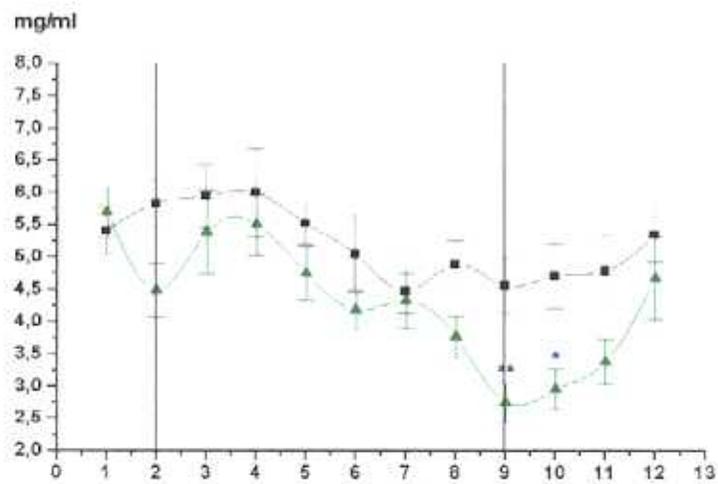
**Gráfica 1.-** Concentraciones séricas de *inmunoglobulina G* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼)

**Tabla 1.-** Concentraciones de *inmunoglobulina G* sérica (mg/ml).

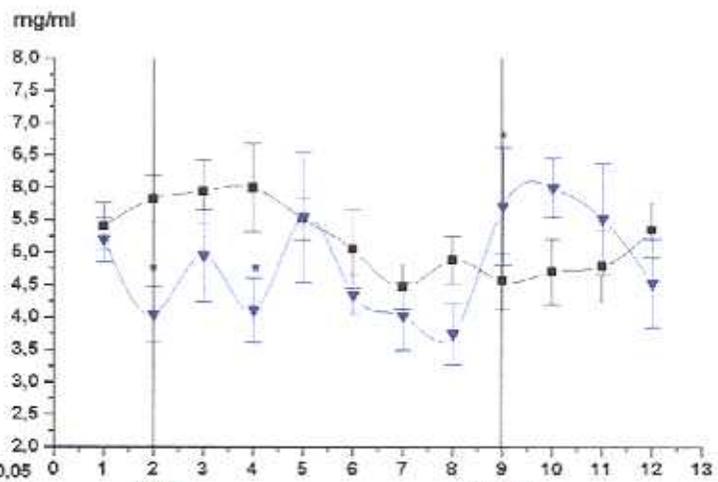
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	5,40 ± 0,36	5,81 ± 0,34	5,68 ± 0,39	5,19 ± 0,34
Toma 2	5,83 ± 0,36	5,01 ± 0,58	4,48 ± 0,42	4,04 ± 0,42
Toma 3	5,95 ± 0,49	3,86 ± 0,45	5,38 ± 0,65	4,95 ± 0,70
Toma 4	6,00 ± 0,68	4,92 ± 0,68	5,50 ± 0,48	4,11 ± 0,50
Toma 5	5,52 ± 0,32	4,92 ± 0,45	4,74 ± 0,42	5,54 ± 1,00
Toma 6	5,05 ± 0,60	4,49 ± 0,54	4,18 ± 0,30	4,34 ± 0,30
Toma 7	4,47 ± 0,35	5,40 ± 0,64	4,32 ± 0,43	4,02 ± 0,53
Toma 8	4,89 ± 0,37	3,80 ± 0,37	3,77 ± 0,32	3,74 ± 0,48
Toma 9	4,56 ± 0,43	6,76 ± 0,64	2,75 ± 0,30	5,71 ± 0,91
Toma 10	4,71 ± 0,51	6,34 ± 0,58	2,95 ± 0,32	6,00 ± 0,45
Toma 11	4,79 ± 0,56	4,48 ± 0,57	3,38 ± 0,35	5,52 ± 0,86
Toma 12	5,34 ± 0,42	4,83 ± 0,32	4,67 ± 0,64	4,53 ± 0,68



a



b

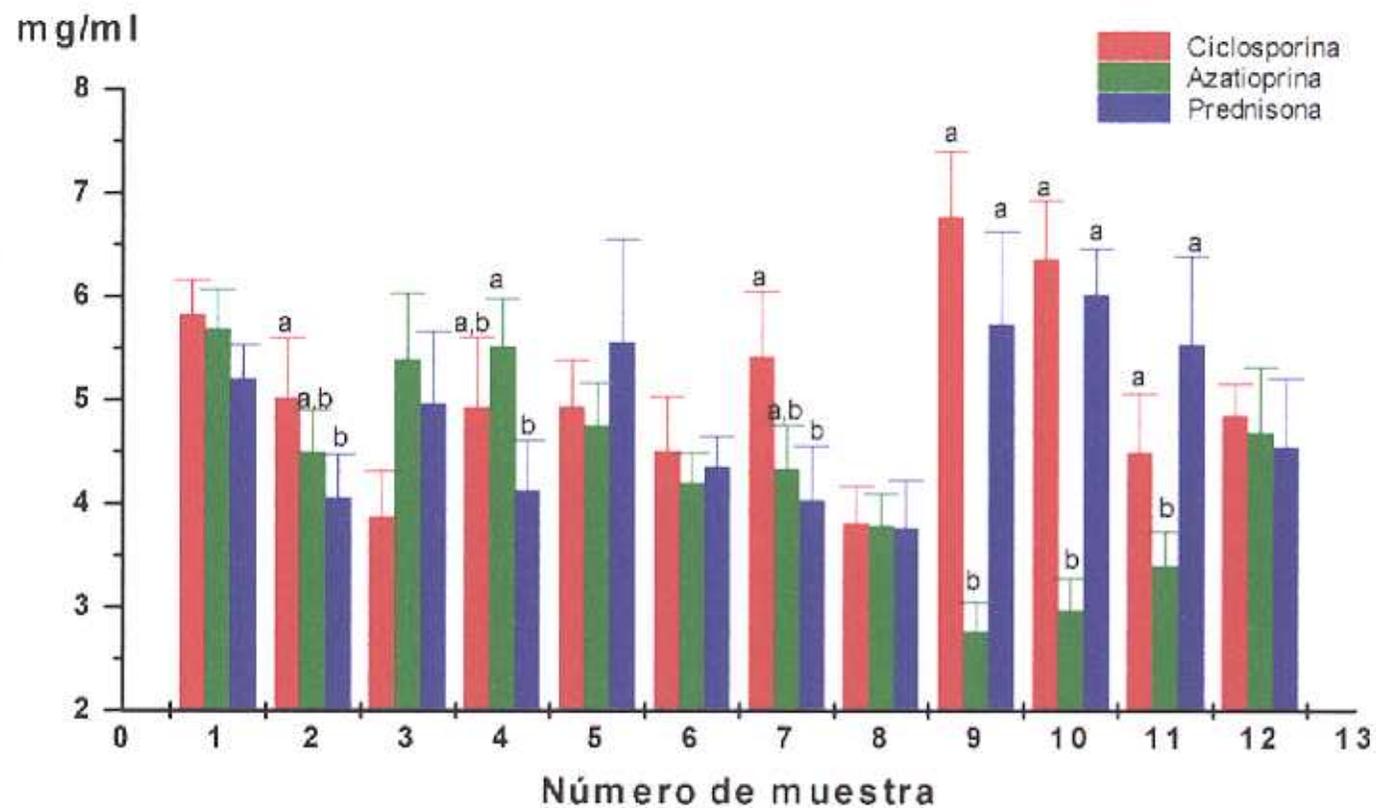


c

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001

Número de muestra

Gráfica 1 (a, b y c).- Comparación de las concentraciones séricas de *inmunoglobulina G* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 1.-**

Comparación entre las concentraciones séricas de *inmunoglobulina G* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

### III. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE GLUCOCORTICOIDES ADRENALES

#### 1.- Corticosterona

En la *Gráfica 2 y Tabla 2*, aparecen reflejados los niveles séricos de corticosterona de todos los grupos experimentales, expresados como media  $\pm$  ESM en ng/ ml.

La *Gráfica 2a*, compara los valores controles con los del grupo de la ciclosporina; manifestándose un incremento en las concentraciones séricas de corticosterona en el grupo II, durante la fase experimental, en las tomas n° 3 ( $p < 0,01$ ); 4 ( $p < 0,01$ ); 5 ( $p < 0,001$ ); y 6 ( $p < 0,001$ ). En el resto de las tomas no se observan variaciones entre los grupos.

La *Gráfica 2b*, nos muestra las concentraciones séricas de esta hormona en el grupo III, tratado con azatioprina, con respecto al grupo control, Grupo I; observándose, un comportamiento del grupo tratado con azatioprina semejante al grupo de tratamiento II, apareciendo aumentos estadísticamente significativos en las tomas n° 3  $p < 0,001$ ; 4  $p < 0,05$ ; 5  $p < 0,001$ ; 6  $p < 0,05$ ; 7  $p < 0,05$  y toma n° 8  $p < 0,01$ . Durante toda la fase experimental y aún en la fase de retirada del tratamiento, los valores de corticosterona de este grupo tratado fueron superiores a los controles, aunque estos valores, en la toma realizada a la semana de la retirada, son semejantes en ambos grupos.

La *Gráfica 2c*, en la que están representados las concentraciones del grupo control, comparándolas con los tratados con prednisona, grupo IV; se refleja sin embargo, un comportamiento contrario en este grupo de tratamiento. Los valores del grupo IV son inferiores durante toda la fase experimental e incluso llegando hasta la toma n° 12. Las diferencias estadísticas encontradas son: toma n° 3 ( $p < 0,05$ ); 4 ( $p < 0,001$ ); 5 ( $p < 0,01$ ); 7 ( $p < 0,05$ ); 8, 9 y 10 ( $p < 0,001$ ) y en la toma n° 11 ( $p < 0,01$ ).

El *Histograma 2*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente desde la toma 2 hasta incluso la n° 11, siendo

estas diferencias fundamentalmente por la disminución de los valores de corticosterona del grupo tratado con prednisona frente a los otros dos grupos de tratamiento, donde los valores están incrementados.

## 2.- Cortisol

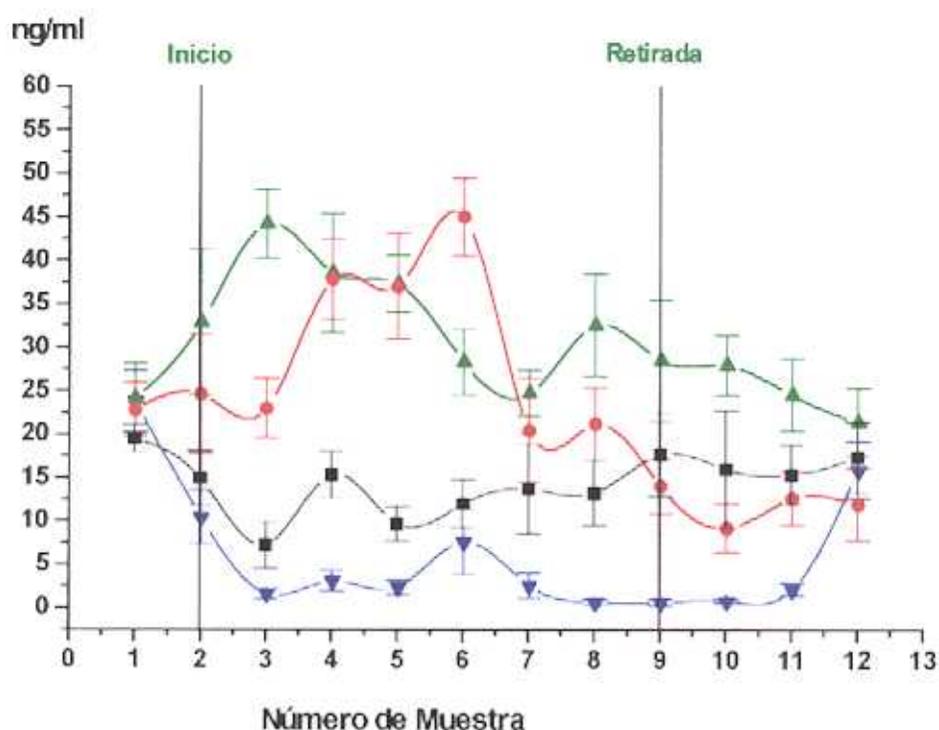
En la *Gráfica 3 y Tabla 3*, aparecen reflejados los niveles séricos de cortisol de todos los grupos experimentales, expresados como media  $\pm$  ESM en ng/ ml.

La *Gráfica 3a*, compara los valores controles con los del grupo de la ciclosporina, Grupo II; indicando unas concentraciones semejantes en ambos grupos aunque el grupo tratado muestra una diferencia estadísticamente significativa en la toma nº 3 ( $p < 0,05$ ), aunque los valores de cortisol del grupo al que se le administró ciclosporina mantienen un ligero incremento durante la fase experimental.

La *Gráfica 3b*, nos muestra las concentraciones séricas de esta hormona en el Grupo III, tratado con azatioprina, con respecto al grupo control, Grupo I, observándose como al comienzo del tratamiento con el inmunosupresor, las concentraciones del cortisol se incrementan con significación estadística en las tomas nº 3, 4 y 5 ( $p < 0,001$ ), sin embargo, posteriormente ambos grupos continúan la misma línea.

La *Gráfica 3c*, en la que están representados las concentraciones del grupo control, comparándolas con los tratados con prednisona, grupo IV; no se aprecian variaciones entre dichos grupos.

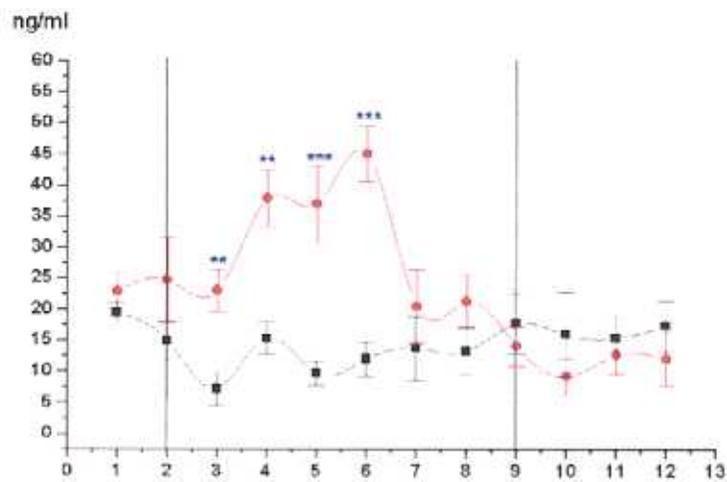
El *Histograma 3*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente en las tomas nº 3, 4 y 5, del comienzo de la experimentación y también en las tomas nº 8 y 9 fundamentalmente por una disminución de las concentraciones de cortisol en el grupo tratado con prednisona.



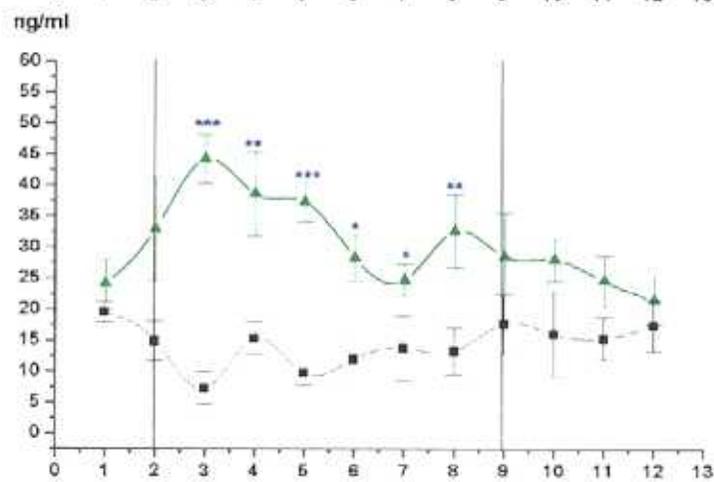
**Gráfica 2.-** Concentraciones séricas de *corticosterona* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 2.-** Concentraciones de *corticosterona* sérica (ng/ml).

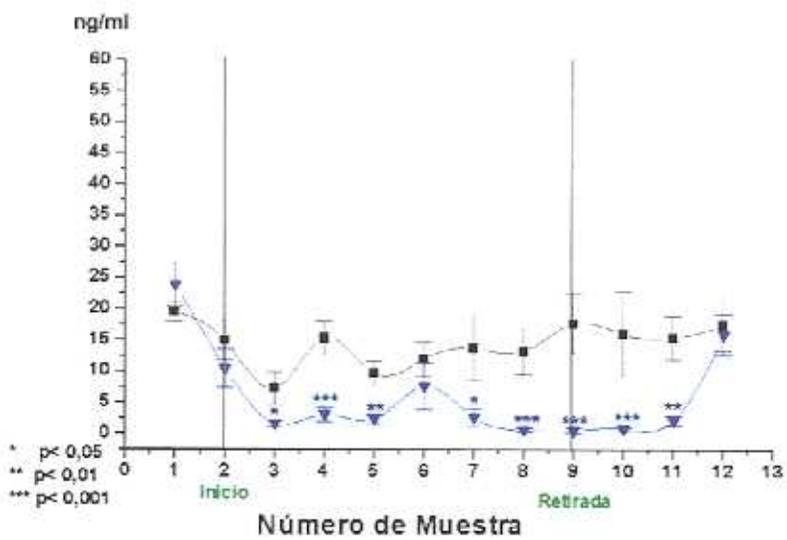
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	19,48 ± 1,59	22,78 ± 3,12	24,07 ± 4,02	23,78 ± 3,54
Toma 2	14,91 ± 3,16	24,60 ± 6,86	32,83 ± 8,35	10,39 ± 3,09
Toma 3	7,26 ± 2,68	22,98 ± 3,43	44,23 ± 3,97	1,58 ± 0,53
Toma 4	15,35 ± 2,70	37,88 ± 4,63	38,54 ± 6,87	3,09 ± 1,20
Toma 5	9,73 ± 1,99	37,03 ± 6,08	37,30 ± 3,27	2,35 ± 0,81
Toma 6	11,96 ± 2,80	45,02 ± 4,48	28,33 ± 3,75	7,56 ± 3,74
Toma 7	13,73 ± 5,21	20,45 ± 5,95	24,75 ± 2,62	2,60 ± 1,46
Toma 8	13,26 ± 3,77	21,27 ± 4,20	32,58 ± 5,92	0,69 ± 0,31
Toma 9	17,67 ± 4,82	14,03 ± 3,11	28,52 ± 7,01	0,64 ± 0,37
Toma 10	16,02 ± 6,81	9,17 ± 2,80	27,96 ± 3,44	0,82 ± 0,22
Toma 11	15,35 ± 3,45	12,65 ± 3,06	24,56 ± 4,11	2,15 ± 0,71
Toma 12	17,39 ± 4,11	11,98 ± 4,16	21,45 ± 3,89	15,93 ± 3,26



a



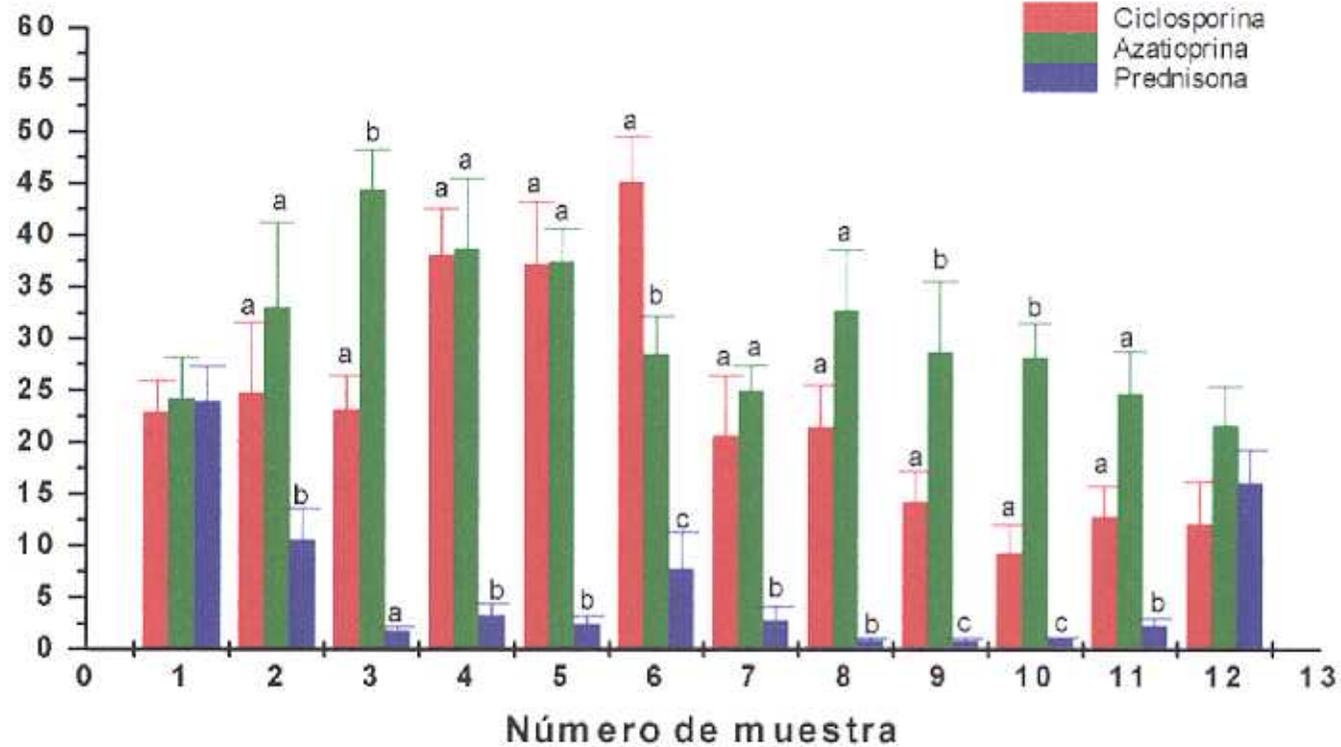
b



c

**Gráfica 2 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *corticosterona* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

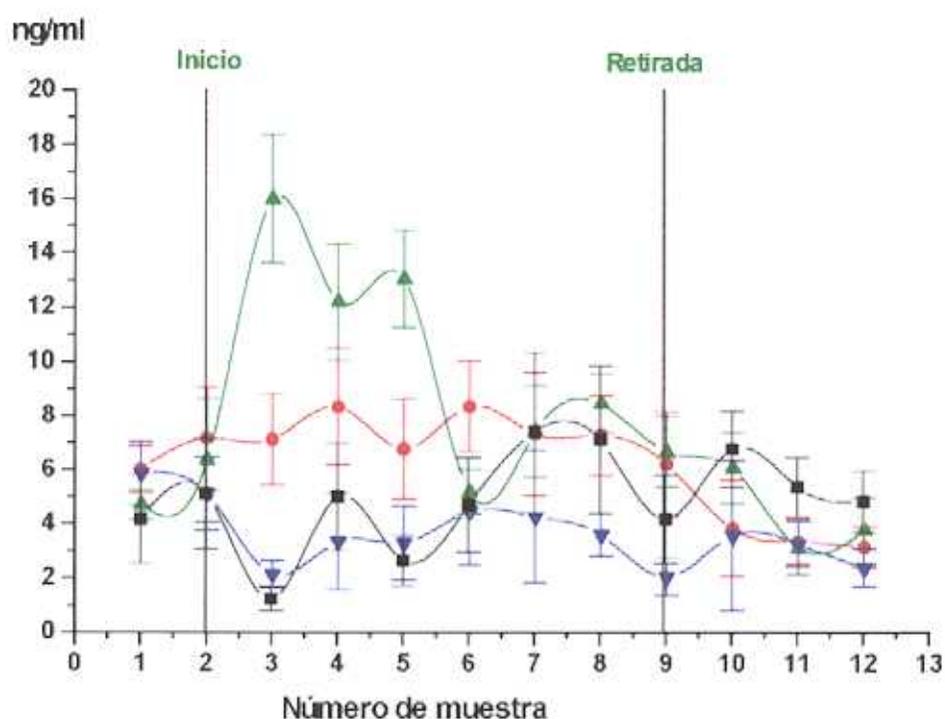
ng/ml



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ )

**Histograma 2.-**

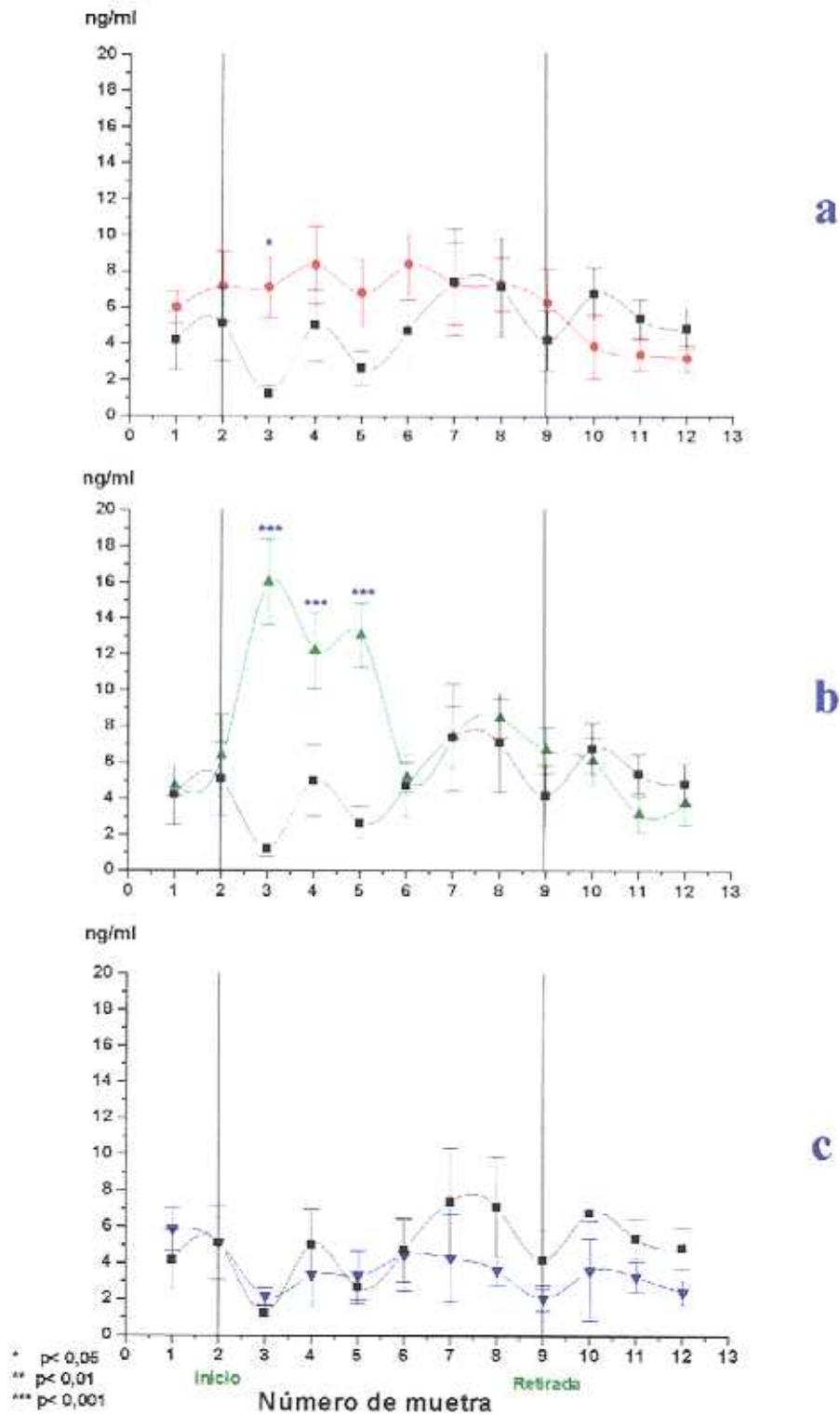
Comparación entre las concentraciones séricas de *corticosterona* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



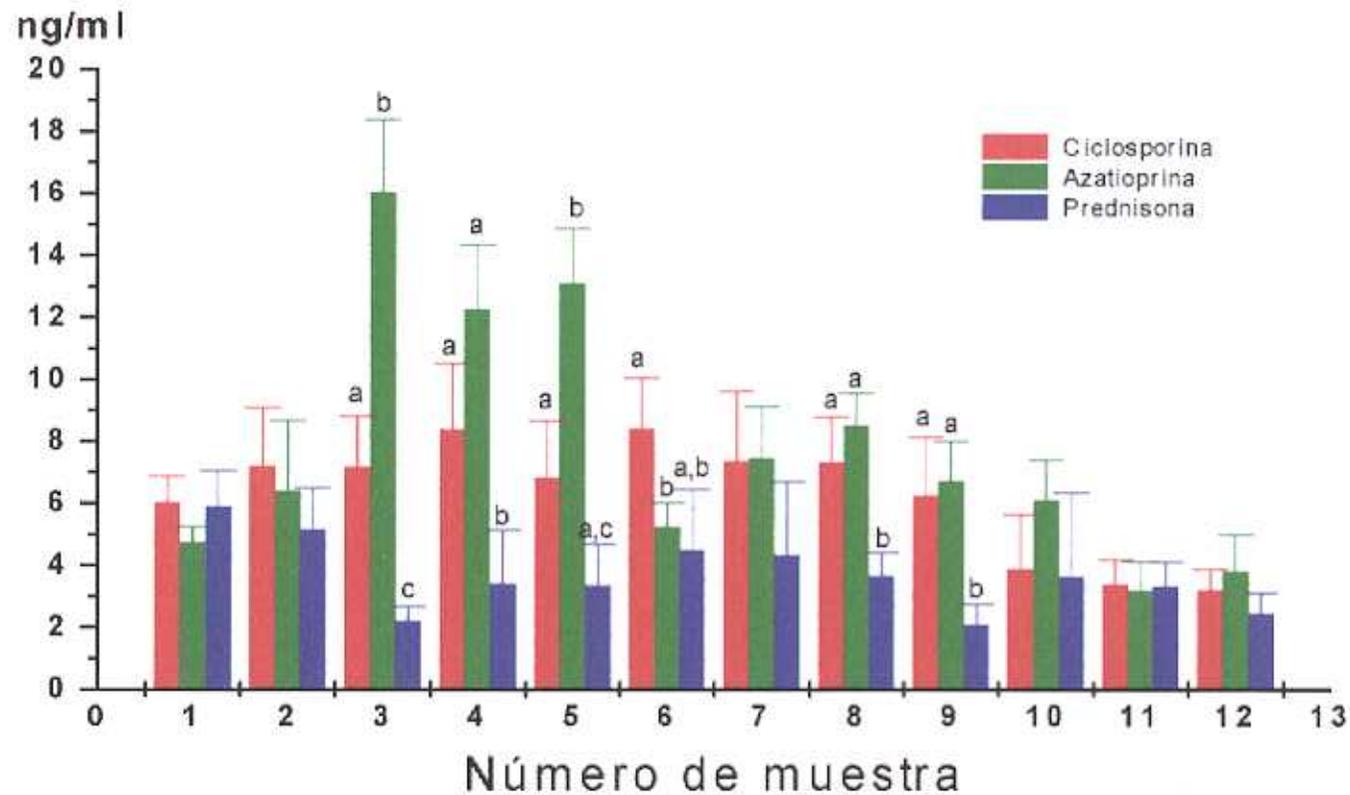
**Gráfica 3.-** Concentraciones séricas de *cortisol* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 3.-** Concentraciones de *cortisol* sérica (ng/ml).

	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	4,18 ± 1,63	5,99 ± 0,88	4,68 ± 0,55	5,84 ± 1,18
Toma 2	5,11 ± 2,03	7,15 ± 1,92	6,35 ± 2,31	5,11 ± 1,36
Toma 3	1,25 ± 0,46	7,12 ± 1,69	15,99 ± 2,38	2,14 ± 0,49
Toma 4	5,00 ± 1,98	8,33 ± 2,15	12,19 ± 2,13	3,35 ± 1,76
Toma 5	2,66 ± 0,92	6,76 ± 1,87	13,04 ± 1,80	3,29 ± 1,36
Toma 6	4,70 ± 1,75	8,35 ± 1,68	5,17 ± 0,81	4,45 ± 1,98
Toma 7	7,39 ± 2,96	7,31 ± 2,28	7,40 ± 1,71	4,27 ± 2,42
Toma 8	7,12 ± 2,73	7,27 ± 1,48	8,45 ± 1,09	3,59 ± 0,80
Toma 9	4,18 ± 1,63	6,20 ± 1,93	6,67 ± 1,30	2,05 ± 0,68
Toma 10	6,77 ± 1,41	3,83 ± 1,77	6,06 ± 1,32	3,57 ± 2,76
Toma 11	5,36 ± 1,09	3,34 ± 0,83	3,12 ± 0,98	3,25 ± 0,84
Toma 12	4,83 ± 1,12	3,14 ± 0,73	3,75 ± 1,21	2,39 ± 0,70



**Gráfica 3 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *cortisol* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 3.-**

Comparación entre las concentraciones séricas de *cortisol* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

#### **IV. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE HORMONAS ESTEROIDES GONADALES**

##### **1.- Androstenodiona**

En la *Gráfica 4 y Tabla 4*, aparecen reflejados los niveles séricos de androstenodiona de todos los grupos experimentales, expresados como media  $\pm$  ESM en ng/ ml.

La *Gráfica 4a*, compara los valores controles con los del grupo de la ciclosporina, Grupo II; Observándose, como el grupo tratado experimenta un incremento a partir de la toma n° 3 y hasta el final de la fase experimental, obteniéndose valores estadísticamente significativos en las tomas n° 3, ( $p < 0,05$ ); 4 ( $p < 0,01$ ); 5 ( $p < 0,001$ ) y 9, 10, 11 y 12 ( $p < 0,001$ ). Como se indica, en la fase de retirada del tratamiento, los valores del grupo II continúan elevados incluso en la toma realizada a la semana del fin del tratamiento.

La *Gráfica 4b*, nos muestra las concentraciones séricas de esta hormona en el Grupo III, tratado con azatioprina, con respecto al grupo control, Grupo I. Se observan diversas fluctuaciones en los valores de ambos grupos, que siguen una trayectoria semejante durante la fase experimental, excepto en la toma n° 6 en que aparece un incremento en los valores del grupo II encontrándose diferencias estadísticas de  $p > 0,05$ .

La *Gráfica 4c*, en la que están representados las concentraciones del grupo control, comparándolas con los tratados con prednisona, grupo IV; aparecen incrementos en la fase experimental, siendo estadísticamente significativo en las tomas n° 3 ( $p < 0,01$ ) y n° 5 ( $p < 0,001$ ).

El *Histograma 4*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente en las tomas n° 3, 4 y 5 de la fase experimental.

## 2.- Testosterona

En la *Gráfica 5 y tabla 5*, se encuentran expresados las concentraciones séricas (media  $\pm$  ESM) de testosterona de las muestras de los diferentes grupos experimentales, expresadas en ng/ml.

La *Gráfica 5a*, refleja las variaciones que experimenta el grupo ciclosporina comparandolo con el grupo I, observando disminuciones en la concentración de testosterona, fundamentalmente al comienzo de la fase experimental, siendo estos valores estadísticamente significativos en las tomas n° 3 y 4 ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, los valores se incrementan, siendo, en la toma n° 9 estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), para terminar, al final de la experimentación, con valores semejantes a los determinados en el grupo control.

En la *Gráfica 5b*, donde se compara el grupo I con el III, se aprecian fluctuaciones en ambos grupos no siendo estadísticamente significativo, excepto en la toma de muestra n° 4; aquí los valores de testosterona del grupo tratado con azatioprina muestran una disminución ( $p < 0,05$ ).

La *Gráfica 5c*, expresa las variaciones del grupo IV, comprobándose que en la primera parte de la fase experimental, los valores de testosterona del grupo tratado con prednisona son semejantes a los del grupo control; sin embargo, a partir de la toma n° 7 ( $p < 0,05$ ) y en la fase de retirada del tratamiento, las concentraciones de testosterona comienzan a incrementarse, volviendo a valores semejantes a los del control, en la toma realizada a la semana de la retirada.

El *Histograma 5*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, nos muestra diferencias estadísticas al inicio del tratamiento, fundamentalmente por una disminución de las concentraciones de testosterona del grupo tratado con ciclosporina. Por otra parte, en las tomas 9 y 10, las diferencias entre los diferentes grupos se reflejan en una disminución de los valores de testosterona del grupo tratado con prednisona.

### 3.- 17 $\beta$ -estradiol

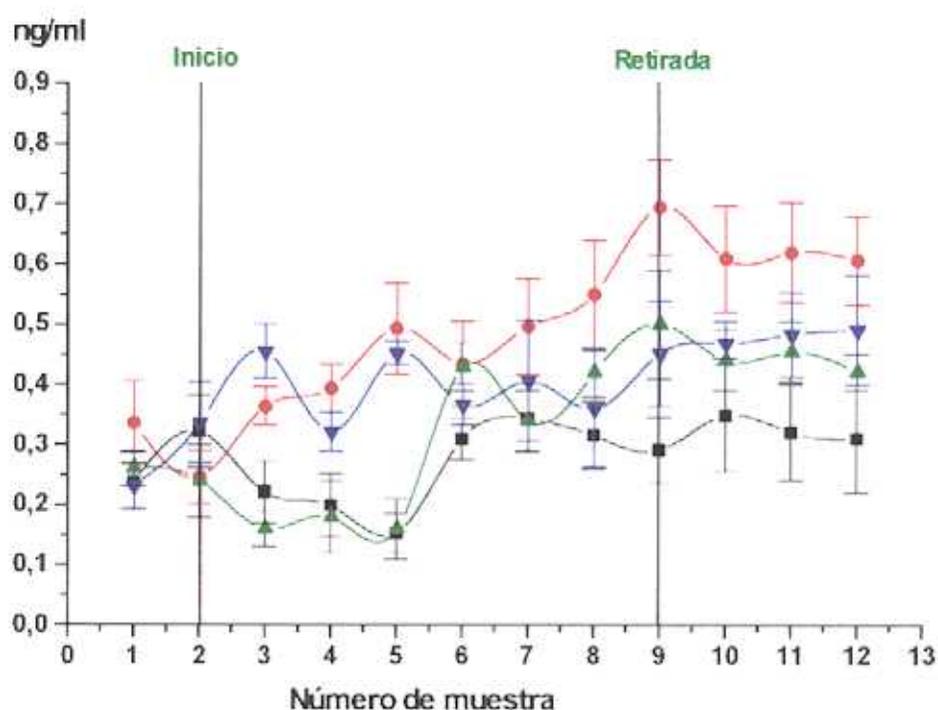
En la *Gráfica 6* y *Tabla 6*, se muestran los niveles séricos de 17 $\beta$ -estradiol (media  $\pm$  ESM), expresado en ng/ml, de todos los grupos.

En la *Gráfica 6a*, se expresa claramente, una disminución en las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol en los animales del grupo que se trató con ciclosporina. El análisis de la diferencia de medias indicó estas variaciones en las tomas n° 3 ( $p < 0,05$ ), 4 ( $p < 0,001$ ), 6 ( $p < 0,001$ ), 7 ( $p < 0,001$ ) y 8 ( $p < 0,01$ ). En la fase de retirada, los valores de 17 $\beta$ -estradiol del grupo tratado, comenzaron a incrementarse con respecto a los controles, siendo estadísticamente significativo en la toma n° 9 ( $p < 0,05$ ). En la toma n° 12 éstos se equiparan con los determinados en el grupo control.

La *Gráfica 6b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina no teniendo ninguna diferencia estadística, excepto en la toma n° 6 y 9 ( $p < 0,05$ ), con un incremento en las concentraciones del grupo tratado.

En la *Gráfica 6c*, expresa, al inicio del tratamiento, toma n° 2, un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, los valores del grupo de animales tratados con prednisona disminuyeron posteriormente, sobre todo en la segunda parte de la fase experimental, siendo de significación estadística las tomas n° 7 ( $p < 0,05$ ) y 8 ( $p < 0,01$ ). En la fase de retirada las concentraciones de ambos grupos se equipararon.

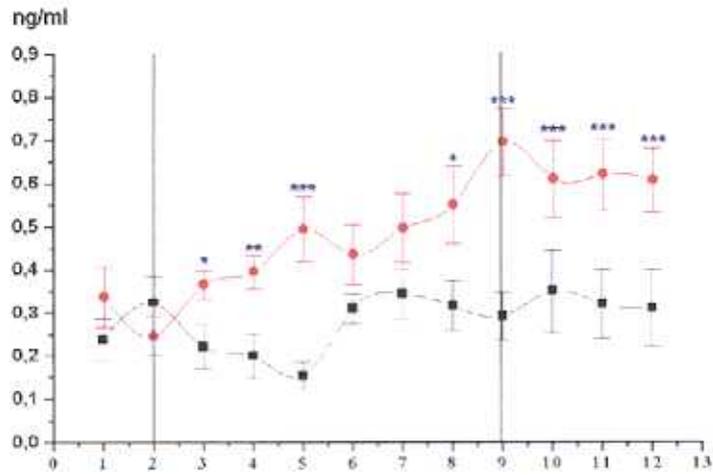
El *Histograma 6*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente entre las tomas n° 4 y 9 de la fase experimental, indicando grandes diferencias entre los distintos tratamientos.



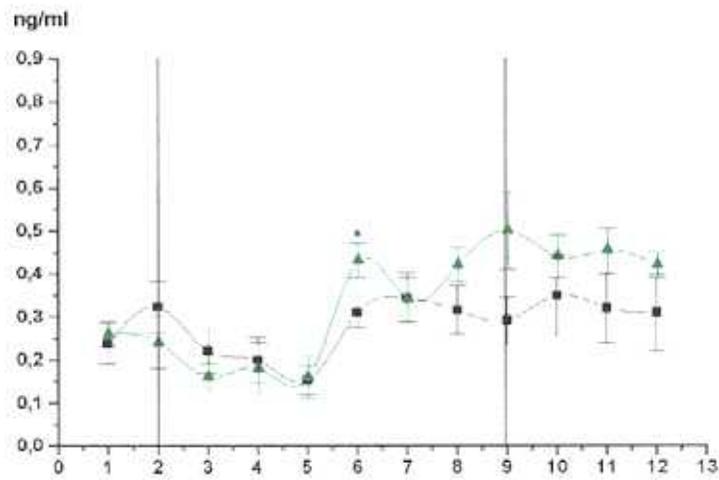
**Gráfica 4.-** Concentraciones séricas de *androstenediona* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 4.-** Concentraciones de *androstenediona* sérica (ng/ml).

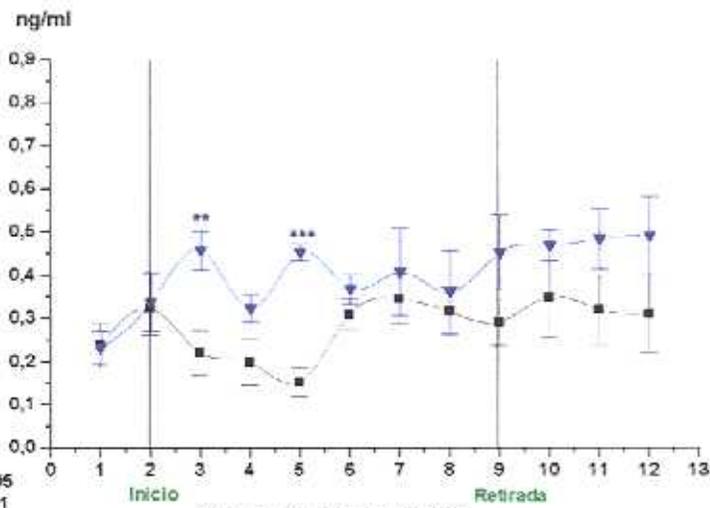
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	0,24 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,04
Toma 2	0,32 ± 0,06	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,34 ± 0,07
Toma 3	0,22 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,46 ± 0,04
Toma 4	0,20 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,32 ± 0,03
Toma 5	0,15 ± 0,03	0,49 ± 0,08	0,16 ± 0,05	0,45 ± 0,02
Toma 6	0,31 ± 0,03	0,43 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,37 ± 0,03
Toma 7	0,34 ± 0,06	0,50 ± 0,08	0,34 ± 0,05	0,41 ± 0,10
Toma 8	0,32 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,42 ± 0,04	0,36 ± 0,10
Toma 9	0,29 ± 0,06	0,69 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,45 ± 0,09
Toma 10	0,35 ± 0,09	0,61 ± 0,09	0,44 ± 0,05	0,47 ± 0,04
Toma 11	0,32 ± 0,08	0,62 ± 0,08	0,45 ± 0,05	0,48 ± 0,07
Toma 12	0,31 ± 0,09	0,61 ± 0,07	0,42 ± 0,03	0,49 ± 0,09



a



b

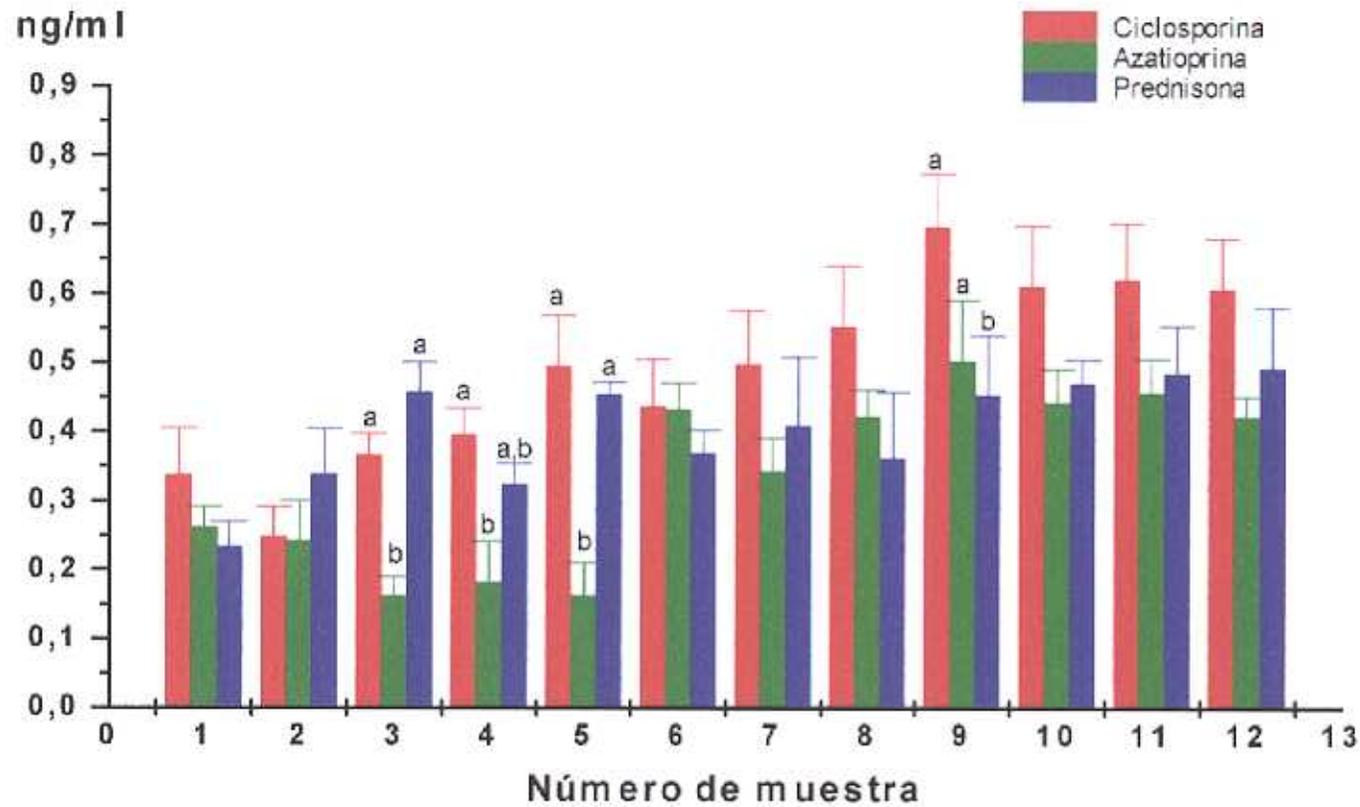


c

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001

Número de muestra

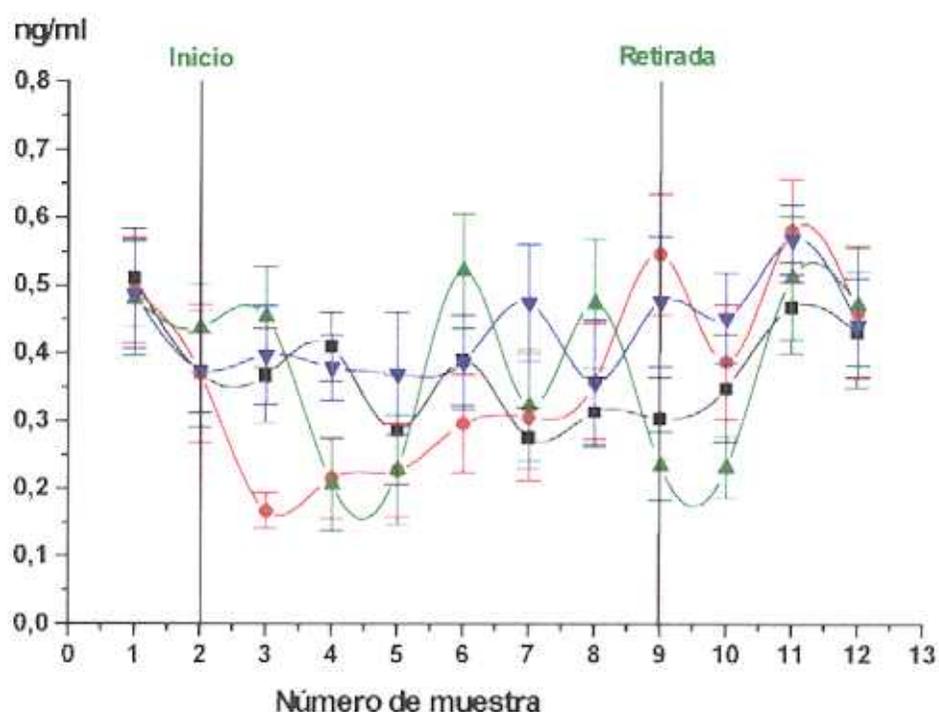
**Gráfica 4 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *androstenediona* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 4.-**

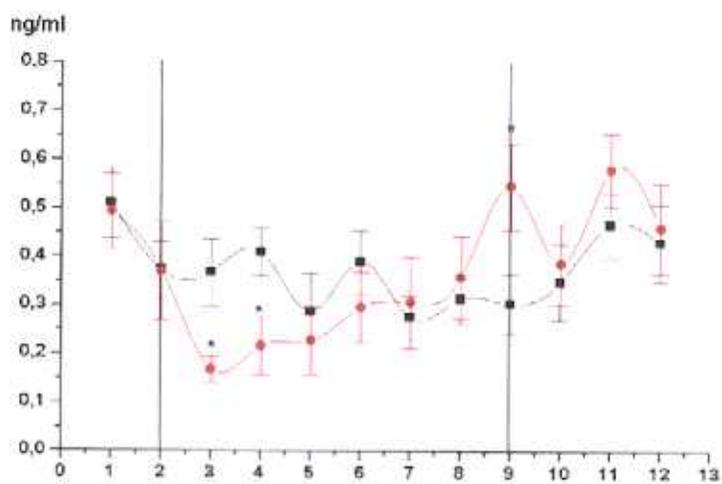
Comparación entre las concentraciones séricas de *androstenediona* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



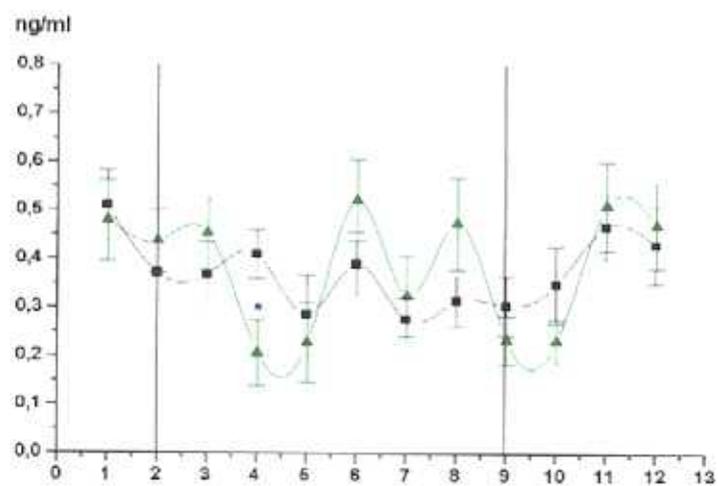
**Gráfica 5.-** Concentraciones séricas de *testosterona* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 5.-** Concentraciones de *testosterona* sérica (ng/ml)

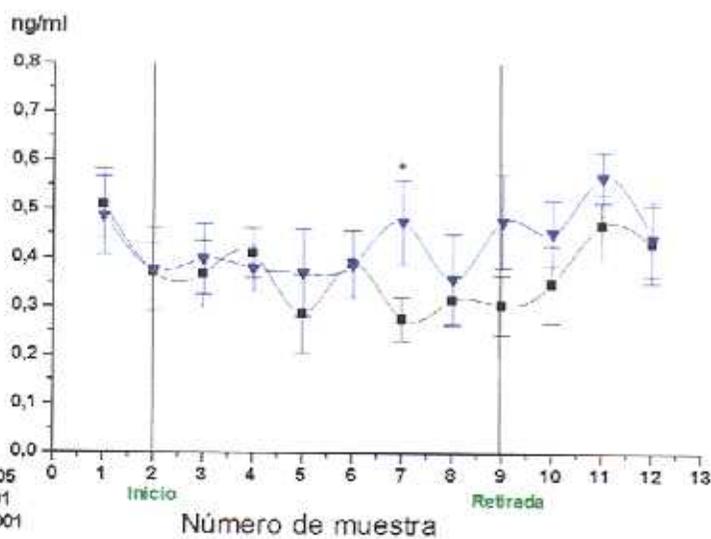
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	0,51 ± 0,07	0,49 ± 0,08	0,48 ± 0,08	0,49 ± 0,08
Toma 2	0,37 ± 0,06	0,37 ± 0,10	0,44 ± 0,06	0,38 ± 0,09
Toma 3	0,37 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,45 ± 0,07	0,40 ± 0,07
Toma 4	0,41 ± 0,05	0,22 ± 0,06	0,21 ± 0,07	0,38 ± 0,05
Toma 5	0,29 ± 0,08	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,08	0,37 ± 0,09
Toma 6	0,39 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,52 ± 0,08	0,39 ± 0,07
Toma 7	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,09	0,32 ± 0,08	0,47 ± 0,09
Toma 8	0,31 ± 0,05	0,36 ± 0,08	0,47 ± 0,10	0,36 ± 0,09
Toma 9	0,30 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,23 ± 0,05	0,48 ± 0,10
Toma 10	0,35 ± 0,08	0,39 ± 0,08	0,23 ± 0,05	0,45 ± 0,07
Toma 11	0,47 ± 0,07	0,58 ± 0,08	0,51 ± 0,09	0,56 ± 0,05
Toma 12	0,43 ± 0,08	0,46 ± 0,09	0,47 ± 0,09	0,44 ± 0,08



a



b

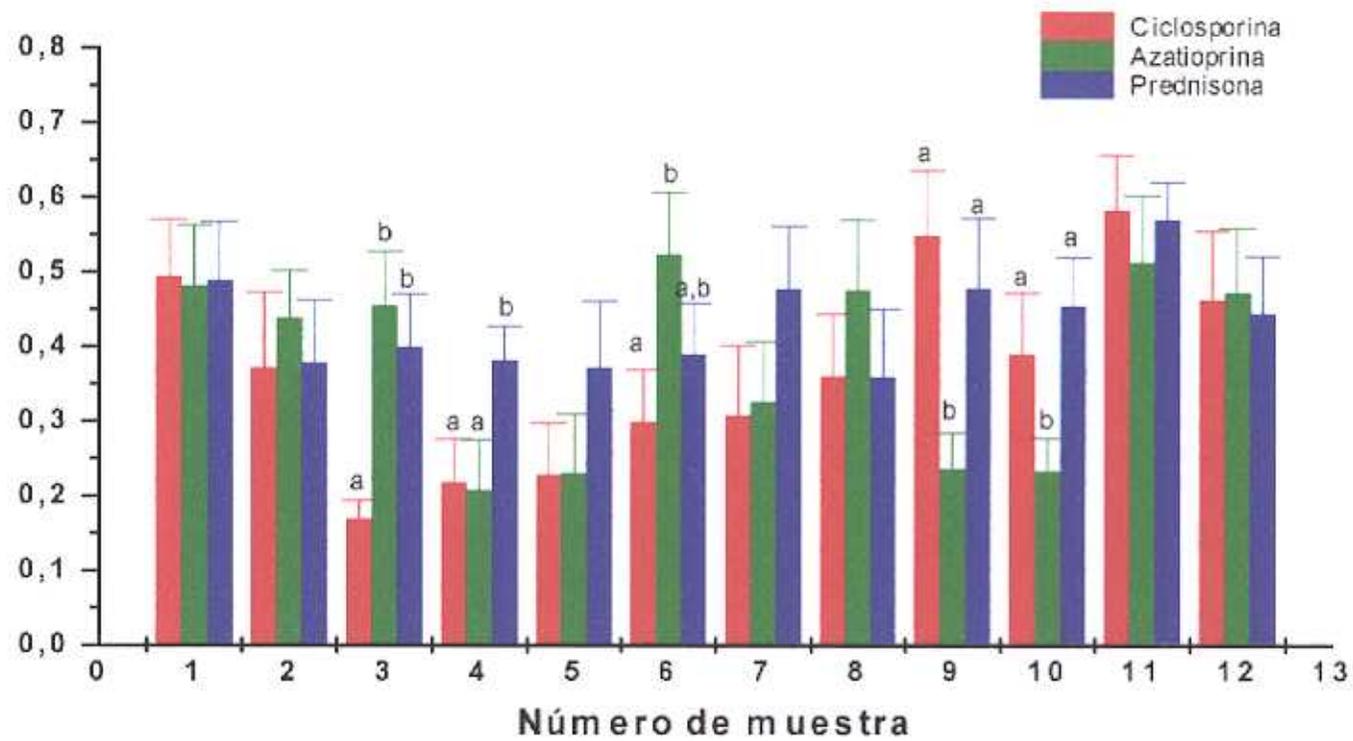


c

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,001$

Número de muestra

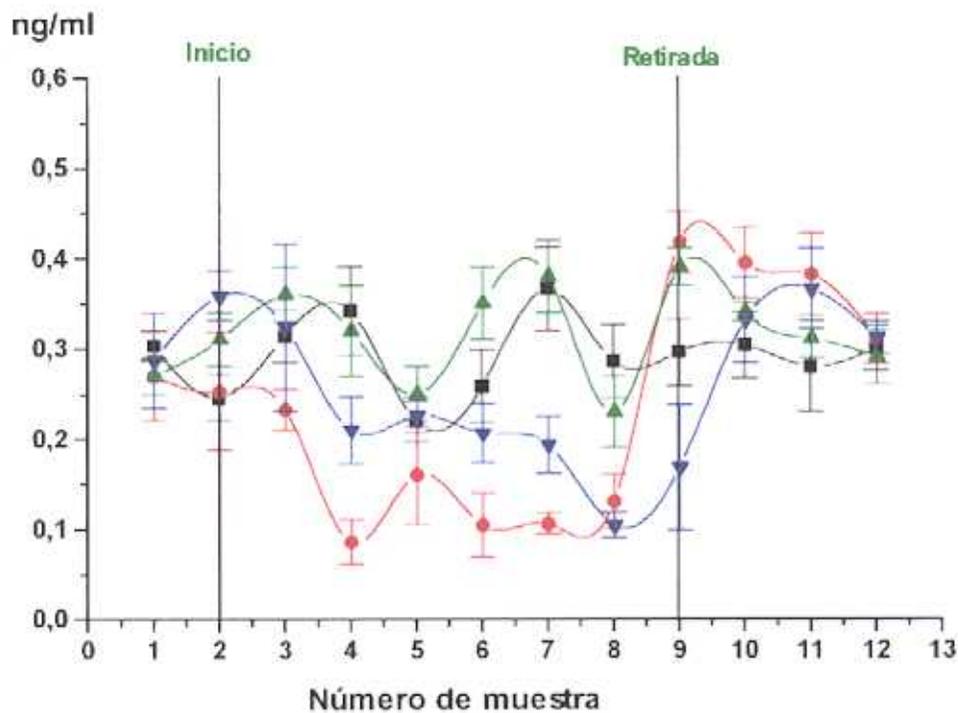
**Gráfica 5 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *testosterona* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ )

**Histograma 5.-**

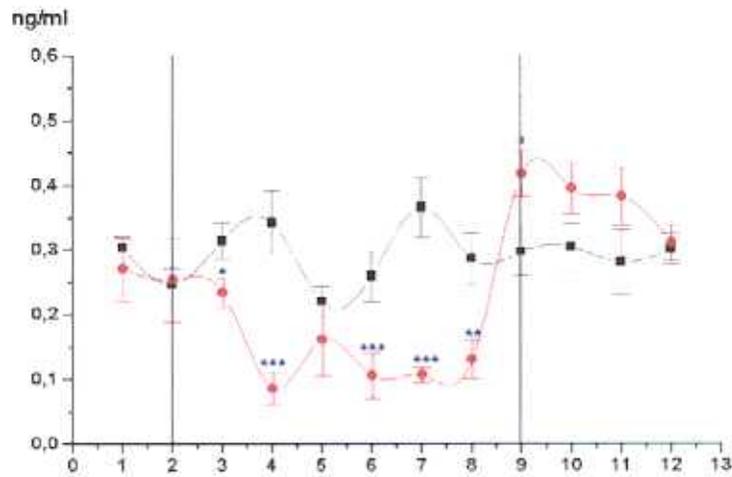
Comparación entre las concentraciones séricas de *testosterona* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



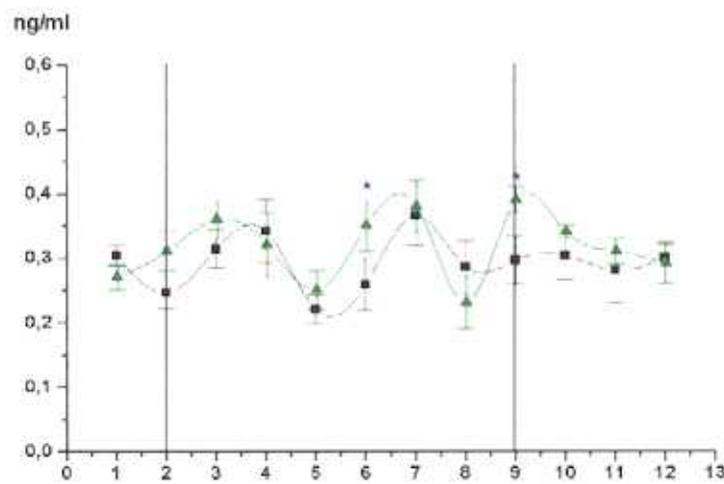
**Gráfica 6.-** Concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 6.-** Concentraciones de  $17\beta$ -estradiol sérica (ng/ml).

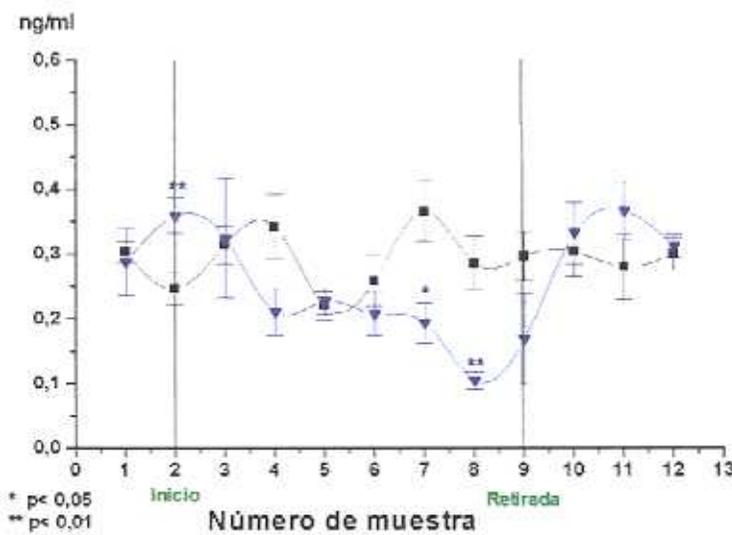
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,05
Toma 2	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,31 ± 0,03	0,36 ± 0,03
Toma 3	0,31 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,32 ± 0,09
Toma 4	0,34 ± 0,05	0,09 ± 0,02	0,32 ± 0,05	0,21 ± 0,04
Toma 5	0,22 ± 0,02	0,16 ± 0,06	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,02
Toma 6	0,26 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,21 ± 0,03
Toma 7	0,37 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,38 ± 0,04	0,19 ± 0,03
Toma 8	0,29 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,10 ± 0,01
Toma 9	0,30 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,17 ± 0,07
Toma 10	0,30 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,05
Toma 11	0,28 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,31 ± 0,02	0,37 ± 0,04
Toma 12	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,31 ± 0,02



a



b

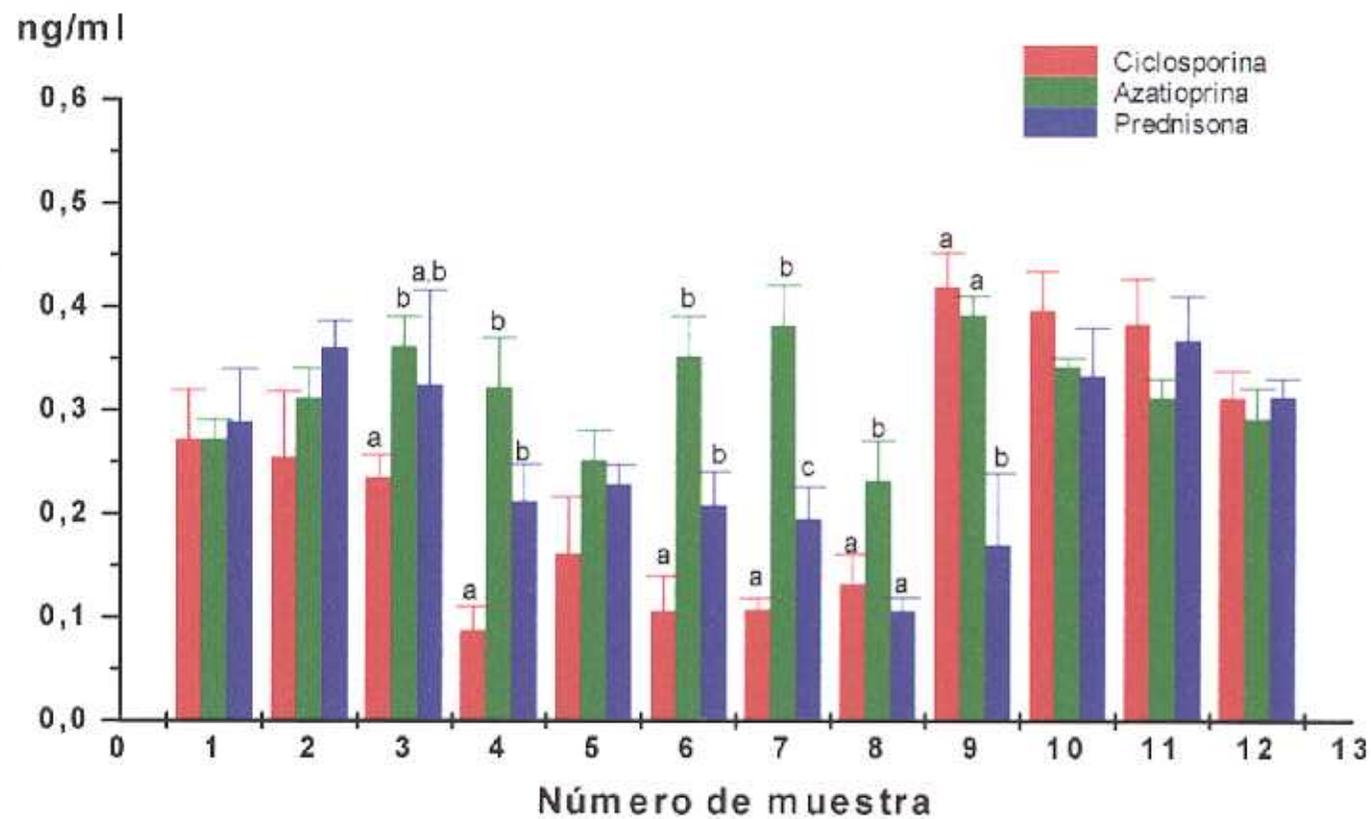


c

\* p < 0,05  
\*\* p < 0,01

Inicio Retirada  
Número de muestra

**Gráfica 6 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *17β-estradiol* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 6.-**

Comparación entre las concentraciones séricas de *17β-estradiol* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

## V. CONCENTRACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: PERFIL BIOQUÍMICO

### 1.- Pruebas de Funcionalidad Hepática

#### 1.1.- Pruebas Basadas en la Actividad Enzimática:

En la *Gráfica 7 y Tabla 7*, se muestran los niveles séricos de ASAT (media  $\pm$  ESM), expresado en U/l, de todos los grupos.

En la *Gráfica 7a*, expresa, diversas fluctuaciones en los grupos control y tratado. En la fase experimental se observa un incremento en las concentraciones de ASAT del grupo II, tratado con ciclosporina, siendo estadísticamente significativa en las tomas nº 4 y 6 ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, tanto al inicio del tratamiento como en el periodo de retirada, los niveles de ASAT del grupo II, se encuentran por debajo del grupo control, encontrándose diferencias estadísticas nº 2 y 3 ( $p < 0,05$ ) y en las tomas nº 9 ( $p < 0,01$ ) y 10 ( $p < 0,001$ ).

La *Gráfica 7b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina; aunque, aparecen diferencias estadísticas en las tomas nº 2 ( $p < 0,01$ ) y en la fase final del tratamiento, tomas nº 8 ( $p < 0,05$ ) con un incremento en los valores de ASAT del grupo tratado con azatioprina. Sin embargo, en el periodo de retirada, los valores de ASAT se vuelven a incrementar siendo de significación estadística en las tomas de muestra nº 10 y 11 ( $p < 0,05$ ).

En la *Gráfica 7c*, donde se observan los valores del grupo de animales tratados con prednisona comparándolos con los controles. Los estudios estadísticos indican que el grupo tratado mantiene valores superiores a los controles con diferencias estadísticas en las tomas nº 5 ( $p < 0,05$ ), 6 ( $p < 0,01$ ), 7, y 8 ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, la muestra nº 2 tiene unos valores de la actividad de la enzima, inferiores a los del grupo control ( $p < 0,01$ ).

El *Histograma 7*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas en varios momentos de la experimentación fundamentalmente por

la disminución de los niveles de ASAT del grupo tratado con ciclosporina.

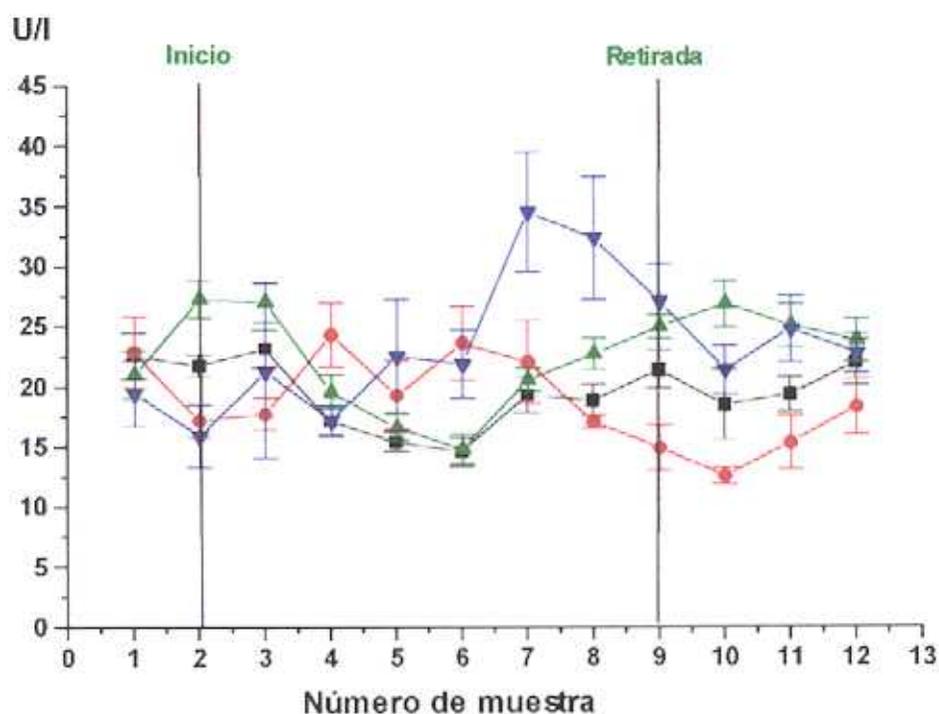
La *Gráfica 8* y la *Tabla 8* ilustran los niveles séricos de ALAT, las concentraciones (media  $\pm$  ESM) se expresan en U/l.

En la *Gráfica 8a*, se aprecia un incremento en los valores de ALAT del grupo II (tratado con ciclosporina) durante la fase experimental, sin embargo los resultados del análisis estadístico, revelan diferencias en las tomas n° 6 y 9 con una  $p < 0,05$ .

La *Gráfica 8b*, expresa los resultados obtenidos en las determinaciones de ALAT de los grupos control y tratado con azatioprina, indicando, al igual que en la gráfica anterior un ligero incremento en los valores de los animales tratados, siendo de valor estadístico en las tomas n° 3 ( $p < 0,05$ ) y 9 ( $p < 0,01$ ).

En la *Gráfica 8c*, Los valores del grupo de animales tratados con prednisona se incrementan, fundamentalmente en la segunda parte de la fase experimental, siendo de significación estadística las tomas n° 7 y 8 ( $p < 0,05$ ). En la fase de retirada las concentraciones de ambos grupos se equipararon.

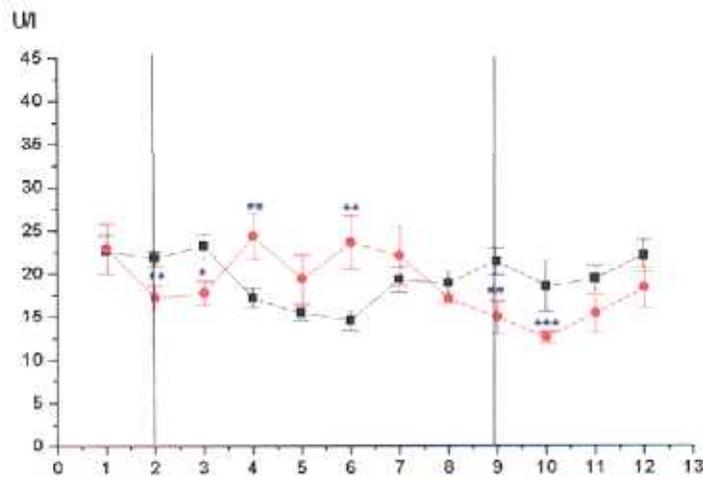
El *Histograma 8*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente entre las tomas n° 3 y 6 de la fase experimental, indicando grandes diferencias entre los distintos tratamientos.



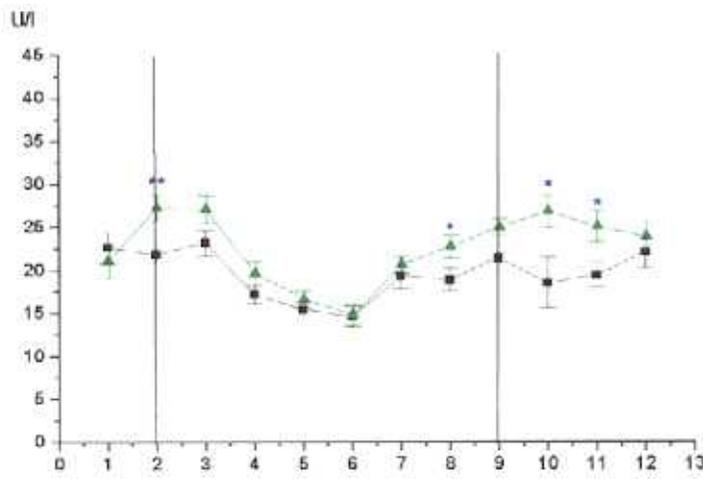
**Gráfica 7.-** Concentraciones séricas de *AST* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 7.-** Concentraciones de *AST* sérica (ng/ml)

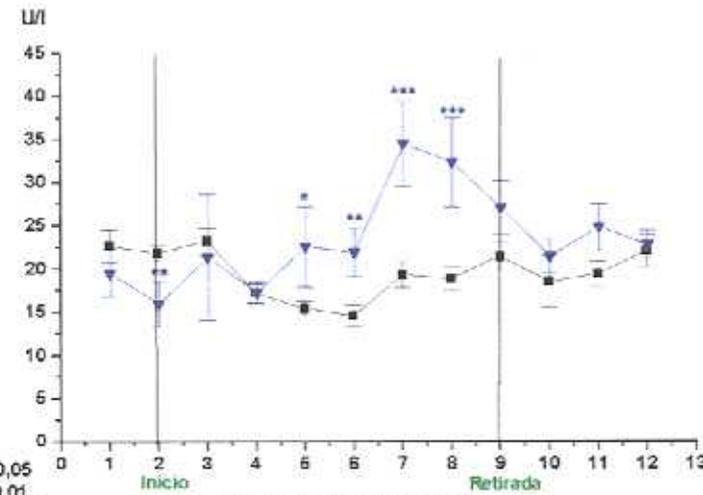
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	22,62 ± 1,88	22,86 ± 2,93	21,00 ± 1,99	19,43 ± 2,72
Toma 2	21,77 ± 0,89	17,14 ± 1,40	27,22 ± 1,56	15,86 ± 2,63
Toma 3	23,15 ± 1,52	17,71 ± 1,36	27,00 ± 1,69	21,29 ± 7,27
Toma 4	17,15 ± 1,10	24,29 ± 2,65	19,56 ± 1,43	17,14 ± 1,30
Toma 5	15,38 ± 0,84	19,29 ± 2,87	16,56 ± 1,00	22,50 ± 4,67
Toma 6	14,54 ± 1,21	23,57 ± 3,05	14,78 ± 1,23	21,83 ± 2,82
Toma 7	19,31 ± 1,48	22,00 ± 3,44	20,56 ± 0,96	34,43 ± 4,98
Toma 8	18,85 ± 1,34	17,00 ± 0,54	22,67 ± 1,32	32,25 ± 5,14
Toma 9	21,38 ± 1,54	14,86 ± 1,90	24,89 ± 1,01	27,00 ± 3,14
Toma 10	18,47 ± 2,96	12,50 ± 0,67	26,75 ± 1,92	21,33 ± 1,98
Toma 11	19,35 ± 1,43	15,29 ± 2,26	24,97 ± 1,80	24,71 ± 2,76
Toma 12	22,97 ± 1,87	18,29 ± 2,31	23,76 ± 1,78	22,71 ± 1,60



a



b

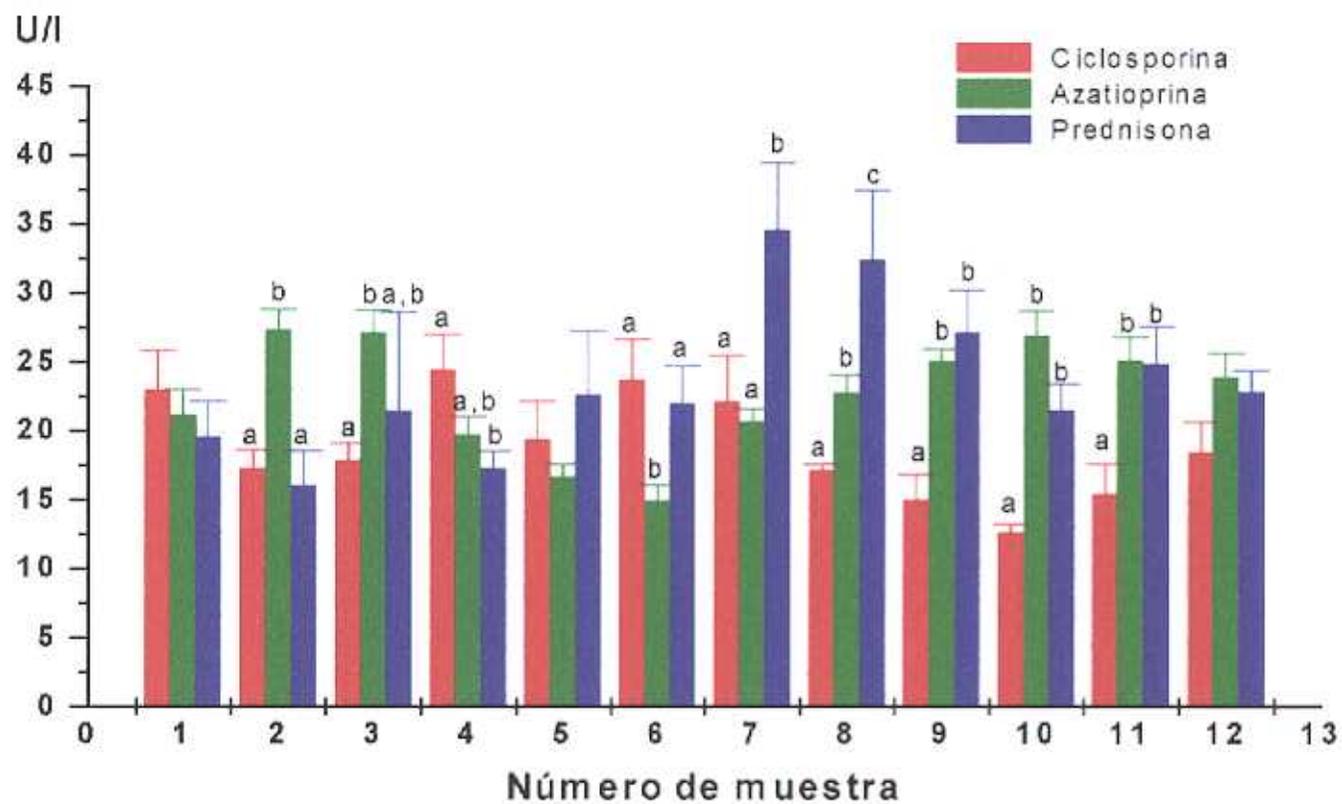


c

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,001$

Número de muestra

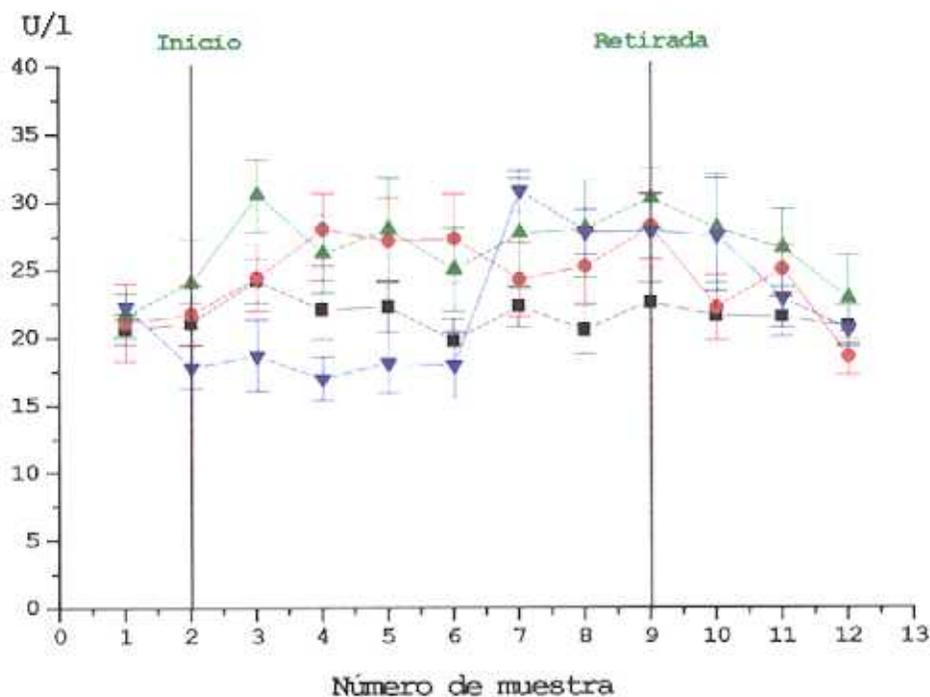
Gráfica 7 (a, b y c).- Comparación de las concentraciones séricas de AST del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 7.-**

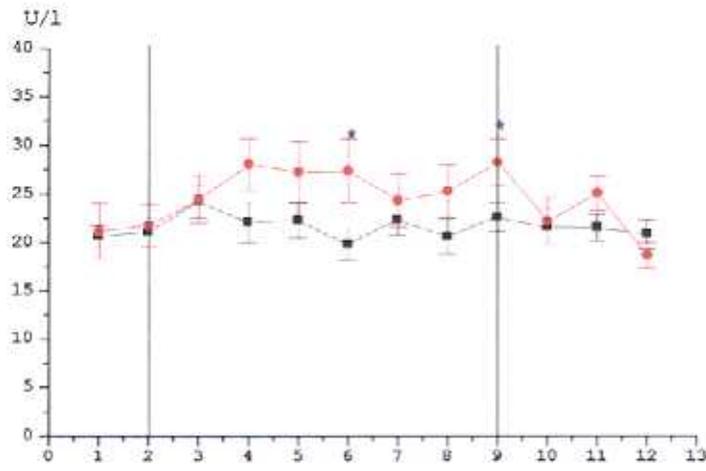
Comparación entre las concentraciones séricas de *AST* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



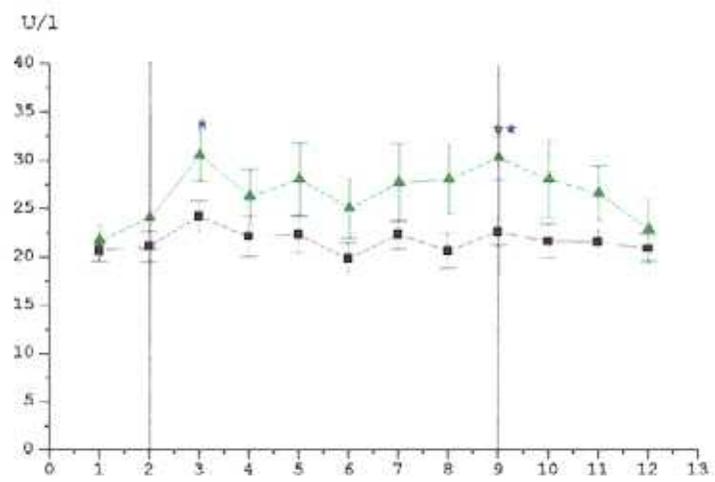
**Gráfica 8.-** Concentraciones séricas de *ALT* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 8.-** Concentraciones de *ALT* sérica (ng/ml)

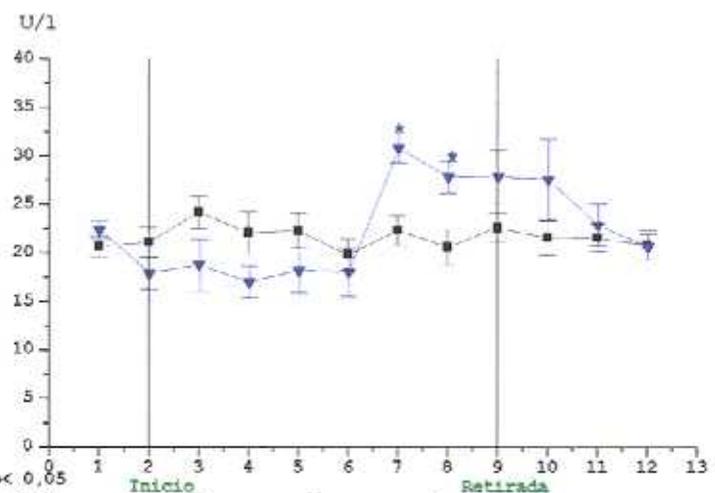
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	20,63 ± 1,11	21,14 ± 2,83	21,67 ± 1,63	22,29 ± 0,92
Toma 2	21,10 ± 1,55	21,71 ± 2,17	24,00 ± 3,27	17,86 ± 1,61
Toma 3	24,20 ± 1,62	24,43 ± 2,46	30,50 ± 2,69	18,71 ± 2,67
Toma 4	22,10 ± 2,14	28,00 ± 2,66	26,20 ± 2,89	17,00 ± 1,62
Toma 5	22,30 ± 1,82	27,14 ± 3,16	28,00 ± 3,74	18,17 ± 2,27
Toma 6	19,80 ± 1,62	27,29 ± 3,28	25,00 ± 3,08	18,00 ± 2,46
Toma 7	22,30 ± 1,51	24,29 ± 2,72	27,67 ± 4,06	30,80 ± 1,50
Toma 8	20,60 ± 1,81	25,20 ± 2,65	28,00 ± 3,61	27,75 ± 1,65
Toma 9	22,60 ± 1,43	28,17 ± 2,40	30,20 ± 2,22	27,80 ± 2,71
Toma 10	21,60 ± 1,81	22,17 ± 2,39	28,00 ± 4,00	27,50 ± 4,19
Toma 11	21,50 ± 1,40	25,00 ± 1,76	26,54 ± 2,89	22,83 ± 2,15
Toma 12	20,80 ± 1,50	18,57 ± 1,34	22,78 ± 3,25	20,57 ± 1,31



a



b



c

\* p < 0,05  
 \*\* p < 0,01  
 \*\*\* p < 0,001

Inicio Retirada

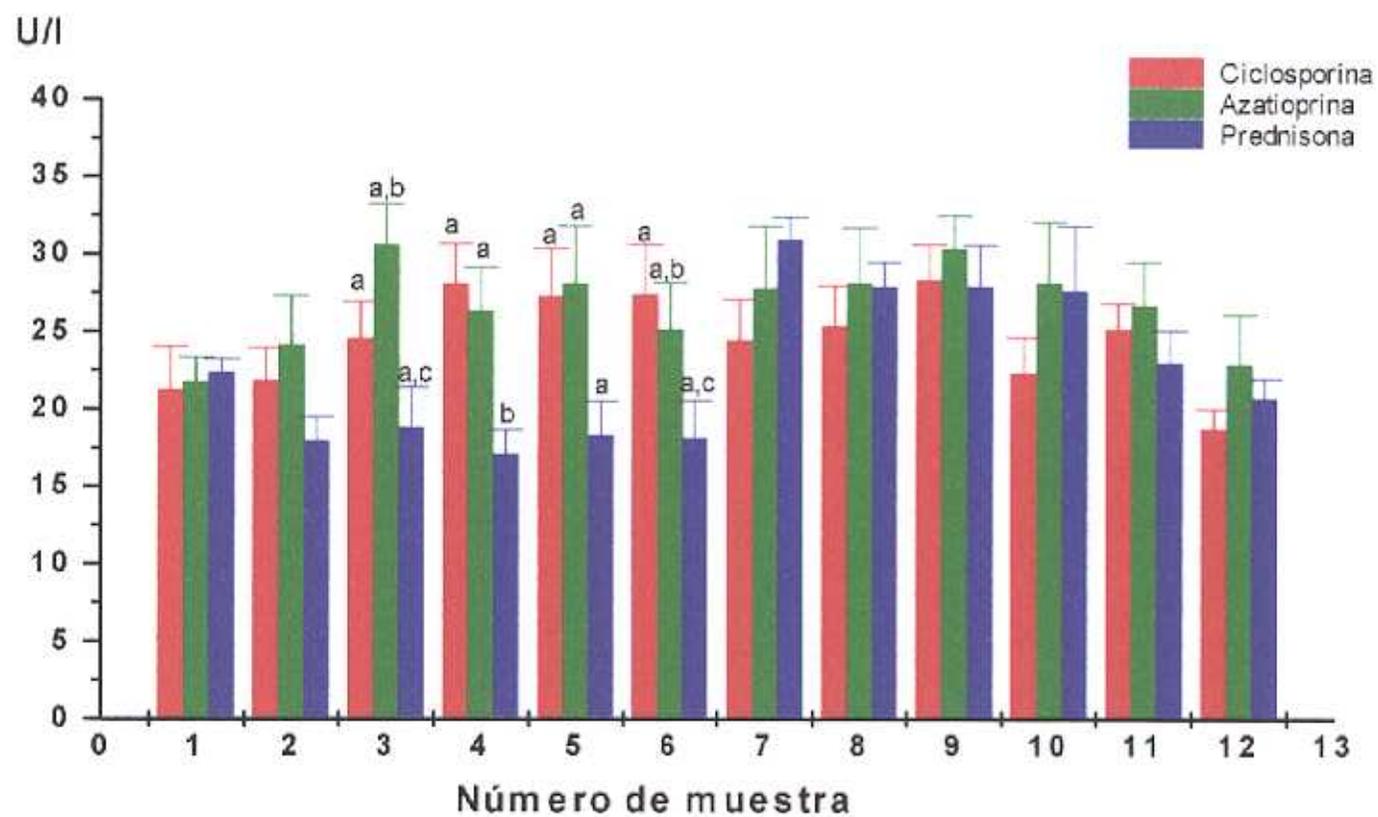
Número de muestra

Gráfica 8

(a, b y c)-

comparación

C de las concentraciones séricas de ALT del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



**Histograma 8.-**

Comparación entre las concentraciones séricas de *ALT* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

## 1.2.- Pruebas Basadas en Funciones Bioquímicas Específicas

### 1.2.1.- Pruebas del Metabolismo de Proteínas: Proteínas Totales

En la *Gráfica 9* y *Tabla 9*, se muestran los niveles séricos de proteínas totales, como media  $\pm$  ESM, expresado en g/dl, de todos los grupos experimentales.

En la *Gráfica 9a*, se representan las concentraciones séricas de proteínas totales de los grupos control y tratado con ciclosporina. La estadística realizada indica diferencias en las tomas nº 8 ( $p < 0,01$ ), 9, 10, y 11 ( $p < 0,001$ ) con un incremento de los valores del grupo tratado.

La *Gráfica 9b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina existiendo una diferencia estadística en la toma nº 9 por disminución de los valores del grupo tratado.

En la *Gráfica 9c*, las concentraciones del grupo IV, muestran un patrón semejante al tratado con ciclosporina. El estudio estadístico de diferencia de medias indica un incremento, estadísticamente significativo, en los valores del grupo tratado, desde la toma nº 5 ( $p < 0,05$ ), 6 ( $p < 0,01$ ) y desde la toma nº 7 hasta la 11 con una significación de  $p < 0,001$ .

El *Histograma 9*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas fundamentalmente desde la toma nº 5 hasta la nº 12.

### 1.2.2.- Pruebas del Metabolismo de Lípidos: Colesterol y Triglicéridos.

La *Gráfica 10* y la *Tabla 10* reflejan las medias  $\pm$  ESM de las determinaciones séricas de colesterol total (mg/dl) en los grupos del estudio.

En la *Gráfica 10a*, se representa las concentraciones del grupo I junto con las del grupo II. Ambos grupos siguen una trayectoria semejante, observándose, en la fase de retirada del

tratamiento, diferencias estadísticas, con un incremento en los valores del grupo tratado con ciclosporina en las tomas nº 9, 10 y 11 ( $p < 0,01$ ).

La *Gráfica 10b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina no teniendo ninguna diferencia estadística.

En la *Gráfica 10c*, Los valores de colesterol del grupo de animales tratados con prednisona, comparándolos con los controles y tras el estudio estadístico de diferencia de medias, hay que indicar que las concentraciones determinadas en el grupo IV son superiores durante toda la experimentación, excepto en la primera y última toma, en el resto se han determinado diferencias en las tomas nº 2 ( $p < 0,05$ ); 3 y 4 ( $p < 0,01$ ); 5 a 11 ( $p < 0,001$ ).

El *Histograma 10*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas en casi todas las tomas fundamentalmente por los incrementos producidos en las concentraciones de colesterol del grupo tratado con prednisona..

La *Gráfica 11* y la *Tabla 11* muestran los niveles (media  $\pm$  ESM) de triglicéridos expresados en mg/dl de los grupos I, II, III y IV.

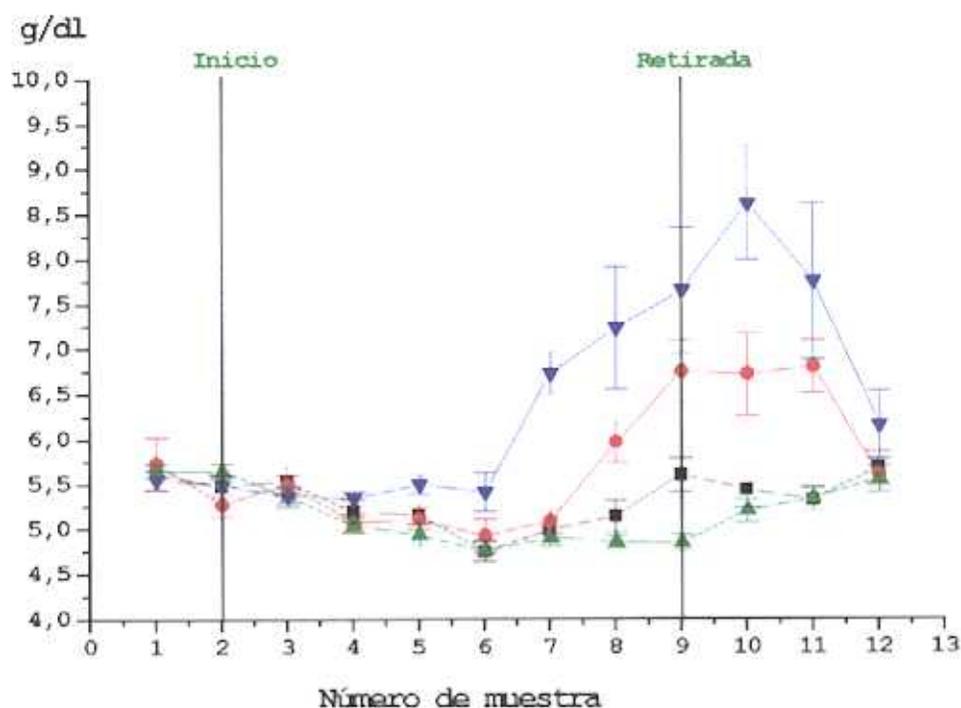
En la *Gráfica 11a*, donde se representan las concentraciones de triglicéridos de los grupos control y tratado con ciclosporina, se observa un incremento en los valores del grupo tratado durante toda la fase experimental y aún en la fase de retirada hasta la toma nº 11. El análisis estadístico de diferencia de medias, revela diferencias estadísticas entre las tomas nº 3 y 11 de la experimentación.

La *Gráfica 11b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina no teniendo ninguna diferencia estadística.

En la *Gráfica 11c*, Los valores del grupo de animales tratados con prednisona muestran un perfil semejante a los tratados con ciclosporina, apareciendo diferencias estadísticas desde la

toma n° 3 hasta la n° 11.

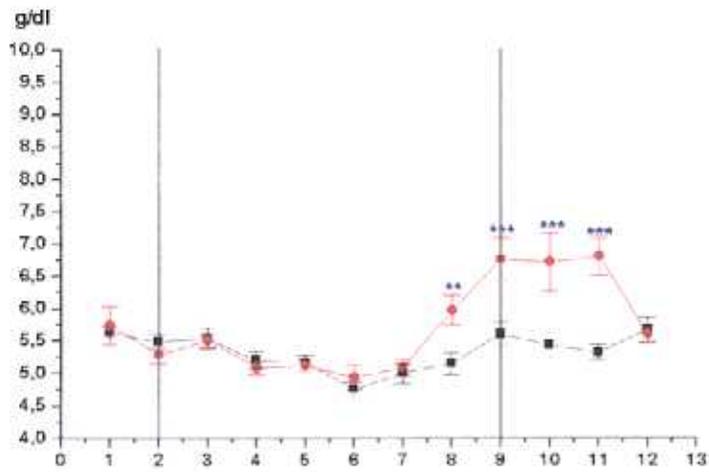
El *Histograma 11*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas durante casi todas las tomas debido fundamentalmente a los incrementos producidos en las concentraciones de triglicéridos de los grupos tratados con ciclosporina y prednisona.



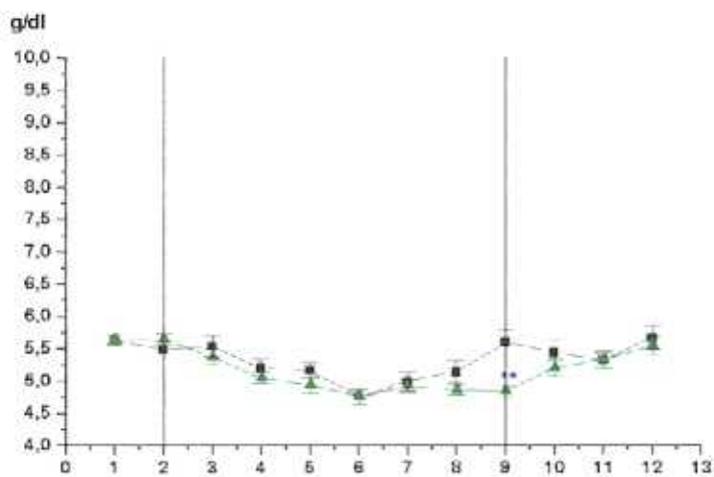
**Gráfica 9.-** Concentraciones séricas de *proteínas totales* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 9.-** Concentraciones de proteínas totales sérica (ng/ml)

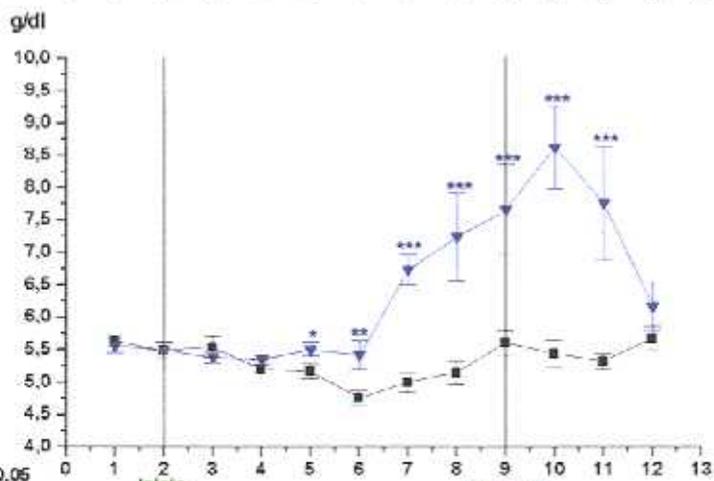
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	5,63 ± 0,09	5,73 ± 0,29	5,65 ± 0,07	5,55 ± 0,10
Toma 2	5,48 ± 0,12	5,27 ± 0,13	5,64 ± 0,09	5,49 ± 0,13
Toma 3	5,54 ± 0,16	5,50 ± 0,10	5,37 ± 0,12	5,37 ± 0,09
Toma 4	5,20 ± 0,13	5,07 ± 0,10	5,04 ± 0,09	5,34 ± 0,08
Toma 5	5,16 ± 0,12	5,11 ± 0,12	4,93 ± 0,13	5,50 ± 0,11
Toma 6	4,75 ± 0,11	4,93 ± 0,19	4,76 ± 0,12	5,41 ± 0,22
Toma 7	4,99 ± 0,15	5,09 ± 0,14	4,91 ± 0,10	6,73 ± 0,23
Toma 8	5,15 ± 0,17	5,97 ± 0,23	4,86 ± 0,07	7,23 ± 0,68
Toma 9	5,60 ± 0,19	6,75 ± 0,34	4,84 ± 0,09	7,65 ± 0,70
Toma 10	5,44 ± 0,20	6,72 ± 0,45	5,20 ± 0,13	8,62 ± 0,63
Toma 11	5,32 ± 0,12	6,80 ± 0,30	5,33 ± 0,13	7,75 ± 0,87
Toma 12	5,67 ± 0,19	5,60 ± 0,15	5,55 ± 0,15	6,16 ± 0,38



a



b

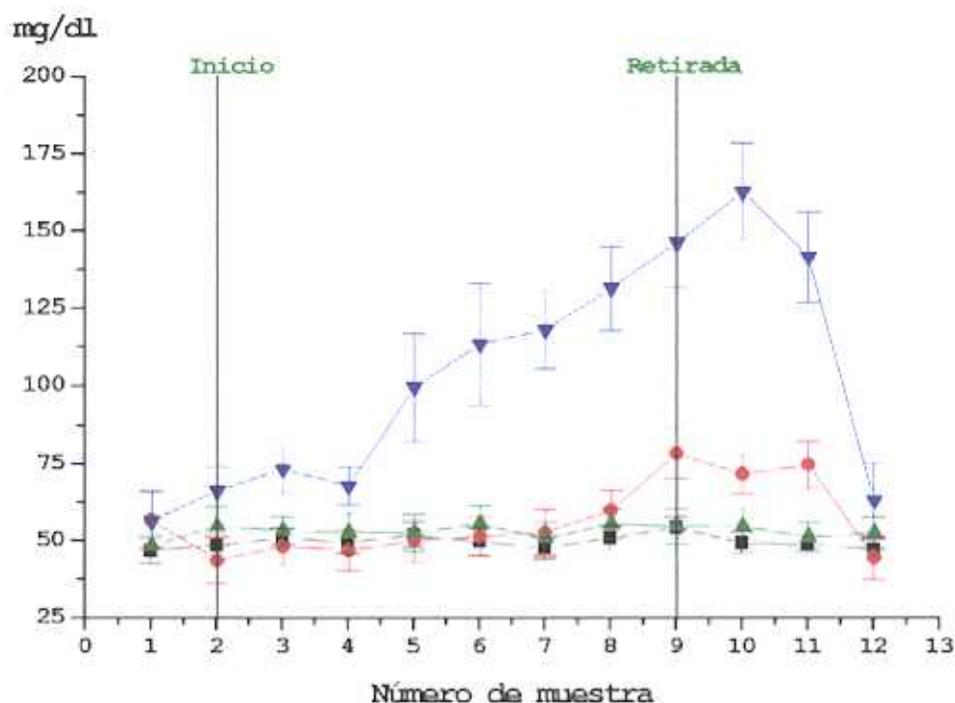


c

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,001$

Número de muestra

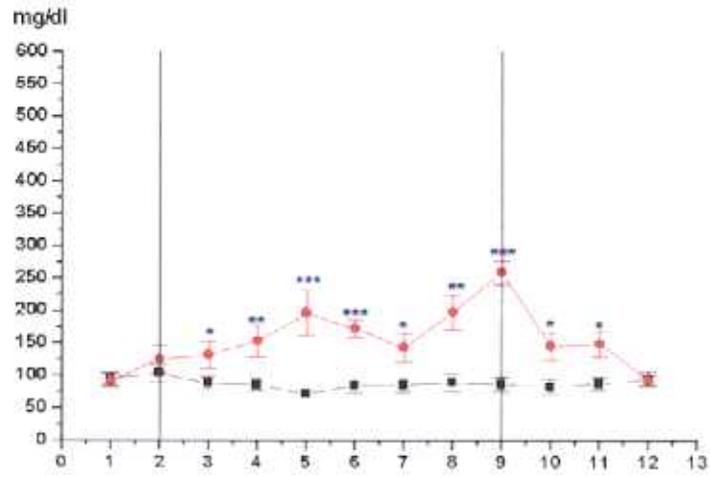
**Gráfica 9 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *proteínas totales* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



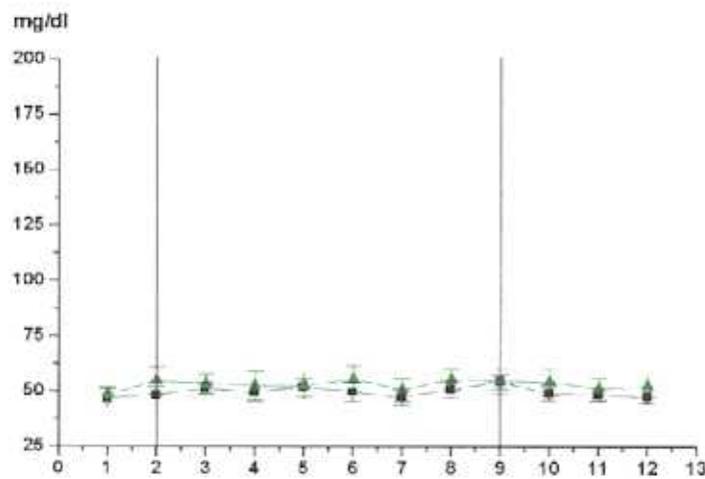
**Gráfica 10.-** Concentraciones séricas de *colesterol* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 10.-** Concentraciones de *colesterol* sérica (ng/ml)

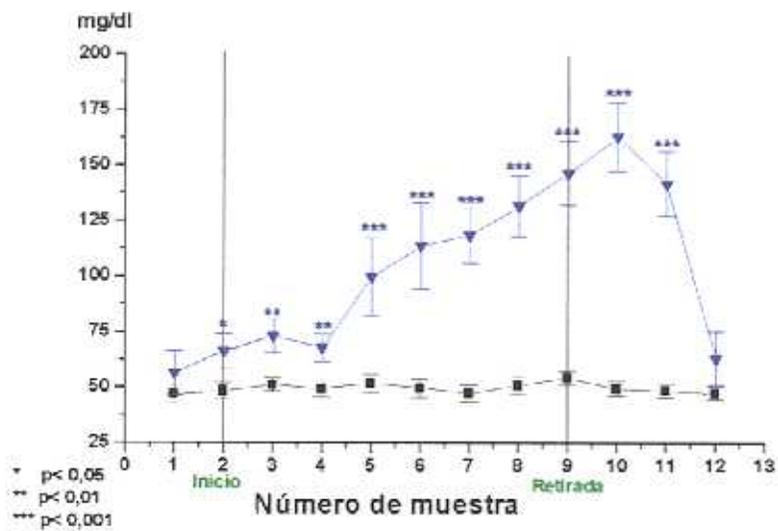
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	46,90 ± 4,26	56,50 ± 8,83	48,22 ± 3,77	56,29 ± 9,62
Toma 2	48,36 ± 3,84	43,50 ± 7,54	54,56 ± 6,19	66,00 ± 7,95
Toma 3	51,15 ± 2,87	48,17 ± 6,08	53,22 ± 4,36	73,00 ± 7,56
Toma 4	49,46 ± 3,93	46,83 ± 6,57	52,56 ± 6,64	67,71 ± 6,30
Toma 5	51,92 ± 4,11	50,00 ± 6,98	52,44 ± 6,07	99,50 ± 17,44
Toma 6	49,69 ± 4,26	51,33 ± 6,63	55,33 ± 5,92	113,43 ± 19,51
Toma 7	47,42 ± 3,66	52,50 ± 7,56	50,78 ± 5,1	118,17 ± 12,63
Toma 8	50,92 ± 3,98	59,68 ± 6,57	55,33 ± 4,78	131,46 ± 13,57
Toma 9	54,31 ± 3,39	78,33 ± 8,33	54,56 ± 5,74	146,17 ± 14,32
Toma 10	49,31 ± 3,38	71,50 ± 6,35	54,38 ± 6,08	162,67 ± 15,62
Toma 11	48,57 ± 3,12	74,50 ± 7,71	51,24 ± 4,67	141,50 ± 14,64
Toma 12	47,35 ± 2,90	44,43 ± 7,17	52,46 ± 4,98	63,00 ± 12,19



**a**



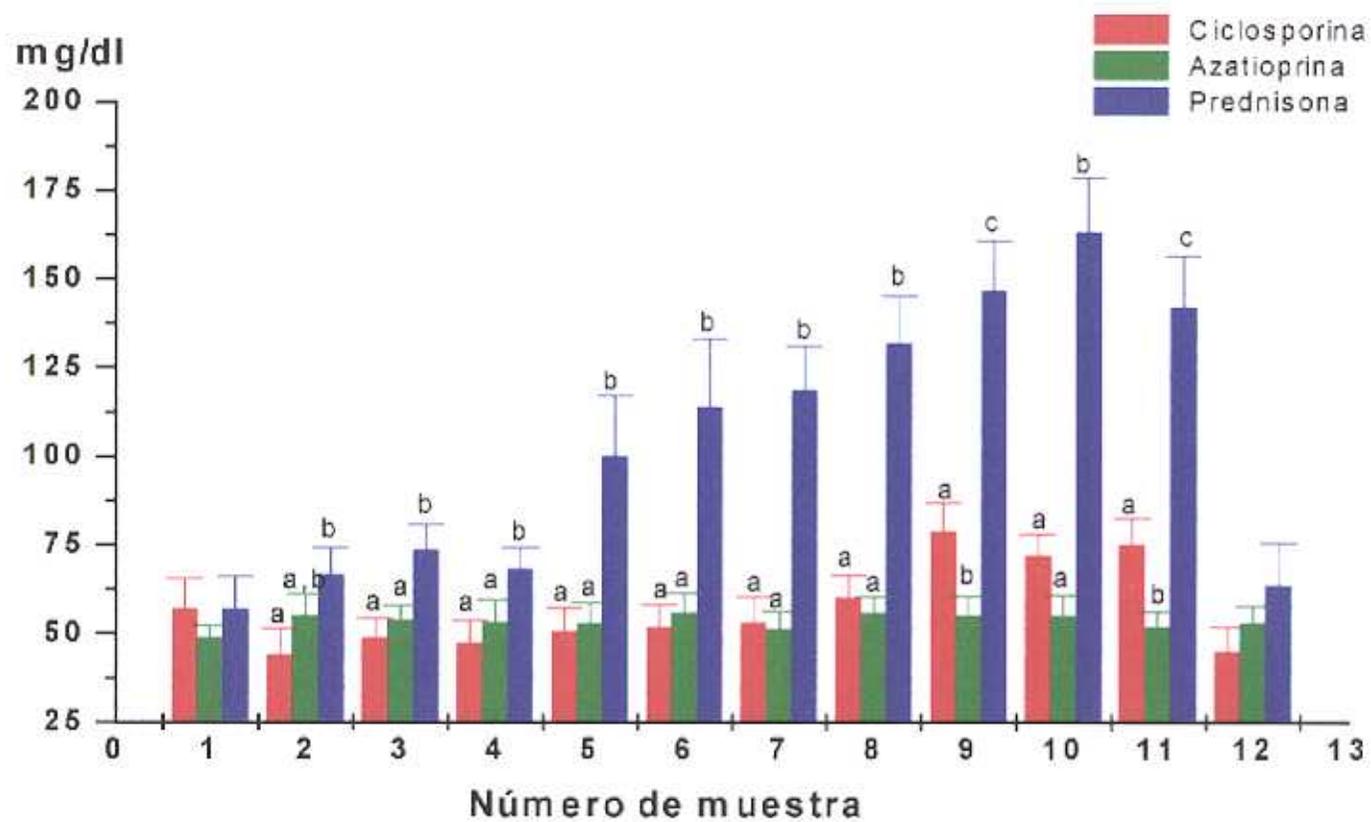
**b**



**c**

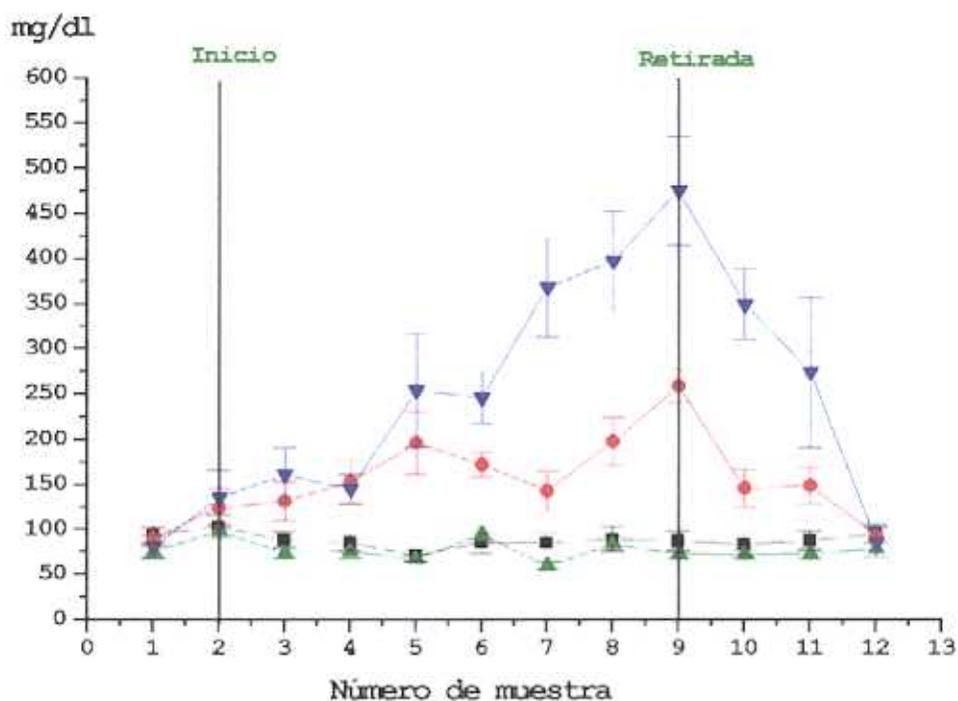
**Gráfica 10 (a, b y c).-**

Comparación de las concentraciones séricas de *colesterol* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

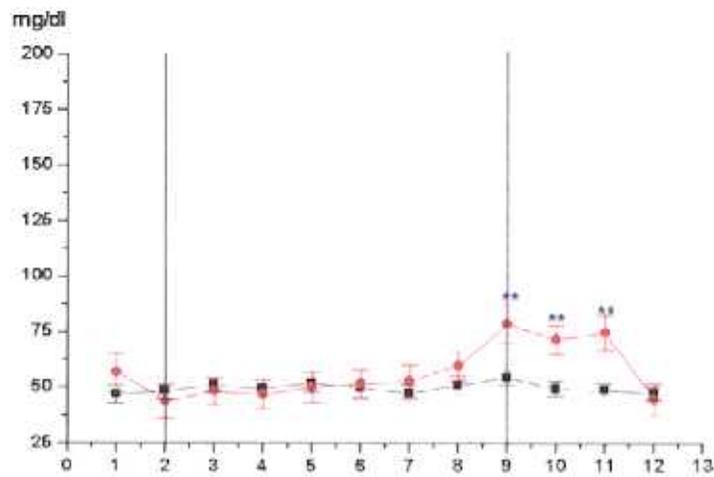
**Histograma 10.-** Comparación entre las concentraciones séricas de *colesterol* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



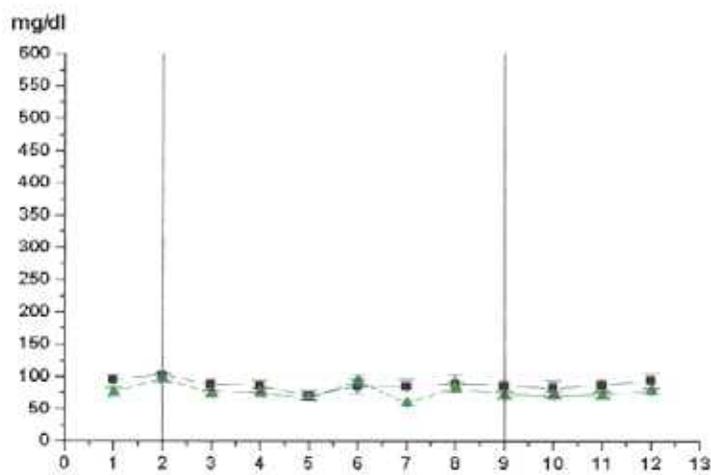
**Gráfica 11.-** Concentraciones séricas de *triglicéridos* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 11.-** Concentraciones de *triglicéridos* sérica (ng/ml)

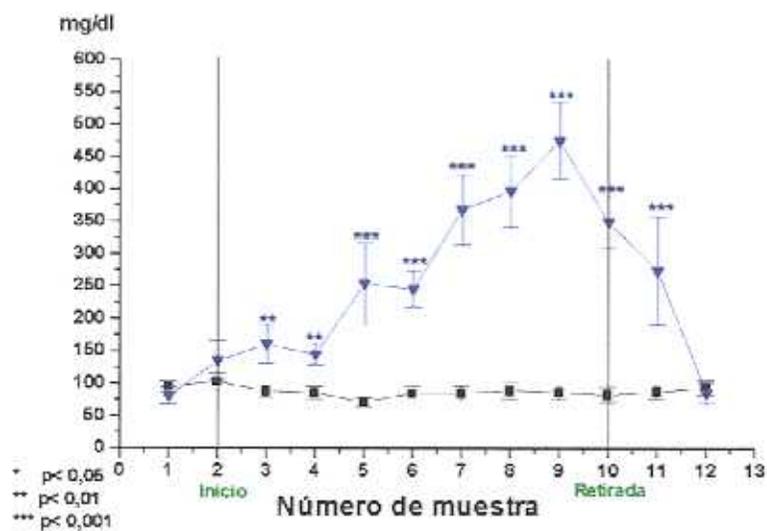
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	94,70 ± 9,27	90,57 ± 10,48	74,63 ± 7,97	80,43 ± 12,36
Toma 2	103,08 ± 13,03	123,43 ± 21,54	97,89 ± 7,19	135,00 ± 30,17
Toma 3	88,15 ± 9,64	131,29 ± 21,61	73,89 ± 6,06	160,00 ± 30,50
Toma 4	86,08 ± 9,54	152,29 ± 24,20	75,00 ± 7,41	145,14 ± 15,94
Toma 5	71,62 ± 6,53	196,14 ± 34,95	67,11 ± 4,49	253,83 ± 62,79
Toma 6	84,92 ± 11,30	171,71 ± 13,76	94,00 ± 9,54	245,67 ± 27,89
Toma 7	85,46 ± 10,76	142,86 ± 21,94	59,67 ± 4,13	367,80 ± 54,47
Toma 8	89,42 ± 13,55	197,40 ± 27,02	83,44 ± 8,01	396,57 ± 55,68
Toma 9	87,08 ± 11,32	258,67 ± 18,17	72,56 ± 5,67	475,00 ± 59,94
Toma 10	83,25 ± 11,72	145,17 ± 21,05	71,88 ± 5,33	348,83 ± 38,94
Toma 11	87,56 ± 10,56	148,14 ± 19,77	72,34 ± 5,67	273,67 ± 83,07
Toma 12	94,57 ± 11,23	92,71 ± 6,76	78,45 ± 4,35	85,86 ± 16,61



a

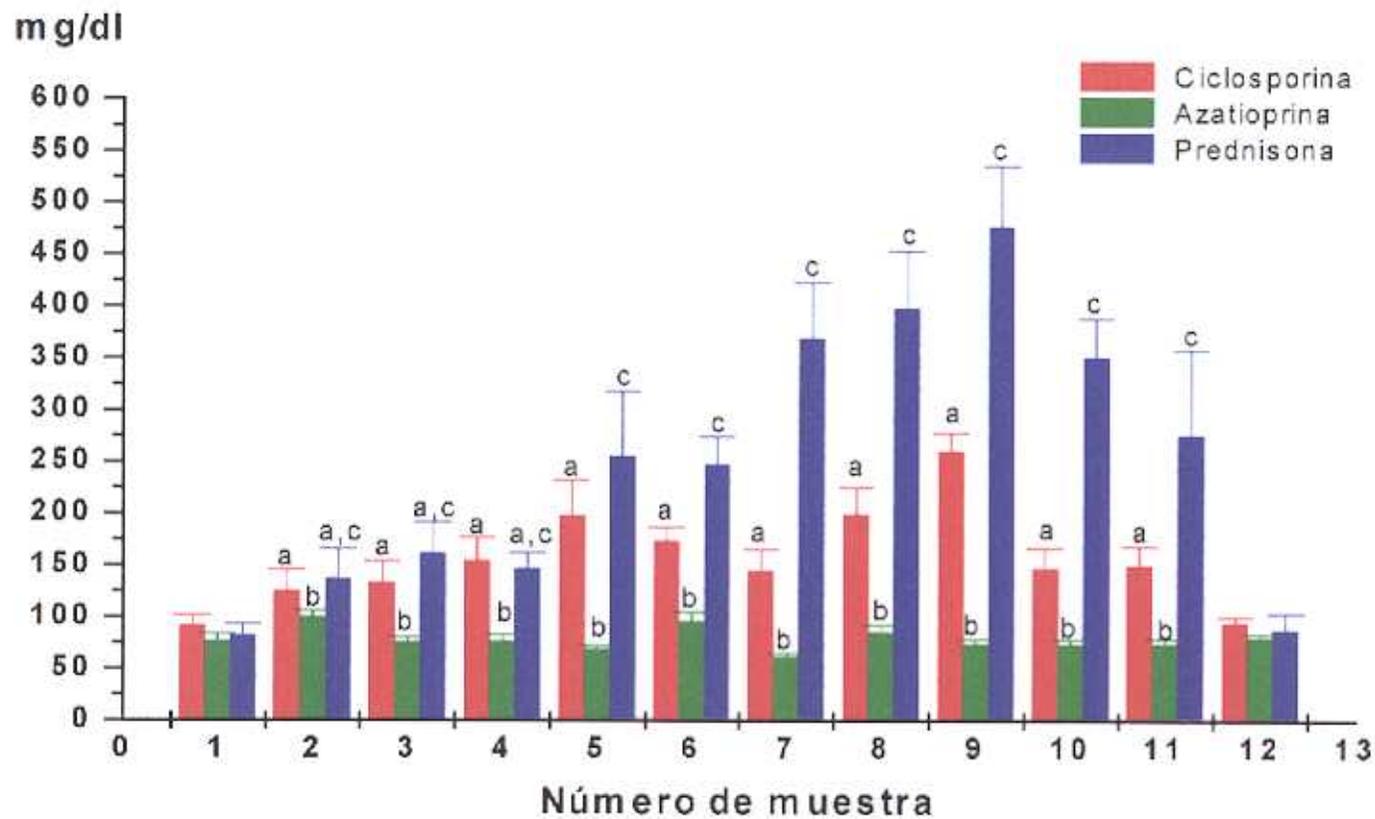


b



c

**Gráfica 11 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *triglicéridos* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 11.-** Comparación entre las concentraciones séricas de *triglicéridos* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

## 2.- Pruebas de Funcionalidad Renal

### 2.1.- Determinación de Nitrógeno no Proteico en Sangre

En la *Gráfica 12* y la *Tabla 12* se representan las concentraciones (media  $\pm$  ESM) encontradas de urea expresadas en mg/dl.

En la *Gráfica 12a*, se encuentran representadas las concentraciones de urea del grupo control comparándolo con el grupo tratado con ciclosporina. Los valores del grupo tratado se encuentra por encima de los controles desde la toma n° 5 hasta la n° 11. El análisis estadístico demuestra diferencias significativas en las muestras n° 8 ( $p < 0,01$ ), 9 ( $p < 0,001$ ), 10 ( $p < 0,01$ ) y 11 ( $p < 0,001$ ).

La *Gráfica 12b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina, existiendo diferencia estadística en la toma n° 3 ( $p < 0,01$ ), por incremento de los valores de urea del grupo III.

En la *Gráfica 12c*, los valores determinados del grupo de animales tratados con prednisona, experimentan un incremento desde la toma n° 3 hasta incluso la fase de retirada, toma n° 11. El estudio estadístico revela una significación en dichas tomas con  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ .

El *Histograma 12*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, muestra diferencias estadísticas en casi todas las tomas, fundamentalmente por un incremento en la concentración plasmática de urea del grupo tratado con prednisona.

En la *Gráfica 13* y *Tabla 13* se encuentra reflejadas las concentraciones (media  $\pm$  ESM) encontradas de creatinina, en mg/dl, de los animales de nuestro estudio.

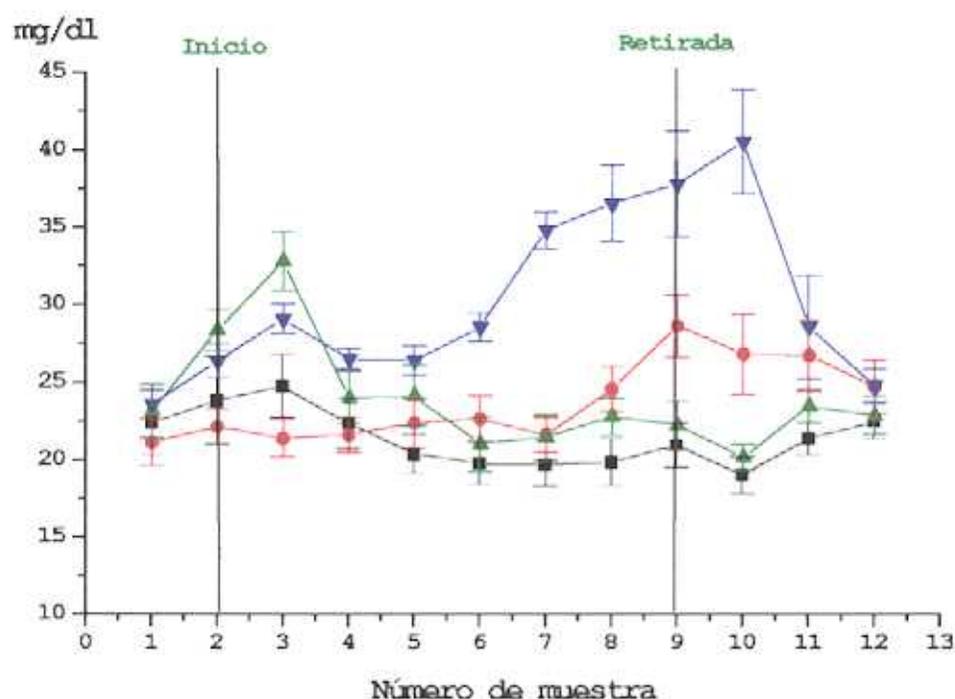
En la *Gráfica 13a*, están representados las concentraciones de los grupos I y II, observándose que ambos muestran un perfil similar aunque en la toma n° 9, se aprecia un

incremento en los valores del grupo tratado con ciclosporina que son estadísticamente significativos.

La *Gráfica 13b*, expresa fluctuaciones semejantes en los grupos control y tratado con azatioprina, aunque no se observa ninguna diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).

En la *Gráfica 13c*, Los valores del grupo de animales tratados con prednisona muestran una trayectoria semejante a los otros grupos de tratamiento. el análisis estadístico reveló diferencias significativas en las tomas nº 8 y 10 con una  $p < 0,05$ .

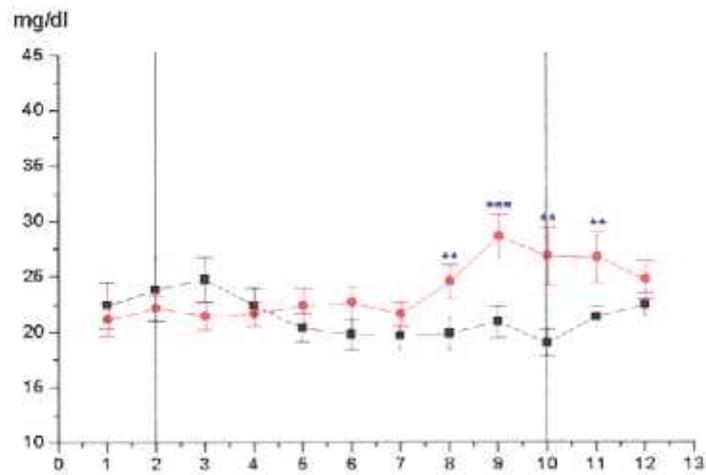
El *Histograma 13*, que compara las concentraciones de los tres grupos de tratamiento, solo muestra diferencias estadísticas fundamentalmente, en las tomas nº 7 y de la 10 a la 11.



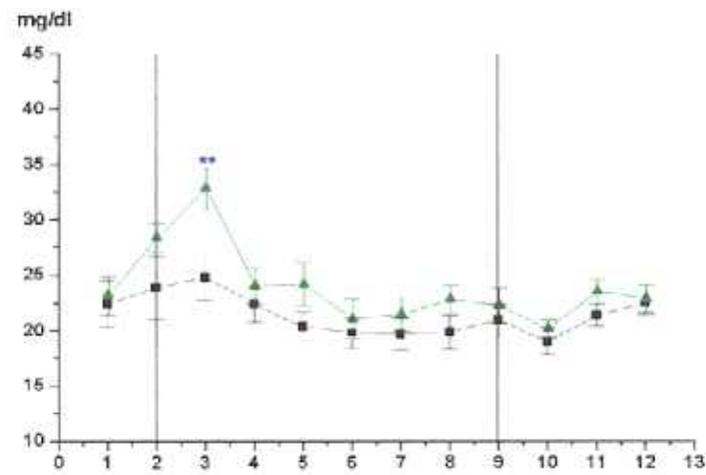
**Gráfica 12.-** Concentraciones séricas de *urea* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 12.-** Concentraciones de *urea* sérica (ng/ml)

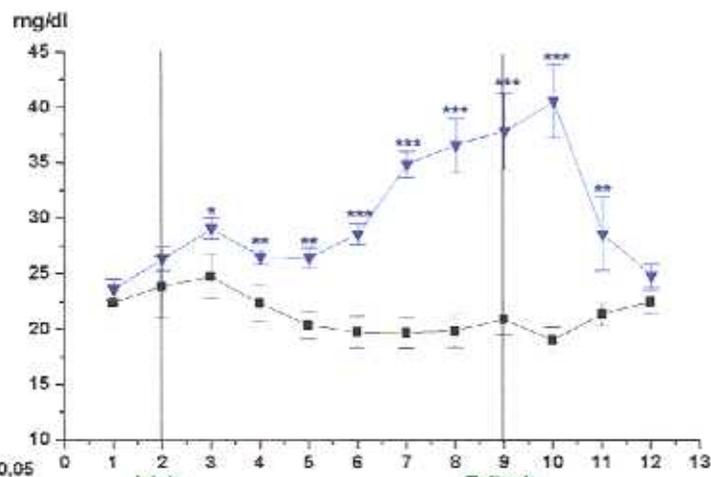
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	22,38 ± 2,09	21,09 ± 1,51	23,11 ± 1,72	23,57 ± 0,94
Toma 2	23,85 ± 2,80	22,11 ± 1,16	28,33 ± 1,32	26,34 ± 1,10
Toma 3	24,77 ± 2,00	21,34 ± 1,21	32,78 ± 1,89	29,06 ± 0,96
Toma 4	22,38 ± 1,66	21,60 ± 1,18	24,00 ± 1,67	26,49 ± 0,64
Toma 5	20,38 ± 1,25	22,37 ± 1,61	24,11 ± 1,95	26,40 ± 0,92
Toma 6	19,77 ± 1,41	22,63 ± 1,51	21,00 ± 1,79	28,54 ± 0,94
Toma 7	19,69 ± 1,39	21,60 ± 1,11	21,44 ± 1,48	34,80 ± 1,20
Toma 8	19,85 ± 1,50	24,57 ± 1,45	22,78 ± 1,22	36,54 ± 2,45
Toma 9	20,92 ± 1,44	28,60 ± 2,02	22,22 ± 1,60	37,78 ± 3,40
Toma 10	19,00 ± 1,20	26,80 ± 2,58	20,13 ± 0,85	40,50 ± 3,33
Toma 11	21,34 ± 1,03	26,70 ± 2,28	23,45 ± 1,10	28,56 ± 3,34
Toma 12	22,45 ± 1,10	24,71 ± 1,70	22,86 ± 1,23	24,78 ± 1,04



a



b

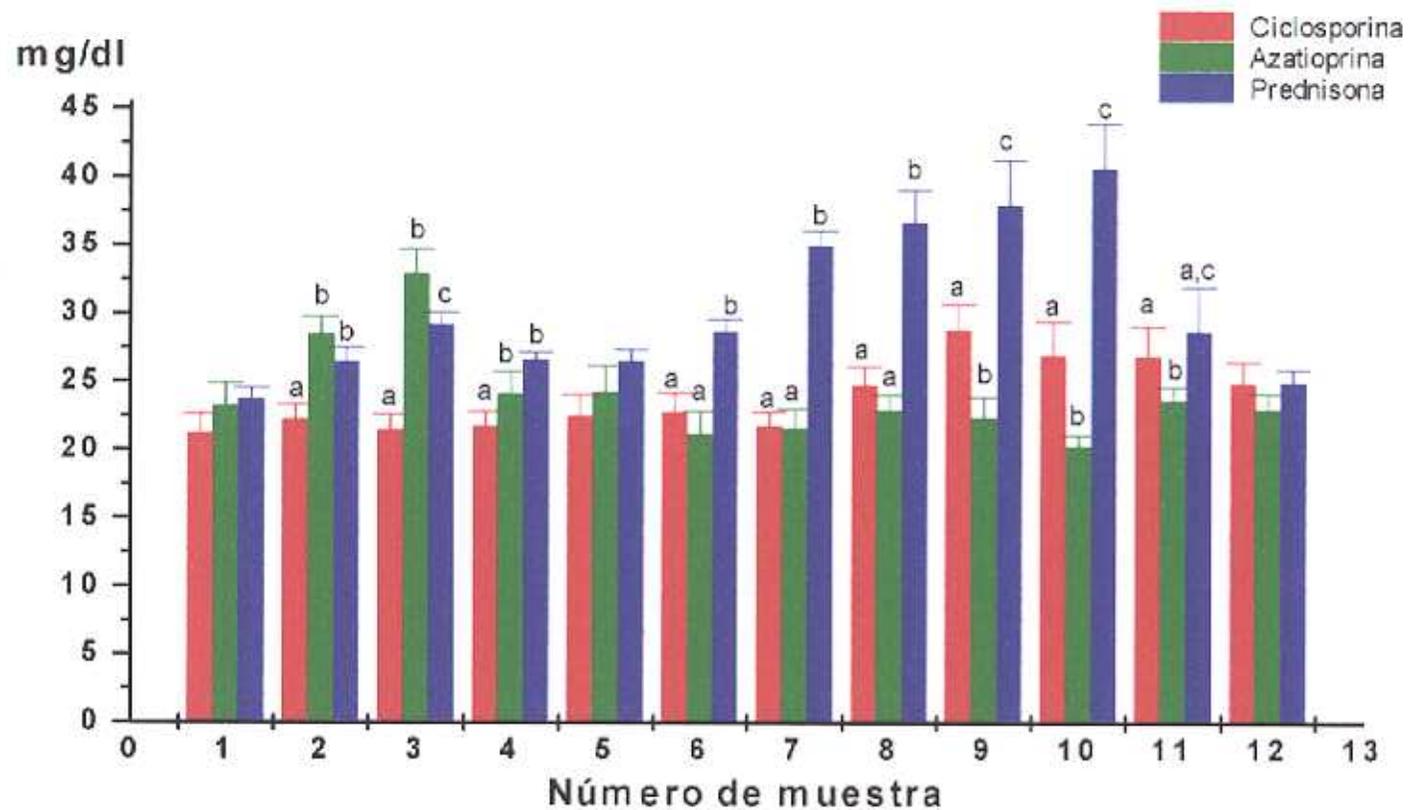


c

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,001$

Número de muestra

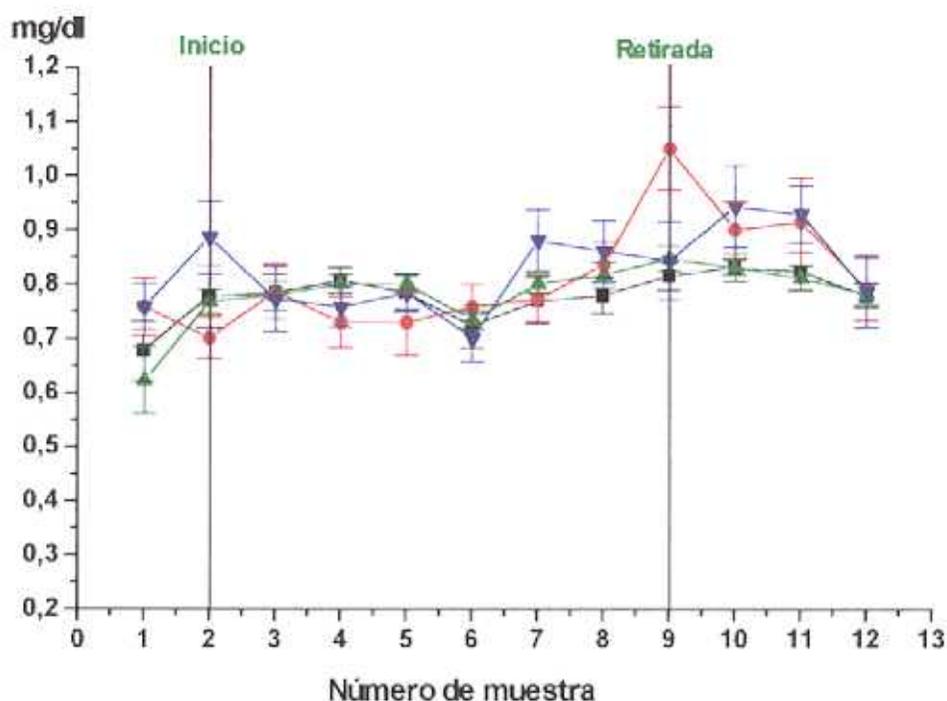
Gráfica 12 (a, b y c).- Comparación de las concentraciones séricas de *urea* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 12.-**

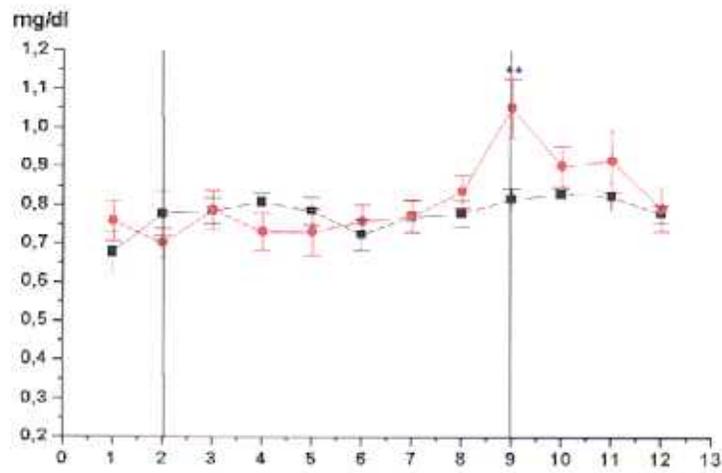
Comparación entre las concentraciones séricas de *urea* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



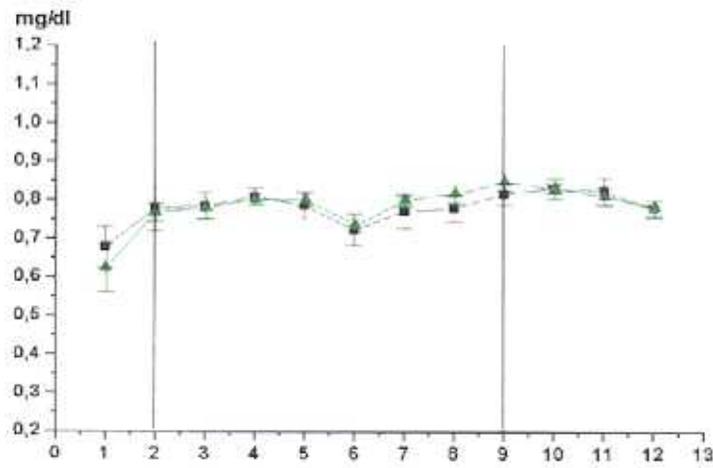
**Gráfica 13.-** Concentraciones séricas de *creatinina* en grupo control (■), ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

**Tabla 13.-** Concentraciones de *creatinina* sérica (ng/ml)

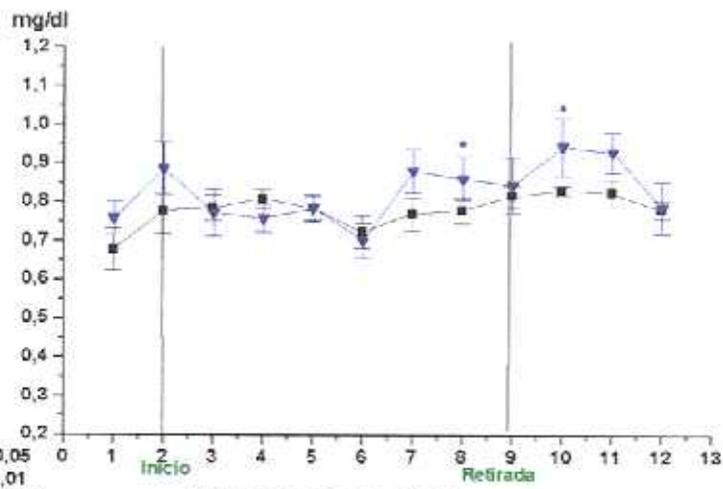
	Control	Ciclosporina	Azatioprina	Prednisona
Toma 1	0,68 ± 0,05	0,76 ± 0,05	0,62 ± 0,06	0,76 ± 0,04
Toma 2	0,78 ± 0,06	0,70 ± 0,04	0,77 ± 0,02	0,89 ± 0,07
Toma 3	0,78 ± 0,03	0,79 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,77 ± 0,06
Toma 4	0,81 ± 0,02	0,73 ± 0,05	0,80 ± 0,02	0,76 ± 0,04
Toma 5	0,78 ± 0,04	0,73 ± 0,06	0,80 ± 0,02	0,78 ± 0,03
Toma 6	0,72 ± 0,04	0,76 ± 0,04	0,73 ± 0,02	0,70 ± 0,04
Toma 7	0,77 ± 0,04	0,77 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,88 ± 0,10
Toma 8	0,78 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,83 ± 0,02	0,86 ± 0,06
Toma 9	0,82 ± 0,03	1,05 ± 0,08	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,07
Toma 10	0,83 ± 0,01	0,90 ± 0,05	0,83 ± 0,03	0,94 ± 0,08
Toma 11	0,82 ± 0,03	0,91 ± 0,08	0,81 ± 0,02	0,93 ± 0,05
Toma 12	0,78 ± 0,02	0,79 ± 0,06	0,78 ± 0,02	0,79 ± 0,07



**a**



**b**

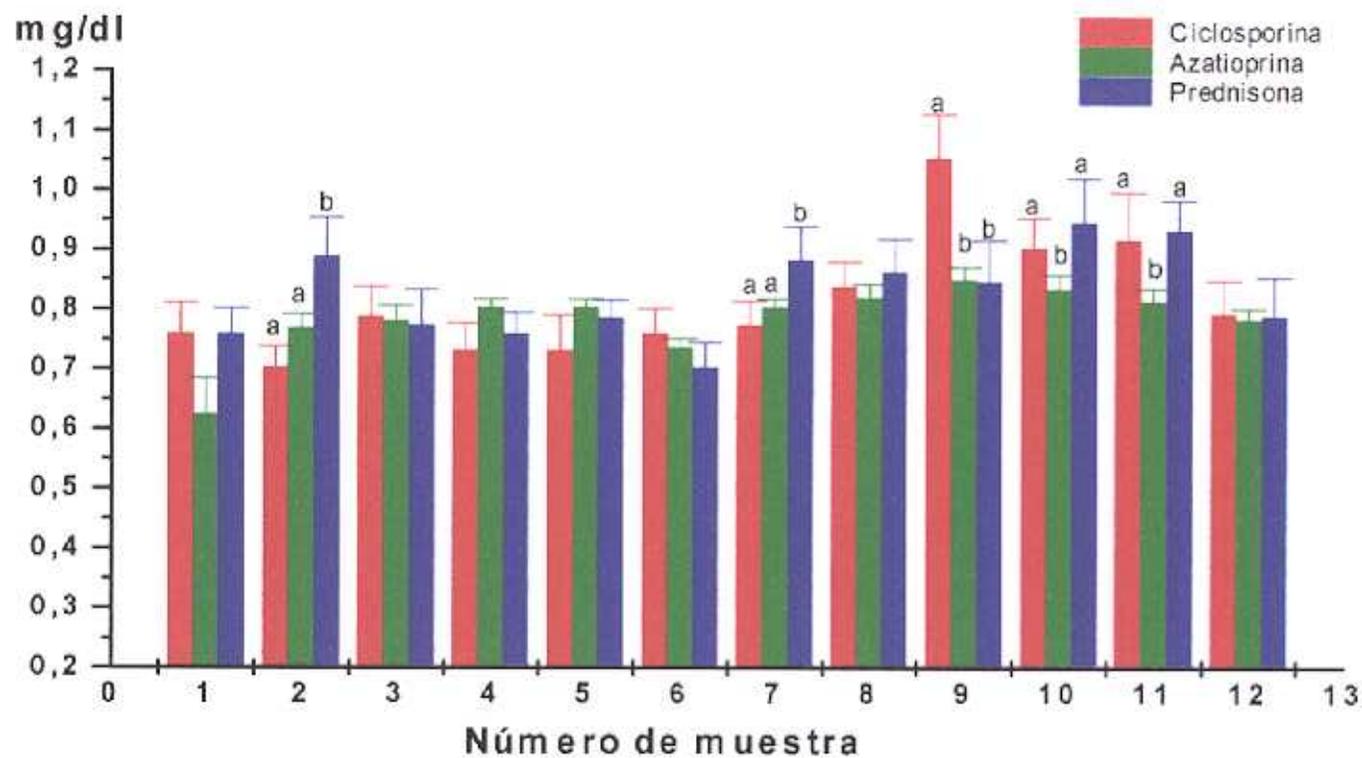


**c**

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,001$

Número de muestra

**Gráfica 13 (a, b y c).**- Comparación de las concentraciones séricas de *creatinina* del grupo control (■) con los diferentes tratamientos: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).



Distintos superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

**Histograma 13.-** Comparación entre las concentraciones séricas de *creatinina* en los diferentes grupos tratados: ciclosporina (●), azatioprina (▲) y prednisona (▼).

# **DISCUSIÓN**

## 1.- Elección de la especie animal y de los fármacos inmunosupresores

Durante la elaboración del protocolo experimental, se eligió el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), en primer lugar, por ser un animal de fácil manejo y con gran accesibilidad a los vasos sanguíneos. Por otro lado, nuestro Departamento dispone de un animalario en el que las habitaciones están especialmente preparadas para el alojamiento de esta especie y existe un control periódico de las condiciones ambientales y sanitarias, de acuerdo con el RD 223/1988, para la experimentación animal. Además, el conejo es un animal de experimentación ampliamente utilizado en estudios inmunológicos, particularmente los que tratan sobre la respuesta humoral frente a un estímulo antigénico (Kraus *et al.*, 1984), así como por ser un animal de elección como productor de anticuerpos policlonales (Silván, 1991; Illera *et al.*, 1992).

Por otra parte, la revisión bibliográfica realizada sobre el efecto de los fármacos inmunosupresores en diferentes especies, nos indicó que el conejo es un animal muy utilizado para el estudio del metabolismo de diversos compuestos, entre los que se encuentran la prednisona y la ciclosporina, así como para el esclarecimiento de ciertos efectos secundarios de algunos de ellos (ciclosporina). Además, también se utiliza el conejo en investigaciones sobre el trasplante de órganos, donde se les administran sustancias inmunosupresoras como la azatioprina y/o ciclosporina y/o corticoides.

Para estudiar la patogénesis de la aterosclerosis coronaria acelerada Kuwajara *et al.* (1991) utilizaron, como modelo animal, el conejo NZW macho. Los animales fueron trasplantados de corazón y recibieron 10 mg/kg/día IM de ciclosporina como inmunosupresor. Thliveris *et al.* (1991) utilizaron como modelo animal el conejo para estudiar los efectos nefrotóxicos de la ciclosporina, comprobando que se producen alteraciones similares a las provocadas en humanos y siendo mejor modelo que los roedores. Para un mejor conocimiento de la acción de la ciclosporina sobre el músculo liso de la uretra y vejiga, Kitani *et al.* (1996) utilizaron el conejo obteniendo excelentes resultados.

Tamolang *et al.* (1995) desarrollaron un sistema enzimático microsomal hepático, para determinar los diferentes metabolitos de la ciclosporina A, utilizando el conejo como modelo experimental y comprobando que los patrones de los metabolitos del fármaco muestran una gran semejanza a lo observado en la especie humana; estos autores concluyen estableciendo que se puede utilizar el conejo como modelo para predecir la biotransformación de la ciclosporina A, en el hombre. Para un mejor conocimiento del metabolismo de la ciclosporina, Pham-Huy *et al.* (1995) establecieron un modelo *in vitro* de microsomas hepáticos o renales procedentes de conejos. Massicot *et al.* (1994) valoraron los efectos nefrotóxicos producidos por la ciclosporina en el conejo, argumentando que posiblemente sea un animal más sensible que la rata.

Por todo lo anteriormente expuesto, nos pareció que el conejo blanco de Nueva Zelanda podría ser el animal de elección en nuestro estudio, ya que el sistema enzimático microsomal hepático y renal son semejantes a los de la especie humana.

La elección de los **inmunosupresores** se realizó en base a la terapia utilizada en este momento como fármacos de elección en el trasplante de órganos, esta es la denominada "terapia triple clásica" que consta de ciclosporina, azatioprina y prednisona. Con este protocolo, se consigue una inmunosupresión adecuada y se disminuyen los efectos secundarios de cada fármaco por disminución de la dosis de cada uno de ellos, ya que uno a otro se potencian y complementan. Mientras se dispone de abundante información sobre la terapia clásica (Gruber *et al.*, 1989; Withe, 1994; Wieneke *et al.*, 1996), poco se conoce sobre los efectos del tratamiento con un solo inmunosupresor, por lo que se quiso ver el efecto de cada uno de ellos por separado, y poder conocer los diferentes mecanismos de acción sobre el sistema inmunológico. También se quiso comprobar si esta diferencia repercutía de alguna forma sobre el eje adreno-gonadal y sobre el fisiologismo de los animales utilizados en el protocolo experimental ya que la información sobre estos puntos es escasa.

La **dosis** de ciclosporina A administrada a los conejos de nuestra experimentación

fue elegida tras la revisión bibliográfica de diferentes autores, que han utilizado el conejo en diversos protocolos en que se necesita una dosis de ciclosporina eficaz en la inhibición de la respuesta inmune. Así, en los trabajos de Thliveris *et al.* de 1991 y 1994, en los que realizan un estudio comparativo entre los resultados obtenidos por diferentes autores, y por ellos mismos, en tratamientos con ciclosporina a distintas dosis, vías de administración y especies animales, concluyen indicando que en el conejo, la dosis efectiva es de 10-15 mg/kg/día, coincidiendo con los estudios de Neild *et al.* (1983) y de Monaco *et al.* (1988). En estudios *in vivo* e *in vitro* donde se comparó el efecto de la ciclosporina A y la ciclosporina G (a distintas dosis) utilizando el conejo NZW en el trasplante de piel, se mostró que las dosis de ciclosporina A de 5 y 10 mg/kg/día por vía i.v., son las más efectivas (Rayat *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 1995). Delaere *et al.* (1996) administraron a conejos ciclosporina a la dosis de 10 mg/kg/día, como inmunosupresor efectivo en el trasplante de tráquea. Por los argumentos mencionados en la revisión bibliográfica, la dosis utilizada en nuestro estudio fue de 10 mg/kg/día.

Los trabajos de Fryer *et al.* (1993) comparando el tratamiento con ciclosporina o rapamicina (a diferentes dosis) en el trasplante heterotópico de corazón en el conejo NZW, indicaron que la dosis de 10 mg/kg/día es efectiva frente al rechazo y no produjo una alteración significativa en los parámetros bioquímicos analizados. Por otra parte, el estudio de la concentración de ciclosporina en sangre, monitorizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) demostró que el conejo tratado con una dosis de ciclosporina de 8 mg/kg/día, alcanzaba las mismas concentraciones en sangre que la dosis terapéutica utilizada en el hombre (Andersen *et al.*, 1994).

En cuanto a la utilización de azatioprina en el conejo, los trabajos encontrados son escasos; aun así, Leibowith y Elliott (1966a y 1966b) en estudios realizados sobre la terapia preventiva del rechazo en trasplante de córnea en conejos, afirman que la administración sistemática de análogos de la purina es capaz de suprimir el rechazo inmunológico. Sin embargo, cuando este fármaco se administra durante largos periodos de tiempo, se mantiene el injerto, pero aparecen efectos secundarios tóxicos que hacen prohibitivo su uso. Por otro

lado, otros trabajos afirman que administrado a dosis óptima y a corto tiempo, no causa efecto tóxico y es capaz de disminuir la respuesta inmunológica al trasplante (Polack, 1965).

Existen pocos estudios, y éstos son controvertidos, en cuanto a la dosis eficaz de azatioprina, como supresor de la respuesta inmune en el conejo. Después de la revisión bibliográfica realizada y siguiendo las indicaciones en la posología recomendada en humana para el trasplante de órganos (dosis inicial: hasta 5 mg/kg/día por vía i.v.; dosis de mantenimiento: de 2 a 4 mg/kg/día por vía oral) comprobamos que esta dosis es eficaz, corroborándolo los trabajos de Goldberg y Lance (1972), sobre el trasplante de hueso en conejo, indicando que es un método efectivo de inmunosupresión en conejo. Por todo ello, se eligió la dosis de tratamiento con azatioprina de nuestro estudio (dosis inicial: 4mg/kg/día por vía i.v.; dosis de mantenimiento: de 2,5 mg/kg/día por vía oral).

Ferry y Wagner (1987) estudiaron las características de la unión a proteínas de prednisona y prednisolona en plasma de conejo y hombre y comprobaron que la prednisona presenta una unión característica lineal en ambas especies. Ésto nos indicó que se podría utilizar como dosis de elección en nuestro protocolo experimental la que recomienda el laboratorio, para el caso de trasplantes en humanos. Por otro lado, este dato fue confirmado por los trabajos de Manthorpe *et al.* (1975), que utilizaron 2 mg/kg/día de prednisona en conejos, para el estudio del efecto de los glucocorticoides en el tejido conjuntivo de los vasos, siendo dicha dosis la más adecuada.

## 2.- Concentraciones de Inmunoglobulina G del Conejo

La determinación de las concentraciones plasmáticas de IgG de los animales de nuestra experimentación se realizó para comprobar si el efecto del inmunosupresor disminuía el nivel de anticuerpos circulantes. El organismo está en continua producción de anticuerpos frente a una amplia variedad de antígenos ambientales. La producción y catabolismo se mantienen en equilibrio, observándose que el catabolismo es proporcional a la concentración sérica de las inmunoglobulinas en casi todas las especies (Bell y Fahey, 1964; Sell, 1964). En el conejo este punto no está muy claro; diversos autores indican que no hay una correlación directa entre dichos parámetros (Humphrey y McFarlane, 1954) y sin embargo, Catsoulis *et al.* (1964) indican un incremento en el catabolismo de IgG en animales hiperinmunizados.

Al realizar el estudio de los grupos control (grupo I) y tratados con ciclosporina (grupo II), azatioprina (grupo III) y prednisona (grupo IV) (Gráfica y Tabla 1) frente al comportamiento de éstos en las diferentes etapas experimentales, se comprobó cómo, en la etapa inicial, todos los grupos mantienen unos niveles semejantes de IgG.

La *ciclosporina*, como se indicó con anterioridad, ejerce su acción selectivamente sobre los linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, pero a través de esta acción se produce una disminución en la formación de los anticuerpos. La comparación entre los grupos I y II, muestra que las concentraciones del grupo tratado con ciclosporina son inferiores a los controles durante casi todas las tomas de la fase de tratamiento. Sin embargo, una vez retirado el tratamiento, se produce un incremento de las concentraciones de IgG, para disminuir posteriormente hasta que; en la toma realizada a la semana de la retirada del tratamiento, las concentraciones de IgG de ambos grupos son semejantes. Nuestros resultados coinciden con los aportados por Blackham y Griffiths (1991) y Brahn *et al.* (1991) comprobando la involución de la artritis inducida por antígenos en el conejo y en ratas (respectivamente) tratados con ciclosporina, lo que indicó la existencia de una disminución de la producción de anticuerpos. Resultados semejantes obtuvieron Fujita *et*

*al.* (1991), en ratas inmunizadas con BSA y tratadas con ciclosporina, donde se suprimió la producción de anticuerpos. Estudios similares fueron los realizados por Bussiere *et al.* (1991), Kurunazy y Mark (1993) y Nagamatsu *et al.* (1994), donde indicaron que la ciclosporina disminuyó la producción de anticuerpos, corroborando los resultados obtenidos en nuestros animales tratados con ciclosporina ya que se produce una disminución de las IgGs circulantes durante la fase de tratamiento.

La *azatioprina* afecta fundamentalmente a las células inmunológicas que se encuentren en fase de inducción de la producción de anticuerpos. El tratamiento inmunosupresor con *azatioprina*, refleja una disminución en las concentraciones de IgG del grupo III durante toda la fase de tratamiento que se mantiene en la etapa de retirada, aunque, en la última toma de la experimentación la concentración de IgG de ambos grupos se equiparó. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Berembaum en 1960, que compararon, en el ratón, los efectos de diferentes sustancias citotóxicas tras la exposición al antígeno. En ellos, se comprobó que la 6-mercaptopurina (metabolito activo de la *azatioprina*) disminuía el título de anticuerpos a los 10 días de la administración. Nosotros hemos comprobado que la disminución de la concentración de IgG se produce ya a las 24h de recibido el tratamiento; tal vez ésto sea debido a la dosis inicial empleada y a la vía de administración; además, la *azatioprina* es más activa que la 6-mercaptopurina utilizada en los ratones.

Por otro lado, Schwartz *et al.* (1958) utilizando antígenos proteicos, obtuvieron una inhibición completa de la síntesis de anticuerpos mediante la utilización de 6-mercaptopurina. En nuestro estudio, la inhibición de la producción de anticuerpos no es completa, debido fundamentalmente a que nuestros animales estuvieron en un ambiente antigénico normal, ya que no se les expuso a la acción de un antígeno específico. Por último, en pruebas que fueron efectuadas en conejo, se comprobó la eficacia inhibitoria de la 6-mercaptopurina en la fase inductiva de la respuesta inmunológica, cuyos mecanismos están implicados con la síntesis de nucleoproteínas (Sterzl, 1960); sin embargo, el efecto es limitado cuando los linfocitos están en reposo (Sullivan *et al.*, 1981; Frey *et al.*, 1984).

Estudios recientes utilizan azatioprina o 6-mercaptopurina en la enfermedad de Crohn en el hombre, indicando que es un tratamiento eficiente en esta enfermedad con origen autoinmune (Candy *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1995; Bouhnik *et al.*, 1996).

El efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de anticuerpos no parece estar suficientemente aclarado. Se ha observado en la especie humana que dosis altas de metilprednisolona producen una pequeña reducción de IgG como resultado tanto de una disminución en la síntesis como de un incremento en el catabolismo (Butler y Rossen, 1973). No obstante, en otros estudios, el mismo fármaco no suprimió la respuesta primaria o secundaria de los anticuerpos; sin embargo, redujo el nivel de producción continuo de anticuerpos (Butler, 1974). En cuanto a los resultados obtenidos en el grupo de animales a los que se les trató con *prednisona*, podemos indicar que el fármaco produjo una disminución de la concentración de IgG, que fue más marcada al inicio del tratamiento. De hecho, la retirada del tratamiento produjo un incremento en la concentración de IgG, tal vez debido a un incremento en la síntesis y/o una disminución del catabolismo de las mismas; después de 7 días de haber retirado el tratamiento farmacológico, los animales presentaron concentraciones similares a las de los controles, demostrando que, después de la supresión del tratamiento, el sistema inmunológico vuelve a su estado normal o fisiológico.

El estudio comparativo de los tres tratamientos (Histograma 1) muestra como en la toma nº 2 existe una diferencia entre los grupos II y IV, comprobándose una inhibición en la producción de IgG, más marcada en los animales que recibieron prednisona y actuando ésta con mayor rapidez. Sin embargo, en la etapa de retirada del tratamiento, se observan valores inferiores en los animales tratados con azatioprina, parece ser que el efecto que provoca su administración es más duradero e incluso podríamos decir que ésta tiene un efecto acumulativo diferente a los otros tratamientos.

De los resultados obtenidos se deduce que el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina, azatioprina o prednisona, produce una disminución de las inmunoglobulinas

G circulantes sintetizadas como consecuencia de la exposición a los antígenos ambientales en el conejo. Sin embargo, no inhiben completamente la formación de anticuerpos y la retirada de los mismos produce la vuelta a la normalidad de las concentraciones séricas de IgG.

### 3.- Efecto de la inmunosupresión sobre el eje adreno-gonadal

Una vez comprobado que los tres inmunosupresores empleados producen la disminución de las concentraciones de IgG en los animales de los grupos tratados, se quiso comprobar si este hecho ejercía algún efecto sobre el Sistema Endocrino, fundamentalmente sobre el **eje adreno-gonadal**. Por esta razón, se determinaron las concentraciones de las principales hormonas esteroides secretadas por la corteza adrenal y por el testículo, indicadoras de la funcionalidad de dichas glándulas endocrinas. La relación existente entre el sistema inmunológico y endocrino ha quedado reflejada en el apartado de Introducción, dejando establecida la intercomunicación que existe entre los dos sistemas (Grossman, 1984; Blalock, 1989; Ansar Ahmed *et al.*, 1987; Wilder, 1995; Torpy y Chrousos, 1996). Por ello se analizaron las hormonas esteroides tanto de la la corteza adrenal (corticosterona y cortisol), como las gonadales (androstenediona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol).

#### Hormonas corticoadrenales

La secreción, por parte de la corteza adrenal, de corticosterona y del cortisol está influenciada por múltiples factores externos como son: el propio manejo, el ejercicio o la época del año. Todos estos factores "estresantes" se intentaron evitar, en la medida de lo posible, al diseñar el protocolo experimental, por lo que fue utilizado un tranquilizante (droperidol y fentanilo) (Tillman y Norman, 1983). Las muestras sanguíneas siempre se tomaron a la misma hora (8:00) y en un intervalo total de 30 minutos, para evitar las variaciones circadianas producidas por la hora de la recogida de las muestras (Illera *et al.*, 1993)

La corticosterona es el glucocorticoide secretado en mayor cantidad por la corteza adrenal del conejo (Bush, 1953; Gamjan *et al.*, 1972). Hoffman (1956) estudia, en el ratón, la síntesis hormonal de la corteza adrenal indicando que, en esta especie, predomina la producción de corticosterona, existiendo una marcada indisponibilidad para hidroxilar los esteroides adrenocorticales en el C-17. En los trabajos de Conley y Bird (1997), en donde

se hace referencia a las diferentes rutas metabólicas de la esteroidogénesis adrenal en distintas especies, se indica que el conejo produce mayor cantidad de corticosterona por falta de una de las enzimas, la P 450 17  $\alpha$ -hidroxilasa/17-20 liasa (P 450<sub>c17</sub>), responsable de la biotransformación de la pregnenolona en cortisol.

Los datos aportados por otros autores con respecto a la acción de la *ciclosporina* sobre las hormonas corticosteroides son escasos y controvertidos. Stephanou *et al.* (1992) investigaron los efectos de la ciclosporina en los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona, indicando que se produce una disminución de los mismos, afirmando que la ciclosporina actúa directamente sobre el eje HPA reduciendo la activación de dicho eje. Sin embargo, en nuestro estudio se observa que las concentraciones de corticosterona del grupo tratado con ciclosporina, muestran que en toda la fase de tratamiento los animales tuvieron mayores concentraciones de corticosterona frente al grupo que no recibió ningún tratamiento inmunosupresor (gráfica 2a). No obstante, la retirada del tratamiento hizo que los valores de ambos grupos fueron similares. Además, las concentraciones de cortisol son ligeramente superiores a los controles (gráfica 3a). Posiblemente, la diferencia entre los distintos resultados sean debidos a las distintas dosis utilizada y a la especie animal, ya que los autores anteriormente citados utilizan roedores.

Un comportamiento semejante fue el que tuvieron los animales que recibieron *azatioprina*, apareciendo concentraciones superiores durante el tratamiento. En la fase de retirada, los animales del grupo III continuaron manteniendo niveles superiores a los controles pero no hay diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ). Por otro lado, se observa un incremento en la producción de cortisol, en el grupo tratado con azatioprina al inicio del tratamiento, posteriormente, estas concentraciones se hacen similares a las determinadas en el grupo control.

Por otra parte, diversos autores han puntualizado la importancia de uno de los efectos secundarios más frecuentes en la terapia con ciclosporina (Ryffel *et al.*, 1986; Grady *et al.*, 1988; Kiberd, 1989 Laine *et al.*, 1997) y azatioprina (Kullman *et al.*, 1996), que es

la elevación de la presión arterial cuando se utilizan éstos en tratamientos crónicos.

Existen diversos trabajos donde se intenta explicar el efecto de la ciclosporina sobre la tensión arterial. Parece ser que el fármaco produce una disminución en el flujo renal (Paller y Murray, 1985; Jackson *et al.*, 1989; Ferguson *et al.*, 1993; Laine *et al.*, 1994; Laine y Helberg, 1995; Laine *et al.*, 1997), lo que provocaría una respuesta en el organismo, produciendo posteriormente un incremento en la presión arterial. El mecanismo por el cual se produce este efecto es porque, cuando la presión arterial disminuye, el flujo sanguíneo que llega al riñón también decrece, provocando una señal en las células del aparato yuxtaglomerular para que secreten la enzima *renina*. Esta enzima pasa a la sangre y activa la producción de angiotensina I, que a través de la acción enzimática se transforma en angiotensina II, la cual tiene un efecto vasoconstrictor actuando directamente sobre el riñón y provocando una disminución en la eliminación de líquidos, aumentando la volemia, y por lo tanto, incrementando la presión sanguínea. Además, la angiotensina II, ejerce su acción estimulando las células de la corteza adrenal, produciendo un incremento en la secreción y liberación de aldosterona, la cual actuará, en último término, elevando la presión sanguínea (Guyton, 1988).

Además, según los trabajos *in vitro* en células adrenales de rata, de Mazzocchi *et al.* (1994), la ciclosporina a concentraciones medias, produce una estimulación de la angiotensina II, provocando la conversión de corticosterona en aldosterona. Como la ciclosporina produce un incremento de angiotensina II, ésta induce a una elevación de los niveles de glucocorticoides (Wan *et al.*, 1996; Andreis *et al.*, 1998), debido a un efecto directo en la secreción adrenal (Yin y Yang, 1996), lo que coincide con nuestros resultados (gráficas 2a y 3a).

Hestin *et al.* (1997) estudiando los mecanismos de producción de hipertensión en pacientes tratados con ciclosporina o azatioprina, indicaron que al inicio del tratamiento aparece un incremento en los niveles de angiotensina II; sin embargo, posteriormente éstos permanecen bajos, al igual que los de renina, confirmando que en tratamientos agudos se

produce una disminución del flujo sanguíneo y de la presión arterial, coincidiendo con nuestro protocolo experimental.

En los animales de los grupos tratados con ciclosporina y con azatioprina, aparece un incremento en la producción de corticosterona, tal vez debida a los mecanismos anteriormente expuestos, coincidiendo con los incrementos en la producción de angiotensina II producidos por la ciclosporina indicados por Mazzocchi *et al.* (1994); además, posteriormente las concentraciones de los corticoides se mantienen en un nivel semejante al de los controles, debido a la propia regulación del organismo por la disminución de renina y angiotensina observada por Hestin *et al.* (1997) y a la retirada del tratamiento.

Es posible también que el incremento de la actividad de la glándula adrenal pueda producirse por un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La disminución del flujo sanguíneo afecta a las células hipotalámicas, esto provocara su estimulación y liberación de CRH, que actuará produciendo la secreción y liberación de ACTH al torrente circulatorio, esta última actuaría sobre la glándula adrenal provocando un incremento en la secreción de los glucocorticoides e, incluso, de la aldosterona (Wilder, 1995).

Otra explicación al incremento de los glucocorticoides puede ser que como se sabe, la IL-6 es un potente estimulador de la secreción de los glucocorticoides adrenales a través de la activación del eje HPA. Además, la angiotensina II estimula la producción de IL-6 (Lyson y McCamm, 1992), por lo que se puede deducir que la ciclosporina origina un incremento en la liberación de glucocorticoides como consecuencia del efecto que provoca sobre la angiotensina II (Mazzocchi *et al.*, 1994). Este hecho coincidió con los resultados obtenidos en las concentraciones de corticosterona del grupo tratado con ciclosporina. De esta forma, se comprueba que todos estos mecanismos se interrelacionan, y tienen puntos en común, como son el sistema inmune y el neuroendocrino.

Parece ser que el tratamiento con ciclosporina y azatioprina ejerce un efecto

estimulante de la zona cortical de la glándula adrenal; sin embargo, el grupo tratado con *prednisona*, presentó un comportamiento contrario, observándose una disminución en las concentraciones séricas de corticosterona durante la fase de tratamiento y aún en la de retirada, hasta la toma n° 12 (7 días después de retirado el fármaco) donde llegaron a equipararse los valores de ambos grupos. Las concentraciones de cortisol del grupo de animales a los que se les administró *prednisona* fueron ligeramente inferiores en algunas tomas de la fase de tratamiento y de la fase de retirada del mismo, aunque el estudio estadístico no reflejó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (gráficas 2c y 3c). Esta disminución en la producción de corticoides adrenales se podría explicar por que la *prednisona* inhibe la producción de glucocorticoides endógenos por un efecto de retrofuncionalidad negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal cuyo resultado final es la disminución de la síntesis de glucocorticoides; este hecho lo demuestran también los trabajos de Hirano *et al.* (1991), que indican que el tratamiento con *prednisona* disminuye la concentración de cortisol (en humanos) fundamentalmente en el periodo de acumulación de dicho fármaco.

Por otro lado, los glucocorticoides actúan sobre los macrófagos inhibiendo la síntesis de IL-1 (Guillis, *et al.*, 1979; Palacios y Sugawara, 1982); esta inhibición producirá una disminución en la secreción de corticoides adrenales (Brown y Blalock, 1990) coincidiendo con el efecto que produce el tratamiento con *prednisona* sobre las concentraciones séricas de corticosterona. Además, con estos resultados podemos comprobar cómo una "alteración" en el sistema inmune se refleja o manifiesta a nivel adrenal.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos indicar que los tratamientos inmunosupresores con *ciclosporina* y *azatioprina* incrementan las concentraciones de los glucocorticoides adrenales; esto es debido al efecto de los fármacos sobre la presión arterial y más directamente sobre la acción en la síntesis de la angiotensina II y la acción que producen sobre la interleucina 6. El efecto contrario se produce en los animales tratados con *prednisona*, fundamentalmente por actuar inhibiendo el eje HPA y por su acción sobre la IL-1. De esta manera, se constata la relación existente entre el sistema inmune y el eje

hipotálamo-hipófisis-adrenal, considerándose la corteza adrenal un punto importante de integración entre los sistemas inmune y neuroendocrino.

### Hormonas gonadales testiculares

La función reproductora de los conejos machos se puede determinar por el análisis de las concentraciones séricas de las hormonas esteroides gonadales: testosterona, androstenodiona y  $17\beta$ -estradiol. Sin embargo, los cambios que se pueden producir en la secreción de dichos esteroides cuando se produce una inmunosupresión no están completamente aclarados. Por ello, parece interesante, determinar las concentraciones séricas de los andrógenos y estrógenos durante la actuación de diferentes fármacos, cuyo efecto es provocar inmunosupresión (Gráficas y Tablas 4, 5 y 6), y de esta forma, precisar las posibles alteraciones en la función gonadal de los animales tratados, así como establecer la intercomunicación entre el eje adreno-gonadal.

En el estudio de los valores hallados de los andrógenos testiculares se comprueba que las concentraciones de *androstenodiona* (metabolito precursor de la testosterona) de los animales tratados con *ciclosporina* se incrementan (en la etapa de tratamiento e incluso en la fase final de retirada del mismo). Por el contrario, el estudio de los perfiles de *testosterona* señala una disminución de las concentraciones (gráfica 5a), pero en este caso los valores se incrementan en la etapa de retirada del tratamiento. Este hecho se explica porque la producción de testosterona está regulada, en primer término, por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La LH hipofisaria se secreta bajo la influencia de la GnRH del hipotálamo, produciendo el estímulo de las células de Leydig testiculares, vía cAMP, para que se secrete y libere testosterona (Illera *et al.*, 1995). El incremento de los niveles de testosterona plasmática provoca una señal de retrofuncionalidad negativa inhibiendo la secreción de LH (Woodman, 1997). Por todo lo anteriormente expuesto, se puede indicar que la supresión de la secreción testicular de testosterona se debe a una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, debido a un efecto de retrofuncionalidad negativo sobre el mismo al aumentar las concentraciones séricas de androstenodiona.

Ahora bien, en la esteroidogénesis testicular ocurren una serie de reacciones enzimáticas donde a partir del colesterol y mediante la acción de diversas enzimas

pertenecientes al sistema enzimático citocromo P450, van a dar lugar a los esteroides responsables de la funcionalidad reproductora. Al parecer, lo que sucede en nuestros animales tratados con ciclosporina es un bloqueo en la esteroidogénesis en el paso donde se produce la conversión de la androstenodiona en testosterona, posiblemente por inactivación de la enzima 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; por este motivo, se produce un incremento de sustrato que aparece reflejado en las concentraciones sanguíneas de androstenodiona. Por otro lado, existe una disminución de la conversión en testosterona, como han indicado Conley y Bird (1997) en un trabajo de revisión reciente aunque, sus estudios se realizaron en otra especie animal.

Otro argumento para poder explicar la disminución de las concentraciones de testosterona es el aportado por Sikka *et al.* (1988), que indican que el hipogonadismo hipogonadotrópico inducido por ciclosporina, que produce una disminución de la testosterona sérica, es debido a que la ciclosporina puede producir una supresión del eje hipotálamo-hipófisis más que por una inhibición directa a nivel testicular. Existen trabajos en donde indican que los niveles de LH, en ratas tratadas con ciclosporina aumentan (Seethalakshmi *et al.*, 1990) y otros, sin embargo, indican una disminución (Koyle *et al.*, 1986; Rajfer *et al.*, 1987), no pareciendo estar claro este concepto. Trabajos posteriores (Krueger *et al.*, 1991) argumentan que estas diferencias son debidas a un efecto dosis-dependiente de la ciclosporina, indicando que la ciclosporina produce una disminución de la capacidad de unión de los receptores de LH testiculares, reduciéndose la capacidad testicular para responder tanto a niveles normales como elevados de dicha hormona. Además, sugieren que la ciclosporina afecta a nivel del sistema enzimático del citocromo P450 testicular, por lo que la ciclosporina provoca una alteración en la esteroidogénesis (donde la actividad de este sistema enzimático es fundamental). Este hecho parece ser que es lo que provoca esta disminución de las concentraciones de testosterona en los animales de nuestra experimentación.

En nuestros resultados comprobamos además que las concentraciones séricas de *17 $\beta$ -estradiol* se encuentran disminuidas. Efectivamente, la ciclosporina afecta a las enzimas

responsables de la esteroidogénesis, al menos a nivel de la conversión de androstenodiona en testosterona por la acción de la enzima P450 17  $\beta$ -hidroxilasa; por consiguiente, la conversión de testosterona en estradiol se ve alterada por una disminución de la concentración del sustrato.

Por otra parte, se conoce que la corticosterona, por sí misma, puede modificar la secreción de testosterona. Elevados niveles de corticosterona aumentan el efecto de retrofuncionalidad negativo de la testosterona sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG) por un mecanismo que aun no está aclarado (Woodman, 1997). La disminución del comportamiento del macho, como resultado de una exposición al estrés, se ha explicado como cambios recíprocos en corticosterona y testosterona y una baja actividad testicular de la 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, enzima que inactiva los glucocorticoides por conversión del grupo 11-hidroxi a un grupo 11-ceto (Monder *et al.*, 1994). De acuerdo con esto último, los animales tratados con ciclosporina respondieron con un incremento en la producción de corticosterona y cortisol, por lo que este mecanismo también puede estar implicado en la disminución de la testosterona, corroborándose la acción de la corteza adrenal sobre el testículo.

Contrariamente a lo que sucede con el grupo anterior, el tratamiento de los animales con *azatioprina* no produjo ninguna variación relevante en las concentraciones séricas de androstenodiona, testosterona, y 17 $\beta$ -estradiol (gráficas 4b, 5b y 6b). La azatioprina en el conejo, a la dosis utilizada, no afecta a la funcionalidad gonadal de forma importante, y no se comprueba ninguna alteración a nivel esteroidogénico. Sin embargo no hemos encontrado ningún dato aportado por otros autores al respecto.

El tratamiento con *prednisona* produjo un incremento de androstenodiona al igual que en el grupo de la ciclosporina; sin embargo, las concentraciones de testosterona no tuvieron variaciones significativas. Mientras que las concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol aparecieron disminuidas (gráficas 4c, 5c y 6c). La causa de estas diferencias la podemos encontrar en que los glucocorticoides inhiben la función testicular tanto *in vivo* como *in*

---

*vitro*, parece ser que por inhibición directa con los receptores de LH. Se han identificado receptores de glucocorticoides en áreas testiculares, más concretamente en las células de Leydig y parece ser, que pueden actuar a través de sus receptores específicos (Bambinoy Hsueh, 1981).

Como se ha indicado con anterioridad, los glucocorticoides inhiben la síntesis de testosterona; sin embargo, esto no sucede en el grupo tratado con prednisona. La causa de esta diferencia la podemos encontrar en las distintas acciones de los glucocorticoides dependiendo de que la dosis sea fisiológica o farmacológica (Chrousos y Gold, 1992). De hecho, la prednisona inhibe el eje HPA, comprobado por la disminución de las concentraciones de corticosterona y cortisol de este grupo. Por lo que, en este caso, dicho eje no puede afectar a la función gonadal.

En resumen, la ciclosporina afecta la funcionalidad gonadal del conejo macho reflejado por los resultados obtenidos. Además, se ponen de manifiesto las relaciones existentes entre la corteza adrenal y la gónada ya que, con este agente inmunosupresor, se altera la secreción por parte de la corteza adrenal y ésta provoca un efecto de retrofuncionalidad sobre el eje HPG modificando la secreción gonadal. La prednisona afecta de diferente forma a la gónada, y la posible alteración que este inmunosupresor puede producir no se traduce en una disminución de testosterona. Por los resultados obtenidos podemos indicar que la azatioprina no afecta la secreción de las hormonas testiculares analizadas, pudiendo no afectar a la funcionalidad gonadal de los animales.

## 5.- Pruebas de funcionalidad orgánica

Una vez comprobada la eficacia de los agentes inmunosupresores, quisimos valorar el estado fisiológico general de los animales de nuestro estudio mediante la realización de diferentes pruebas orgánicas. Para ello, procedimos a realizar un perfil bioquímico de todos los animales durante los días de la experimentación. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas se estudiaron clasificándolas dentro de su significación como pruebas de funcionalidad de ciertos órganos representativos del fisiologismo general, como son el hígado y el riñón.

Así, el *hígado* desempeña importantes funciones metabólicas y toda valoración funcional de este órgano depende de su capacidad para realizar estas actividades específicas. De las diversas pruebas hepáticas basadas en las funciones de dicho órgano, en nuestro perfil bioquímico se han reflejado las siguientes; aquellas basadas en la actividad enzimática y en funciones bioquímicas específicas: metabolismo de proteínas y metabolismo lipídico (Coles, 1986a).

Como pruebas basadas en la actividad enzimática, se determinaron las enzimas aspartato aminotransferasa (ASAT o GOT) y alanino aminotransferasa (ALAT o GPT). Sinha y Saran (1972) encontraron en el conejo una correlación positiva entre el grado de necrosis hepática y la actividad ALAT en el suero, aunque en esta especie la enzima presenta menos especificidad de órgano, apareciendo casi la misma actividad en tejidos como el hepático y muscular miocárdico (Clampitt y Hart, 1978). Además, la liberación de ASAT al torrente circulatorio es significativo de daño celular, ASAT es poco específica de órgano; sin embargo, la determinación de ambas enzimas aporta una mayor información sobre el estado fisiológico del hígado (Cornelius, 1989; Hoffmann *et al.*, 1989). Por esta razón se ha realizado un estudio conjunto de los resultados de ASAT y ALAT (Gráficas y tablas 7 y 8), de los animales de nuestra experimentación. Comparando nuestros resultados con los hallados por otros autores referidos al conejo macho (*Oryctolagus cuniculus*) incluidos en el Cuadro 1, encontramos que las variaciones en la determinación de este

parámetro son susceptibles de la metodología utilizada para ello; por ésto, nosotros nos basaremos en los valores que representa el grupo control frente a los grupos problema.

En los animales del grupo tratado con *ciclosporina* aparecen incrementos en la actividad enzimática de ASAT en las tomas intermedias de la fase de tratamiento; sin embargo, en el resto de las tomas, los valores del grupo II son incluso inferiores a los hallados en los controles. En el caso de la determinación de los valores de ALAT se observa un ligero incremento en los valores de los animales tratados, aunque éstos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), excepto en alguna toma (gráficas 7a y 8a). Estos resultados no indican una alteración en la integridad del órgano. Aunque puntualmente pueda haber algún incremento en la actividad de dichas enzimas, éstos son pasajeros y de corta duración; además, la retirada del tratamiento conlleva una normalización de los valores. Nuestros resultados coinciden con los reflejados en los estudios de Fryer *et al.* (1993) realizados en conejos sometidos a un trasplante de corazón y tratados a diferentes dosis de ciclosporina (5, 10 ó 15mg/kg/día), donde indicaron que los valores de ALAT, ASAT, bilirrubina y fosfatasa alcalina, no mostraron diferencias desde el inicio hasta el final del tratamiento.

Sin embargo, como se ha indicado con anterioridad, la ciclosporina puede producir efectos hepatotóxicos. Kim *et al.* (1990 y 1991) realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* de la ciclosporina y sus metabolitos asociándolos con los posibles efectos tóxicos del fármaco. En este estudio, los autores utilizan ratas tratadas con ciclosporina a dosis de 7,5 mg/kg/día durante siete días; posteriormente, se analizaron ASAT y fosfatasa alcalina y se realizó un estudio histológico hepático. Contrariamente a nuestros resultados, los autores concluyen indicando que existe una disfunción hepática en los animales tratados con ciclosporina, con un incremento en las enzimas analizadas; sin embargo, no se apreció daño a nivel histológico en dicho órgano (Kim *et al.*, 1991). A la vista de nuestros resultados, parece ser que el conejo es una especie más resistente a los efectos hepatotóxicos de la ciclosporina que otras; además, la actividad detoxicante del hepatocito es diferente en lagomorfos que

en roedores (Laird, 1974). En los animales de nuestro estudio, se produce un ligero incremento en los valores de ASAT y ALAT, pero éstos se restablecen rápidamente tras la retirada del fármaco, llegando incluso a valores inferiores a los del grupo control. Se ha indicado que los metabolitos de la ciclosporina son menos tóxicos que el principio activo, y como en el hígado se metaboliza prácticamente toda la ciclosporina, es posible que ésta sea la causa de que el daño hepático no sea muy importante en la especie estudiada en nuestra experimentación (Pham-Huy *et al.*, 1995).

El tratamiento de los animales con *azatioprina* refleja un incremento en la actividad enzimática de ASAT, en la toma realizada al día siguiente de la inyección del fármaco, mientras que, en las tomas posteriores, ambos grupos mantienen niveles semejantes; sin embargo, en la fase de retirada comienzan a incrementarse los valores del grupo III hasta la toma realizada tras una semana de retirado el tratamiento, donde la actividad enzimática es semejante a los valores del grupo control. En cuanto a los valores determinados de ALAT se comprueba, en el grupo III, que los valores de esta enzima son superiores durante casi toda la experimentación, aunque sin significación estadística excepto en algunas tomas (gráficas 7b y 8b).

No ha sido posible encontrar referencias bibliográficas sobre el efecto de la *azatioprina* en el metabolismo hepático de los conejos; no obstante, nuestro estudio refleja una alteración de la actividad de ambas enzimas, al inicio del tratamiento y un efecto de acumulación o de mantenimiento después de retirado el mismo. Tal vez ésto sea producido por alguna alteración de las células hepáticas por el tratamiento debido a la dosis inicial (4mg/kg i.v.) del inmunosupresor; aún así, este incremento es insignificante, por lo que el daño hepático se puede considerar leve, ya que los niveles de ambas enzimas, en la toma realizada a la semana de la retirada, son semejantes a los analizados en los animales del grupo control. Como la *azatioprina* se metaboliza en hígado y puede alterar su funcionalidad, Kromm *et al.* (1987) recomiendan, en el paciente trasplantado de hígado, un inicio de tratamiento inmunosupresor con ciclosporina para posteriormente cambiar a *azatioprina*, por los efectos nefrotóxicos de la ciclosporina en humanos.

Los valores de ASAT del grupo tratado con *prednisona* muestran, en este caso, que la actividad enzimática durante la fase de tratamiento se incrementa, para recuperar valores basales en la fase de retirada. El estudio comparativo de ALAT, indica que los animales tratados con prednisona mantienen niveles semejantes al inicio de la fase de tratamiento; sin embargo, a partir de la toma n° 7 se produce un incremento que continúa hasta el inicio de la fase de retirada (gráficas 7c y 8c).

A tenor de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el tratamiento con prednisona afecta a la funcionalidad hepática, en cuanto a la integridad celular, aunque se va produciendo progresivamente según pasan los días de tratamiento. Los trabajos de Khalafallah y Jusko (1984), que estudian la distribución y farmacocinética de la prednisolona en el conejo, indican que en el hígado se produce una interconversión de prednisolona-prednisona y que además aparecen grandes cantidades de glucocorticoides en la bilis, lo cual indicaría un probable ciclo enterohepático que afectaría a la normal distribución del fármaco; tal vez ésta sea la causa de que la afectación hepática se produzca según se va administrando el fármaco, y que se observe un efecto acumulador, ya que la actividad enzimática continua siendo elevada, después de la retirada del fármaco. Nuestros resultados coinciden con diferentes estudios donde se describe una hepatopatía producida por esteroides (Rogers y Reubner, 1977).

Por último, podemos indicar que los tres inmunosupresores afectan de forma diferente en cuanto a la actividad de las enzimas hepáticas (histograma 7 y 8) comprobándose que la ciclosporina tiene un efecto puntual y pasajero sobre la actividad enzimática de ALAT y ASAT, no pareciendo estar comprometida la integridad del órgano en el conejo NZW y a las dosis y duración del tratamiento utilizado. En cuanto al tratamiento con azatioprina, se puede indicar que provoca una leve afectación del hígado cuando se utilizan dosis elevadas y como consecuencia de un efecto acumulativo al cabo del tiempo, restableciéndose la alteración en un periodo relativamente pequeño. El efecto de la prednisona es más acusado, comprobándose un incremento en las concentraciones de ALAT y ASAT que incluso permanecen después de la retirada del tratamiento, lo que indica una

alteración celular hepática.

### Valores enzimáticos en el conejo

Cuadro 1

Autores	ASAT	ALAT
Laird, (1972, 1974)	30,3±27,5 <sup>a</sup>	49,1 ± 20,2 <sup>a</sup>
Kozma <i>et al.</i> (1974)	14 -113 U*	17 - 67 U
Mitruka y Rawnsley (1977)	42,5 - 98,0 U/L	48, 5 - 78,9 U
Illera <i>et al.</i> (1992)	23,44 ± 0,77 <sup>b</sup> U/L	47,43 ± 4,46 <sup>b</sup>

a = media ± DS; b =Media ± ESM; \* = unidades Karmen

Mediante las pruebas basadas en las funciones bioquímicas específicas del hígado, se puede conocer la funcionalidad de éste órgano sobre el *metabolismo de las proteínas* (Coles, 1986). Con este propósito se determinaron las concentraciones séricas de proteínas totales de los grupos experimentales (Gráfica y Tabla 9). Con respecto a las concentraciones de las **proteínas totales** del grupo tratado con *ciclosporina*, se observa que durante el inicio y prácticamente toda la fase de tratamiento, no se aprecian cambios en los valores de los animales tratados; sin embargo, a partir de la toma n° 8 y hasta la n° 11 se incrementan las concentraciones de las proteínas totales, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Finalmente, después de un periodo de siete días sin tratamiento las concentraciones de ambos grupos son similares.

Estas variaciones que se producen en los animales tratados con ciclosporina, parecen ser debidas a un incremento en la síntesis o, posiblemente, a una variación en el intercambio proteico tisular y plasmático, con mayor excreción de proteínas al torrente circulatorio. Existe un equilibrio dinámico entre proteínas plasmáticas y tisulares, ya que cada parte sostiene a la otra si las demandas así lo requieren (Kaneko, 1989), en el caso de haber escasez de proteínas plasmáticas el organismo tiende a mantener su concentración gracias al aporte de las proteínas tisulares, fundamentalmente de albúmina (Coles, 1986).

El estudio de los valores de las proteínas totales de los grupos control y tratado con *azatioprina*, reflejan un patrón similar en ambos grupos durante toda la fase experimental. Ésto indica que dicho fármaco no produce alteración del metabolismo proteico en esta especie (gráfica 9b).

La variación más pronunciada en este parámetro se refleja en el grupo tratado con *prednisona*. En este grupo experimental, los valores de las proteínas totales se incrementan progresivamente hasta la fase de retirada del tratamiento; posteriormente, las concentraciones regresan a niveles basales después de una semana de haber retirado el tratamiento (toma n° 12). Esta alteración tan marcada de las concentraciones de las proteínas totales de los conejos tratados con prednisona también aparecen cuando comparamos los

distintos grupos de tratamiento, observándose que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los animales del grupo de la prednisona respecto a los otros dos tratamientos inmunosupresores (histograma 9). No hemos podido encontrar bibliografía referente al tratamiento con prednisona en el conejo; no obstante, nuestros resultados coinciden por los aportados por Moore *et al.* (1992), donde se indica que el tratamiento con prednisona en el perro produce un incremento en las concentraciones plasmáticas de albúmina y en las proteínas totales.

Por todo lo anteriormente expuesto podemos indicar que en el conejo NZW tanto la ciclosporina como la prednisona alteran el metabolismo de las proteínas de nuestros animales. Además, no se restablece la normalidad hasta la semana de retirado el tratamiento, comprobándose una alteración en la funcionalidad hepática en el metabolismo de las proteínas en dichos grupos. Por el contrario, la azatioprina no afecta al metabolismo proteico llevado a cabo por el hígado.

Para evaluar la funcionalidad hepática sobre el *metabolismo de lípidos*, se determinaron el **colesterol total** (Gráfica y Tabla 10) y los **triglicéridos** (Gráfica y Tabla 11) (Coles, 1986a). El hígado interviene en varias fases del metabolismo de los lípidos; entre ellas, la síntesis, esterificación y excreción de colesterol. La esterificación del colesterol con ácidos grasos es una de las principales funciones del parénquima hepático (Coles, 1986a). En el momento de comparar nuestros resultados con los aportados por los diferentes autores hay que tener en cuenta que el nivel de colesterol está influenciado por factores genéticos, la dieta, el sexo, la estirpe e incluso existen variaciones circadianas en los niveles de colesterol que están reflejadas en las variaciones que experimentan las hormonas esteroides (Laird y Fox, 1970). Los valores de colesterol del grupo control coincide con los determinados por Jones (1975), que obtiene una media de  $76 \pm 1,98$  mg/dl y un margen de 50-110 mg/dl. Valores semejantes a los del grupo control de triglicéridos, han sido hallados por otros autores con márgenes de 45 -170 mg/dl (Fox *et al.*, 1974) y  $93,54 \pm 0,50$  mg/dl por Illera *et al.* (1992), con el mismo ciclo de luz/oscuridad y hora de la toma de muestras en la que se realizó nuestro estudio. Laird (1974) encuentra márgenes tan amplios como 7-

205 mg/dl.

Así, en los resultados obtenidos se aprecia un incremento en los valores de colesterol (del grupo tratado con *ciclosporina*) en la fase de retirada; aunque, en la última toma (n° 12), estos valores regresan a concentraciones semejantes a las de los controles. En el mismo grupo de tratamiento aparece reflejado un incremento en las concentraciones de los triglicéridos, prácticamente en toda la fase experimental y aún en la de retirada, aunque esta diferencia no se aprecia a la semana de retirado el tratamiento (gráficas 10a y 11a). Las variaciones producidas en el tratamiento con ciclosporina puede ser debido a una alteración a nivel hepático, aunque esto se produce fundamentalmente al final de la experimentación según nuestros resultados. Además, los resultados de nuestro estudio coinciden con los aportados por otros autores que indican que la ciclosporina puede ser potencialmente aterogénica e incrementar los niveles de colesterol (Henkin *et al.*, 1992).

Las concentraciones séricas de colesterol del grupo de animales que recibió el tratamiento con *azatioprina*, no refleja ninguna variación con respecto al grupo control, manteniendo unas concentraciones semejantes y estables durante todas las etapas experimentales. Un comportamiento semejante es el observado en las concentraciones de triglicéridos de los dos grupos anteriormente indicados. Estos resultados son indicativos de que este tratamiento no afecta al metabolismo lipídico de nuestros animales.

Por otro lado, los valores determinados en el grupo tratado con *prednisona* experimentan un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en todas las tomas experimentales, excepto en la toma n° 12, donde los valores son similares a los controles; es decir, los animales recuperan después de cesar el tratamiento durante una semana (gráfica 10c). Además, los triglicéridos séricos, están incrementados en casi todas las tomas del grupo de tratamiento con prednisona ( $p < 0,01$ ). Este parámetro es el principal componente del tejido adiposo y actúa como almacén de fuente de energía cuando por alguna causa disminuye el nivel de glúcidos disponibles (Laird, 1974 ); esto sucede en el tratamiento con glucocorticoides, produciéndose una acumulación de glucógeno en el hígado sintetizándose

a partir de la glucosa, por lo que ésta disminuye y se incrementan los triglicéridos en el plasma. Ésto coincide con los datos aportados por Fittschen y Bellamy (1984) en perros tratados con prednisona, donde se produce un acúmulo de glucógeno intrahepático que provoca una hepatomegalia coincidiendo con incrementos de colesterol y triglicéridos en el plasma.

Efectivamente, se sabe que los glucocorticoides sintéticos producen una alteración en el metabolismo lipídico, provocando un incremento de la movilización de los depósitos grasos y nueva redistribución de los mismos (Halliwell y Gorman, 1989). Además, los glucocorticoides pueden provocar hepatopatías (Rogers y Reubner, 1977; Fittschen y Bellamy, 1984). Por ello puede que, estas sean las causas de la elevación en las concentraciones de triglicéridos y colesterol total en suero de nuestros animales. Broyer *et al.* (1981) comprueba, en niños tratados con prednisona, como ésta produce un incremento en el colesterol y triglicéridos de los pacientes. Según los trabajos de Henkin *et al.* (1992), los corticoides son potencialmente aterógenos y pueden incrementar los niveles de lipoproteínas del colesterol y de los triglicéridos. Ésto también coincide con lo que indicaron Williams y Dluhy (1991), sobre la acción de los glucocorticoides sobre el metabolismo lipídico, aseverando que aceleran la aterogénesis y provocan hipertriglicidemia e hipercolesterolemia.

Tras el estudio de nuestros resultados concluimos indicando que los animales que recibieron el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina o con prednisona, tuvieron alteraciones a nivel del metabolismo de lípidos con incrementos en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos durante la etapa de tratamiento e incluso en las primeras tomas posteriores a la retirada del mismo. No ocurrió así en los animales a los que se les administró azatioprina, que no mostraron variabilidad en el metabolismo lipídico producido por el fármaco.

Como **pruebas bioquímicas de funcionalidad renal**, a los animales de nuestro estudio, se les determinó la **concentración de nitrógeno no proteico** en sangre: **urea y creatinina** (Gráfica y Tabla 12 y 13). Se procederá a discutir conjuntamente los resultados de ambos parámetros para una mejor explicación en la valoración de la función renal de nuestros animales.

Las concentraciones séricas de urea de los animales a los que se les administró *ciclosporina*, comparándolos con los del grupo control, indican que ambos grupos mantienen unos valores semejantes hasta la toma n° 8, donde se produce un incremento en las concentraciones de urea del grupo tratado, que se mantienen hasta la toma n° 11; sin embargo, en el análisis realizado a la semana de retirado el tratamiento, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Igualmente, la concentración de creatinina de los animales tratados mantiene niveles semejantes a los del grupo control; sin embargo, también se observa un incremento en las concentraciones a partir de la toma n° 8, en los animales tratados (gráficas 12a y 13a). Este aumento en las concentraciones de urea y creatinina en el grupo tratado se relaciona con el efecto que produce la ciclosporina en la funcionalidad renal, ya que Thliveris *et al.* (1991; 1995) estudiando los efectos nefrotóxicos de la ciclosporina en el conejo NZW con dosis hasta 10mg/kg/día durante 30 días, comprobaron que se producen alteraciones similares a las provocadas en humana con atrofia tubular, fibrosis intersticial y arteriopatía; debido a ello, se produce una disminución de aclaramiento de creatinina, ya que dicha disminución se correlaciona con un incremento en la creatinina sérica, lo cual es indicativo de una disminución en la filtración glomerular. La elevación neta de la creatinina en suero indica daño orgánico o funcional en la nefrona (Finco, 1989).

Además, nuestros resultados coinciden con los estudios de Yoshimura *et al.* (1993), sobre el efecto de la ciclosporina en el sistema microsomal renal citocromo P450. Los autores utilizaron ratas y conejos machos que fueron tratados con ciclosporina a dosis de 30 mg/kg/día vía oral durante 14 días. En la rata los niveles séricos de urea y creatinina aumentaron, indicando el desarrollo de una nefrotoxicidad a los 14 días. En el conejo, los

niveles de urea y creatinina se incrementaron a los 7 días de tratamiento. El P450 renal también aumentó en las dos especies tratadas. Los incrementos encontrados por estos autores, en los parámetros bioquímicos renales, coinciden con los encontrados en nuestro estudio, incluso en el tiempo de aparición ya que, como hemos visto anteriormente, el incremento aparece a los 8 días de iniciado el tratamiento. Además, Massicot *et al.* (1994), en el mismo tipo de estudio en el conejo, exploran los mecanismos de esta toxicidad. Para ello administraron ciclosporina durante 3 días a dosis de 50 mg/k, con ello consiguieron una nefrotoxicidad, valorada por las alteraciones histológicas y por un incremento de urea en sangre.

Uno de los mecanismos que intentan explicar los efectos nefrotóxicos inducidos por la ciclosporina se describe en los trabajos de Pham-Huy *et al.* (1995), que indican que la ciclosporina *in vivo* es fundamentalmente metabolizada por el citocromo hepático P450 IIIA además de en el microsoma renal. Para un mejor conocimiento del metabolismo de la ciclosporina desarrollaron un modelo *in vitro* incubando microsomas hepáticos y renales procedentes de conejos. Estos autores concluyen indicando que la metabolización de la ciclosporina por el microsoma renal es menor que en el hepático y que los metabolitos de la ciclosporina son menos citotóxicos que ésta. Por ello, la débil biotransformación renal sería la causa de la nefrotoxicidad, ya que gran parte de la ciclosporina queda sin metabolizar en este órgano. Éste mecanismo explicaría la causa de la alteración renal comprobada en nuestros animales por los incrementos producidos en las concentraciones plasmáticas de urea y creatinina.

El tratamiento de los animales con *azatioprina* reflejó que el fármaco administrado no produce alteraciones a nivel renal ya que los valores, tanto de urea como de creatinina, de este grupo de tratamiento y los del grupo control muestran una trayectoria semejante durante toda la experimentación. Existen pocos trabajos sobre la repercusión a nivel renal de la azatioprina, aunque está indicado como fármaco de elección en los trasplantes renales por no tener un efecto nefrotóxico marcado, coincidiendo con nuestros resultados y reafirmando lo descrito por Kromm *et al.* (1987), que indicaron que la azatioprina es menos

nefrotóxica que la ciclosporina.

En el caso de los animales tratados con *prednisona* se aprecia una elevación de las concentraciones de urea desde las 48 h de la primera administración del tratamiento (toma nº 3) hasta incluso la toma nº 11. Además, en los animales que recibieron el tratamiento con *prednisona*, se advierte un incremento al final de la fase de tratamiento e incluso en la fase de retirada de las concentraciones de creatinina (gráfica 12c y 13c). Como se ha comprobado anteriormente por los resultados obtenidos en las concentraciones de corticosterona y cortisol en los animales tratados con *prednisona*, este fármaco provoca una inhibición del eje HPA con disminución de los corticoides adrenales analizados, coincidiendo con Keller-Wood y Dallman (1984). Este hecho, según Behrend y Kemppainen (1997), conduce a una atrofia de la corteza adrenal que va a desencadenar una hipofunción corticoadrenal. Además, la retirada del tratamiento puede causar una crisis (Addisoniana) adrenal por la incapacidad del sujeto de secretar suficiente cantidad de glucocorticoides, durante un tiempo (Behrend y Kemppainen, 1997).

Los datos aportados por Melby (1977) indican que el tratamiento de altas dosis de corticoides produce una atrofia adrenal, en la mayoría de las especies, dentro de los 10 primeros días de haber comenzado el tratamiento. En gatos, animal menos sensible a los corticoides que el conejo, dosis de 2 mg/kg/día de prednisolona, producen una disminución de la respuesta adrenal en una semana (Middleton *et al.*, 1987). Según Kintzer y Peterson (1997), esta atrofia corticoadrenal conlleva una azotemia de origen prerrenal con incrementos en la urea y creatinina sérica, coincidiendo con nuestros resultados. Además, el balance electrolítico está alterado comprobándose una hiperkalemia e hiponatremia; este desequilibrio, según se conoce, incrementa la reabsorción a nivel del túbulo renal, disminuyendo la filtración glomerular. Además, los fármacos que producen aumento del catabolismo proteico como son los corticoesteroides, provocan un aumento de la urea sérica (Coles, 1986 b).

Las diferencias entre los distintos tratamientos se observan principalmente, en las

tomas finales, fundamentalmente por los incrementos en las concentraciones de urea y creatinina en los grupos tratados con ciclosporina y prednisona (histograma 12 y 13). Comparando nuestros datos de urea del grupo control con los de otros autores (Cuadro 2) observamos que están comprendidos en los márgenes de normalidad encontrados. Igualmente, los niveles de creatinina sérica alcanzados por el grupo control, durante toda la experimentación, se encuentran en el margen hallados por otros autores (Cuadro 2).

Tras el estudio de nuestros resultados y comparándolos con los de otros autores podemos concluir indicando que el tratamiento con ciclosporina produce una alteración renal con disminución de la filtración glomerular, aunque este hecho es reversible a la semana de la retirada del fármaco. Sin embargo, la prednisona provoca una atrofia de la corteza adrenal, que incluso puede ser más pronunciada por la retirada del tratamiento, lo que provoca un incremento en las concentraciones séricas de urea y creatinina en los animales de nuestra experimentación. Por el contrario, el tratamiento con azatioprina no produjo alteraciones renales en el conejo NZW y a las dosis utilizadas.

#### Valores de funcionalidad Renal en el Conejo

Cuadro 2

Autores	Urea	Creatinina
Kozma <i>et al.</i> (1974)	23,3 ± 5,2 <sup>a</sup> mg/dl	1,2 ± 0,10 <sup>a</sup> mg/dl
Mitruka y Rawnsley (1977)	13,1- 29,5 mg/dl	0,50 - 2,65 mg/dl
Kaneko (1989)		0,80 - 2,57 mg/dl
Illera <i>et al.</i> (1992)		1,20 ± 0,10 <sup>b</sup> mg/dl

a = media ± DS; b =Media ± ESM

# **CONCLUSIONES**

---

Después de realizar el análisis de los resultados obtenidos en nuestra experimentación, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1ª Conclusión:** El conejo macho Blanco de Nueva Zelanda puede servir de biomodelo para el estudio del sistema inmunológico y/o del eje endocrino adreno-gonadal, en las investigaciones que utilicen agentes inmunosupresores.
- 2ª Conclusión:** El tratamiento, tanto con ciclosporina como con azatioprina y/o prednisona, con una dosis similar a la utilizada en la especie humana, produce una disminución de la respuesta humoral del sistema inmune, en el conejo NZW, comprobada por una disminución de las concentraciones séricas de inmunoglobulinas G, durante el tiempo que duró la experimentación.
- 3ª Conclusión:** La acción de la ciclosporina y la azatioprina, sobre la funcionalidad de la corteza adrenal, demuestra que estos inmunosupresores producen una disfunción en la actividad de dicha glándula con una alteración en la esteroidogénesis, reflejada por el incremento en las concentraciones séricas de corticosterona y cortisol (*hiperadrenocorticismo*). Sin embargo, la prednisona mostró el efecto contrario, al provocar una disminución de las concentraciones séricas de dichas hormonas glucocorticoides (*hipoadrenocorticismo*) y producir además, una inhibición de la función adrenal.
- 4ª Conclusión:** En la función gonadal, el tratamiento con ciclosporina produjo altas concentraciones de androstenodiona, pero bajos niveles de testosterona y estradiol, mostrando una variación en la vía de conversión de la esteroidogénesis testicular. Sin embargo, no se produjo ninguna disfunción de la secreción hormonal testicular en los conejos tratados con azatioprina

**5ª Conclusión:** Las pruebas bioquímicas realizadas para valorar la funcionalidad hepática (ASAT, ALAT, proteínas totales, colesterol y triglicéridos) y renal (urea y creatinina) indicaron que el fármaco inmunosupresor azatioprina no alteró las funciones de dichos órganos, mientras que sí están alteradas en el tratamiento con ciclosporina, siendo la prednisona la que produjo una mayor disfunción hepática y renal, ya que mantuvo niveles elevados de todos los parámetros incluso después de 48h de cesar el tratamiento.

**Conclusión final:** De los tres inmunosupresores utilizados, podemos indicar que la azatioprina es el fármaco que provoca menor disfunción orgánica en el conejo NZW; sin embargo, los tres agentes ejercen un efecto en la secreción adrenal y/o gonadal, poniendo de manifiesto la intercomunicación existente entre Sistema Inmune-Sistema Endocrino.

# **RESUMEN**

En los últimos años, la Inmunología ha experimentado un gran avance debido a la necesidad de conocer mejor su funcionamiento y las relaciones que tiene con otros sistemas orgánicos. Todo ello ha permitido obtener un mayor conocimiento sobre importantes alteraciones orgánicas producidas por un desajuste en las funciones inmunológicas, sobre todo desde la aparición de enfermedades como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. La importancia de la farmacología en la resolución de las diferentes alteraciones en este campo, ha conseguido obtener sustancias tan importantes como los agentes inmunosupresores, de gran valía en la prevención del rechazo en los trasplantes o en ciertas enfermedades autoinmunes. El interés que despierta el conocimiento de estas relaciones llevó a considerar la posibilidad de estudiarlas sobre un animal sano, administrándole diferentes sustancias inmunosupresoras con distintos mecanismos de acción. Así, se eligieron la *ciclosporina*, la *azatioprina* y la *prednisona*, que representan una de las combinaciones farmacológicas más frecuentemente utilizadas en humana, pero de las que aún poco se conoce sobre su acción individual en los protocolos que necesitan una inmunosupresión.

En la parte experimental del presente trabajo, se utilizaron cuarenta conejos machos jóvenes (*Oryctolagus cuniculus*). El grupo I (control) y los grupos II (ciclosporina), III (azatioprina) y IV (prednisona) fueron constituidos con animales tratados con los diferentes inmunosupresores. La pauta de tratamiento del grupo II consistió en la administración de una dosis diaria de 10 mg/kg de ciclosporina. El grupo III fue tratado con una dosis inicial de 5 mg/kg de azatioprina (i.v.) y después se mantuvo a una dosis diaria de 2,5 mg/kg (v.o.). Al grupo IV se le administró prednisona a una dosis de 2 mg/kg/día. La experimentación finalmente, se dividió en las siguientes etapas: a) inicial; corresponde al primer día; b) tratamiento; los animales problema recibieron una dosis diaria de cada diferente inmunosupresor con la pauta indicada anteriormente; la duración de esta etapa fue de ocho días; c) finalización del tratamiento, tomando una muestra sanguínea a las 24 y 48 horas de la última administración y repitiéndola una semana después.

El primer objetivo de nuestro trabajo fue comprobar si las diferentes terapias provocan una inmunosupresión en conejos; para ello se estudiaron, en primer lugar, las concentraciones de inmunoglobulina G determinadas por la técnica EIA sandwich, tras su validación y puesta a punto. Después de realizar el análisis de los resultados obtenidos se dedujo, que el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina, azatioprina o prednisona, produjo una disminución de las inmunoglobulinas G circulantes sintetizadas como consecuencia de la exposición a los antígenos ambientales en el conejo. Si bien, no inhibió completamente la formación de anticuerpos y además, la retirada de los tratamientos produjo la vuelta a la normalidad de las concentraciones séricas de IgG.

Posteriormente, se quiso comprobar si un cambio en el estado inmunológico de los animales podía ejercer alguna acción sobre el sistema endocrino (eje adreno-gonadal); tanto sobre la glándula adrenal (determinando los niveles de cortisol y corticosterona) como sobre la funcionalidad gonadal, (analizando los perfiles de las hormonas androstenodiona, testosterona y 17 $\beta$ -estradiol). Todas las hormonas esteroideas se determinaron por la técnica EIA de competición.

Tras el estudio de la actividad de la glándula adrenal, se pudo indicar que los tratamientos inmunosupresores con *ciclosporina* y *azatioprina*, incrementaron las concentraciones de los glucocorticoides adrenales debido al efecto de los fármacos sobre el flujo sanguíneo y la acción que producen sobre la interleucina 6. El efecto contrario fue el producido en los animales tratados con *prednisona*, fundamentalmente por actuar inhibiendo el eje HPA y por su acción sobre la IL-1. De esta manera, se constató la relación existente entre el sistema inmune y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, considerándose la corteza adrenal un punto importante de integración de sistemas inmune y neuroendocrino.

Además se puso de manifiesto las relaciones existentes entre la corteza adrenal y la gónada, ya que, con la ciclosporina, se alteró la secreción por parte de la corteza adrenal y ésta provocó un efecto de retrofuncionalidad sobre el eje HPG, modificando la secreción gonadal. La prednisona afectó de diferente forma a la gónada, y la posible alteración que

este inmunosupresor pudo producir se tradujo en un aumento de androstenodiona. Por los resultados obtenidos, podemos indicar que la azatioprina no afectó a la secreción de las hormonas testiculares analizadas, pudiendo no afectar a la funcionalidad gonadal de los animales.

Por otro lado, se valoró la funcionalidad hepática mediante la determinación de las siguientes enzimas hepáticas: ALAT y ASAT. Además se estudiaron diferentes parámetros que afectan al metabolismo de las proteínas: concentración sérica de las proteínas totales; el metabolismo de los lípidos: colesterol total y las concentraciones de los triglicéridos. Podemos indicar que los tres inmunosupresores afectan de forma diferente en cuanto a la actividad de las enzimas hepáticas, comprobándose que la *ciclosporina* tiene un efecto puntual sobre la funcionalidad hepática, sin comprometer la integridad del órgano. Además, los animales tratados tuvieron alteraciones a nivel del metabolismo de lípidos con incrementos en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos. El efecto de la prednisona fue más acusado, observándose un incremento en las concentraciones de ALAT y ASAT, lo que indicó una alteración celular hepática. También se alteró el metabolismo de las proteínas y el lipídico. En cuanto al tratamiento con azatioprina, se puede indicar que provocó una leve afectación del hígado cuando se utilizaron dosis elevadas, restableciéndose la funcionalidad y no viéndose afectado el metabolismo proteico ni lipídico cuando se administró el fármaco a dosis de mantenimiento.

Finalmente, también se determinaron parámetros bioquímicos relacionados con la funcionalidad renal, como la urea y la creatinina séricas, indicando que el tratamiento con ciclosporina produjo una alteración renal con disminución de la filtración glomerular; sin embargo, éste hecho fue reversible a la semana de la retirada del fármaco. Por otro lado, la prednisona provocó un incremento en las concentraciones séricas de urea y creatinina, provocando incluso un efecto acumulativo que se manifestó en el periodo de retirada del tratamiento. El tratamiento con azatioprina no produjo alteraciones renales en el conejo NZW a las dosis utilizadas.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos indicar que de los tres inmunosupresores estudiados, la azatioprina es el que produjo un menor daño orgánico, al menos a nivel hepático y renal, no apareciendo tampoco alteraciones a nivel del eje adrenergico, como sí que sucedió en el tratamiento con ciclosporina.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Ablin RJ, Bruns GR, Guinan P y Bush IM (1974).- The effect of estrogen on the incorporation of 3H-thymidine by PHA-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* **113**: 705-707

Álvarez-Mon A, Kehrl JH y Fauci AS (1985).- A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions. *J Immunol* **135**: 3823-3826

Álvarez de Mon M. y García J (1992).- Desarrollo de la respuesta del sistema inmunitario. En: *Fisiología Humana*, Ed, JAF Tresguerres. McGraw-Hill Interamericana, España. pp 406-411

Amzel LM y Poljak RJ (1979).- Tree-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann Rev Biochem* **48**: 961-997

Andersen HO, Madsen G, Nordestgaard BG, Hansen BF, Kjeldesen K y Stender S (1994).- Cyclosporin suppresses transplant arteriosclerosis in the aorta-allografted, cholesterol-clamped rabbit. *Arterioscler Thromb* **14**: 944-950

Andreis PG, Neri G, Belloni AS, Mazzocchi G, Kasprzak A y Nussdorfer GG (1991).- Interleukin-1 b enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology* **127**: 849-856

Andreis PG, Tortorella C, Mazzocchi G y Nussdorfer GG (1998).- Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide inhibits aldosterone secretion of human adrenocortical and Conn's adenoma cells: comparison with adrenomedullin effect. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 253-257

Ansar Ahmed S, Penhale WJ y Talal N (1985).- Sex hormones, immune response, and autoimmune diseases. *Am J Path* **125**: 531-551

Ansar Ahmed S y Talal N (1990).- Sex hormones and the immune system-part2. Animal data. *Bailliere's Clinical Rheumatology* **4**: 13-31

- Ansar Ahmed S, Talal N y Christadoss P (1987).- Genetic regulation of testosterone-induced immune suppression. *Cell Immunol* **104**: 91-98
- Astorquiza MI, Cisternas C y Leal X (1987).- Sex-dependent differences in the IgE response modulated by phytohemagglutinin. *Immunol Letts* **16**: 27-30
- Bambino TH y Hsueh AJW (1981).- Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* **108**: 2142-2148
- Bankert RB y Mazzaferro PK (1989).- Immunoglobulins. En: *The Clinical Biochemistry of Laboratory Animals*. Loeb WF y Quimby FW Eds. Pergamon Press, Inc. pp 118-141
- Barak V, Shoshana B, Halimi M y Treves AJ (1986).- The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. II. Mechanism of enhancing activity of colony formation. *J Prod Immunol* **7**: 325-335
- Behrend EN y Kempainen RJ (1997).- Glucocorticoid Therapy. Pharmacology, indications and complications. Adrenal disorders. En: *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*. Ed: PP Kintzer. WB Saunders company. Philadelphia. pp 187-213
- Bell S y Fahey J (1964).- Relationship between  $\gamma$ - globulin metabolism and low serum  $\gamma$ - globulin in germ-free mice. *J Immunol* **93**: 81-87
- Berembaum MC (1960).- Effects of cytotoxic agents on antibody production. *Nature* **185**: 167-168
- Besedovsky HO, Del Rey A, Sorkin E y Dinarello C (1986).- Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science Wash DC* **233**: 632-654
- Blackham A y Griffiths RJ (1991).- The effect of FK506 and cyclosporin A on antigen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* **86**: 224-228

- Blalock JE y Smith EM (1985).- A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems. *Federation Proceedings* **44**: 108-111
- Blalock JE (1989).- A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* **69**: 1-32
- Blazkovec AA, Orsini MW y Maginn PC (1973).- Sexual dimorphism in the primary immune response of the syrian hamster. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **46**: 274-281
- Blazkovec AA y Orsini MW (1976).- Ontogenic aspects of sexual dimorphism and the primary immune response to sheep erythrocytes in hamsters from prepuberty through senescence. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **50**: 55-59
- Borel JF, Feurer C, Gubler HU y Stahelin H (1976) .- Biological effect of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions* **6**: 468-475
- Borel JF y Ryffel B (1985).- The mechanism of action of ciclosporin: A continuing puzzle. En: *Ciclosporin in autoimmune disease*. Springer. Berlin Heidelberg. pp. 23-54
- Bouhnik Y, Lemman M, Mary JY, Scemama G, Tai R, Matuchansky C, Modigliani R y Rambaud JC (1996).- Long-term follow up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet* **13**; **347**: 1049-1050
- Brahn E, Peacock DJ y Banquerigo ML (1991).- Suppression of collagen-induced arthritis by combination cyclosporin A and methotrexate therapy. *Arthritis-Reum* **34**: 1282-1288
- Brambell FWR (1966).- The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* **ii**: 1087-1093
- Brannstrom M, Norman RJ, Seamark RF y Robertson SA (1994).- Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol Reprod* **50**: 88-94

- Brick JE, Wilson DA y Walker SE (1985).- Hormonal modulation to thymus-dependent antigens in autoimmune NZB/W mice. *J Immunol* **134**: 3693-3698
- Broockfor FR y Schwarz LK (1991).- Effects of interleukin-6, interleukin-2 and tumor necrosis factor a on transferrin release from sertoli cells in culture. *Endocrinology* **129**: 256-262
- Brown SL y Blalock JE (1990).- Neuroendocrine immune interactions En: *Immunophysiology* Eds, JJ Oppenheim y EM Shevach. Oxford University Press. pp 306-319
- Broyer M, Tete MJ, Laudat MH y Goldstein S (1981).- Plasma lipids in kidney transplanted children and adolescents: influence of pubertal development, dietary intake and steroid therapy. *Eur J Clin Inves* **11**: 397-402
- Bush IE (1953).- Species differences in adrenocortical secretion. *J Endocrinol* **9**: 95-100
- Burnet MF (1957).-A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci* **20**: 67-69
- Bussiere JL, Mather GG y Exon JH (1991).- Effect of cyclosporine on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis and immune responses in the rat. *Immunobiology* **182**: 205-215
- Butler WT (1974).- Methyl prednisolone fails to inhibit primary and secondary antibody responses but causes marked suppression of on-going antibody formation in man. *J Clin Invest* **53**: 14A
- Butler WT y Rossen RD (1973).- Effects of corticosteroids on immunity in man. I. Decreased serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high dose methylprednisone. *J Clin Invest* **52**: 2629-2640
- Butterworth MB, McClellan B y Alansmith M (1967).- Influence of sex on immunoglobulin levels. *Nature (Lond)* **214**: 1224

- Calne RY (1960).- The rejection of renal homografts: inhibition in dogs by 6-mercaptopurine. *Lancet* **1**: 417
- Calne RY (1979).- Pharmacological Immunosuppression in clinical organ grafting observations on four agents: cyclosporin A, azathioprine, lambda carrageenan and promethazine hydrochloride. *Clin Exp Immunol* **35**: 1-9
- Calne RY y White DJG (1977).- Cyclosporin A- a powerful immunosuppressant in dogs with renal allografts. *IRSC Med Sci* **5**: 595
- Candy S, Gerbe M, Adams G, Gerin M y Goodman R (1995).- A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* **37**: 674-678
- Carey MP, Detend CH, De Koning J, Helmerhorst F y De Kloet ER (1995).- The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol.* **144**: 311-321
- Castro JE (1974a).- Orchidectomy and the immune response.I. Effect of orchidectomy on lymphoid tissue of mice. *Proc R Soc London Ser B* **185**: 425-436
- Castro JE (1974b).- Orchidectomy and the immune response.II. Response of Orchidectomized mice to antigen. *Proc R Soc London Ser B* **185**: 437-451
- Castro JE (1975).- Immunological effects of orchidectomy. *Br J Urol* **47**: 89
- Catsoulis EA, Frankil EC, Oratz M y Rothschild MA (1964).- Gamma globulin metabolism in rabbits during the anamnestic response. *J Exp Med* **119**: 615-631
- Chikanza IC (1996).- The neuroendocrine immunology of rheumatoid arthritis. *Bailliere's Clinical Rheumatology* **10**: 273-293

- Chrousos GP y Gold PW (1992).- The concepts of stresses and stress system disorders. *J Am Med Assoc* **263**: 1244-1252
- Claman HN (1987).- Corticosteroids: immunologic and anti-inflammatory effects. En: *Hormones and Immunity*. Ed Berczi I y Kovacs K. MTP Press Limited. Lancaster England. pp 38-42
- Clampitt RB y Hart RJ (1978).- The tissue activities of some diagnostic enzymes in ten mammalian species. *J Comp Pathol*. **88**: 607-621
- Cohen DJ, Loerscher R, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB y Strom TB (1984).- Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intl Med* **101**: 667-682
- Cohn DA (1979a).- Sensitivity to androgen. A possible factor in sex differences in the immune response. *Clin Exp Immunol* **38**: 218
- Cohn DA (1979b).- High sensitivity to androgen as a contributing factor in sex differences in the immune response. *Arthritis Rheum* **22**: 1218
- Cohn DA (1986).- Low immune response in high androgen response C57BR/cdj males. *Clin Exp Immunol* **63**: 210-217
- Coles EH (1986a).- Liver function. En: *Veterinary Clinical Pathology*. Ed, E.H. Coles. W.B. Saunders Company Philadelphia. pp 129-151
- Coles EH (1986b).- Kidney function. En: *Veterinary Clinical Pathology*. Ed: EH Coles. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 171-202
- Conley AJ y Bird IM (1997).- The role of cytochrome P450 17a-hydroxylase and 3b-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the D5 and D4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* **56**: 789-799

- Cornelius CE (1989).- Liver function. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed, JJ Kaneko. Academic Press, Inc. pp 364-397
- Cunningham ET Jr y De Souza EB (1993).- Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today* **14**: 171-176
- Deichmiller MP y Dixon FJ (1960).- The metabolism of serum proteins in neonatal rabbits. *J Gen Physiol* **43**: 1047-1059
- Delacroix DL, Dive C, Rambaud JC y Vaerman JP (1982).- IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology* **47**: 383-385
- Delaere PR, Liu Z, Sciot R y Welvaart W (1996).- The role of immunosuppression in the long-term survival of tracheal allografts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122**: 1201-1208
- Denckla WD (1978).- Interactions between age and the neuroendocrine and immune systems. *Federation Proc* **37**: 1263-1267
- Dorrington KJ (1985).- The functional differentiation of the Fc region of immunoglobulin G. *Ann Inst Pasteur/Immunol* **136C**: 260-263
- Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U y Waxdal MJ (1969).- The covalent structure of an entire  $\gamma$ -G immunoglobulin molecule. *Biochemistry* **63**: 78-85
- Elion GB (1967).- Biochemistry and pharmacology of purine analogs. *Fed Proc* **26**: 898-904
- Elion GB y Hitchings GH (1965).- Metabolic basis for the actions of analogs of purines and pyrimidines. *Adv Chemother* **2**: 91-177
- Engelhard VH (1994).- Presentación celular de los antígenos. *Investigación y Ciencia* **217**: 44-51

- Esmatjes E, Ricart MJ, Ferrer JP, Oppenheimer F, Vilardell J y Casamitjana R (1991).- Cyclosporine's effect on insulin secretion in patients with kidney transplants. *Transplantation (Baltimore)* **52**: 500-503
- Fauci AS, Murakami T, Brandon DD, Loriaux DL y Lipset MB (1980).- Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulation. VI. Lack of correlation between glucocorticosteroid receptors and the differential effects of glucocorticoids on T-cell subpopulations. *Cell Immunol* **49**: 43-50
- Feldmann M. y Male D (1991).- Cooperación celular en la respuesta de anticuerpos. En: *Inmunología*. Eds: IM Roitt, J Brostoff y DK Male . Salvat. pp 8.1-8.11
- Ferguson CJ, Von Rruhand C, Parry-Jones DJ, Griffiths DFR, Salaman JR y Williams JD (1993).- Low-dose cyclosporin nephrotoxicity in the rat. *Nephrology Dialysis Transplantation* **8**: 1259-1263
- Ferry JJ y Wagner JG (1987).- The nonlinear pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. II. Plasma protein binding of prednisone and prednisolone in rabbit and human plasma. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* **8**: 261-272
- Figaredo Delgado MA, Medina MT, Boimorto R y Gómez de la Concha E (1992).- Antígenos y anticuerpos. En: *Inmunología*. Ed: Gómez de la Concha E. IDEPSA. pp 36-45
- Fineo DR (1989).- Kidney function. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed: JJ Kaneko. Academic Press, Inc. pp 496-542
- Fittschen C y Bellamy JE (1984).- Prednisone-induced morphologic and chemical changes in the liver of dogs. *Vet Pathol* **21**: 399-406
- Fox RR, Laird CW y Kirshenbaum J (1974).- Effects of strain, sex and circadian rhythm on rabbit serum bilirubin and iron levels. *Proc Soc Exp Biol Med* **145**: 421-427

- Frangione B y Milstein C (1967).- Disulphide bridges of immunoglobulin G1 heavy chains. *Nature* **216**: 931-941
- Frey BM, Walker C, Frey FJ y De Weck AL (1984).- Pharmacokinetics and pharmacodynamics of three different prednisolone prodrugs: effect on circulating lymphocytesubsets and function. *J Immunol* **133**: 2479-2487
- Fryer J, Yatscoff RW, Pascoe EA y Thliveris J (1993).- The relationship of blood concentrations of rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Transplantation* **55**: 340-345
- Fujii H, Nawa Y, Tsuchiya H, Matsuno K, Fukumoto T, Fukuda S y Kotani M (1975).- Effect of a single administration of testosterone on the immune response and lymphoid tissues in mice. *Cell Immunol* **20**: 315-326
- Fujita M, Iida H, Asaka M, Izumino K, Takata M y Sasayama S (1991).- Effect of the immunosupresive agent, cyclosporin, on experimental immune complex glomerulonephritis in rats. *Nephron* **57**: 201-205
- Ganjam VK, Cambell AL y Murphy BEP (1972).- Changing patterns of circulating corticosteroids in rabbits following prolonged treatment with ACTH. *Endocrinology* **91**: 607-611
- Gillis S, Craftree GR y Smith KA (1979).- Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* **123**: 1624-1631
- Geenen V, Robert F, Legros JJ, Defresne MP, Boniver J, Martial J, Lefebvre PJ y Franchimont P (1991).- Neuroendocrine-immunology: from systemic interactions of the immune tolerance of self neuroendocrine functions. *Acta Clinica Belgica* **46.3**: 135-141

- Glass AR, Mellitt R, Vigersky RA y Swerdloff RS (1979).- Hipoandrogenism and abnormal regulation of gonadotropin secretion in rats fed a low protein diet. *Endocrinology*. **104**: 438-442
- Goldberg VM y Lance EM (1972).- Revascularization and accretion in transplantation. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **54A (4)**: 807-816
- Gómez de la Concha E, Boimorto R y Fernández L (1992a).- Introducción a la inmunología clínica. En: *Inmunología*. Ed: Gómez de la Concha E . IDEPSA, Madrid España. pp 3-13
- Gorevic PD, Prelli FC y Frangione B (1985).- Immunoglobulin G (IgG). En: *Methods in Enzymology* **116**: 3-25
- Grady JG, Forbes A, Rolles K, Calne RY y Williams R (1988).- An analysis of cyclosporine efficacy and toxicity after liver transplantation. *Transplantation* **45**: 575-579
- Greene CE (1979).- Myopathy associated with hyperadrenocorticism in the dog. *J Am Vet Med Assoc* **174**: 1310
- Grossman CJ (1984).- Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews* **5**: 435-455
- Grossman CJ (1985).- Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**: 257-261
- Grossman CJ, Sholiton LJ y Roselle GA (1982).- Estradiol regulation of thymic lymphocyte function in the rat: mediation by serum thymic factors. *J Steroid Biochem* **16**: 683-690
- Grossman CJ, Sholiton LJ y Roselle GA (1983).- Dihydrotestosterone regulation of thymocyte function in the rat: mediation by serum factors. *J Steroid Biochem* **19**: 1459-1467

- Grossman CJ y Roselle GA (1983).- The interrelationship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. *J Steroid Biochem* **19**: 461-467
- Guyton AC (1988).- Hormonas corticosuprarrenales. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Ed: AC Guyton. Interamericana McGraw-Hill. España. pp 900-912
- Halliwell REW y Gorman NT (1989).- Anti-inflammatory drugs, immunosuppressive agents, and immunomodulators. En: *Veterinary Clinical Immunology*. Eds: REW Halliwell y NT Gorman . W.B Saunders Company, Philadelphia. pp 493-507
- Halpern MS y Koshland ME (1970).- Novel subunit of secretory IgA. *Nature* **228**: 1276-1278.
- Hay FC (1991).- Generación de la diversidad. En: *Inmunología*. Eds: I Roitt, J Brostoff J y D Male. Salvat Editores SA, 2ª edición. pp 6.1-6.12
- Haynes RC y Murad F (1986).- Hormona adrenocorticotrófica, esteroides adrenocorticales (corticosuprarrenales) y sus análogos sintéticos; inhibidores de la biosíntesis de esteroides corticosuprarrenales. En: *Goodman y Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Eds: AG Gilman, LS Goodman, TW Rall y F Murad. pp 1384-1411
- Hayzer DJ y Jatón JC (1985).- Immunoglobulin M (IgM). En: *Methods in Enzymology* **116**: 26-35
- Henkin Y, Como JA y Oberman A (1992).- Secondary dyslipidemia. Inadvertent effects of drugs in clinical practice. *J Am Med Assoc* **267**: 961-968
- Hestin D, Mertes PM, Hubert J, Claudon M, Mejat E, Renoult E, Pertek JP, Frimat L, Burlet C y Kessler M (1997).- Relationship between blood pressure and renin, angiotensin II and atrial natriuretic factor after renal transplantation. *Clin Nephrol* **48**: 98-103
- Hirano T, Oka K, Sakurai E, Tamaki T y Kozaki M (1991).- Impaired prednisolone sensitivities of the endocrine system and peripheral-blood lymphocytes are closely related to clinical incidence in renal transplantation. *J Pharmacy and Pharmacology* **43**: 569-573

- Hirota Y, Suzuki T y Bito Y (1980).- The development of unusual B-cell functions in the testosterone propionate- treated chickens. *Immunology* **39**: 29-36
- Hitchings GH y Elion GB (1963).- Chemical suppression of the immune response. *Pharmacol Rev* **15**: 365
- Hofmann FG (1956).- Observations on in vitro adrenal steroid synthesis in the albino mouse. *Endocrinology* **59**: 185-191
- Hoffmann WE, Kramer J, Main AR y Torres JL (1989).- Clinical enzymology. En: *The Clinical Chemistry of Laboratory animals*. Eds: WF Loeb y FW Quimby. Pergamon Press Inc. pp 237-278
- Holdstock G, Chastenary BF y Lerawitt EL (1982).- Effects of testosterone, estradiol and progesterone on immune regulation. *Clin Exp Immunol* **47**: 449-456
- Holaday JW (1991).- Neuroendocrine-immune interactions and their relevance to the pharmacology of critical care medicine. *Klin Wochenschr Suppl XXVI* **69**: 13-19
- Hu S-K, Mitcho YL y Rath NC (1988).- Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmac* **10**: 247-252
- Humphrey JH y McFarlane AS (1954).- Rate of elimination of homologous globulins (including antibody) from the circulation. *Biochem J* **57**: 186-191
- Illera JC, Brooks DI, Illera MJ, Silván G e Illera M (1990).- Repercusiones hematológicas de las extracciones sanguíneas reiteradas de sangre en el conejo NZW. *Rev Exp Anim* **1**: 53-58
- Illera JC, Silván G e Illera M (1992a).- Obtención de anticuerpos frente a esteroides para estudios inmunológicos. *An Real Acad Farm* **58**: 475-482

- Illera JC, Silván G, Lorenzo P, Portela A, Illera MJ e Illera M (1992b).- Variaciones fotoperiódicas de algunas constantes de la bioquímicas sanguínea del conejo. *Rev Esp Fisiol* **48**: 7-12
- Illera JC, Silván G, Illera MJ e Illera M (1993a).- Steroid hormone profiles in several domestic species and the methodology for determination thereof. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology. Trivandrum, India*. pp.869-879
- Illera JC, Silván G, Portela A, Illera MJ, Illera M, García Alonso L, Cornelissen G y Halberg F (1993b).- Circadian cortisol rhythm of rabbits kept on different lighting regimens. *Chronobiologia* **20**: 219-232
- Illera JC, Munro CJ, Silván G, BonDurant RH e Illera M.(1996).- Development of a simple, rapid sandwich enzyme immunoassay for the measurement of serum rat LH. *J Physiol Biochem* **52**: 95-102
- Illera JC, Lorenzo PL, Silván G, Munro C, Illera MJ e Illera M (1997).- Enzimoimmunoassay for testosterone and androstenedione in culture maturation medium from rabbit oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **47**: 1375-1388
- Illera M (1984).- Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. Ed: M Illera. Colibac, Madrid, España. pp 146-184
- Illera M (1994).- Diccionario de Acrónimos con Símbolos y Abreviaturas para las Ciencias de la Salud. Fundación Wellcome, España
- Imura H y Fukata JI (1994).- Endocrine-paracrine interactions in communication between the immune and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammation. *Eur J Endocrinol* **130**: 32-37
- Ishizaka K (1985).- Immunoglobulin E (IgE). En: *Methods in Enzymology* **116**: 76-93

- Jackson NM, Hsu CH y Visscher GE (1987).- Alterations in renal structure and function in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 749-756
- Jerne NK (1955).- The natural-selection theory of antibody formation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. **41**: 849-857
- Jerne NK (1974).- Towards a network theory of the immune system. *Annals of Immunology/Inst. Pasteur (Paris)* **125C**: 373-389
- Johnson HM, Smith EM, Torres BA y Blalock JE (1982).- Neuroendocrine hormone regulation of in vitro antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4171-4174
- Jones RT (1975).- Normal values for some biochemical constituents in rabbits. *Lab Anim*. **9**: 143-147
- Kaneko JJ (1989a).- Normal Blood analyte values in small and some laboratory animals. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed: JJ Kaneko. Academic Press, Inc. pp 892-897
- Kaneko JJ (1989b).- Serum proteins and the dysproteinemias. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed: JJ Kaneko. Academic Press, Inc. pp 142- 165
- Kappas A, Jones HEH y Roitt IM (1963).- Effect of sex hormones on immunoglobulin phenomena. *Nature* **198**: 902
- Keller-Wood ME y Dallman MR (1984).- Corticosteroids inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* **5**: 1-24
- Khalafallah N y Jusko WJ (1984).- Tissue distribution of prednisolone in the rabbit. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **229**: 719-725.

- Kiberd BA (1989).- Cyclosporine-induced renal dysfunction in human renal allograft recipients. *Transplantation* **48**: 965-969
- Kim PCW, Cohen Z, Wong PY, Craig M, Cullen J y Levy GA (1990).- Cyclosporine A vs Cyclosporine A metabolites: comparison of in vivo and in vitro immunosuppressive and toxic effects. *Transplantation Proc* **22**: 2487-2490
- Kintzer PP y Peterson ME (1997).- Primary and secondary canine hypoadrenocorticism. Adrenal disorders. En: *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice*. Ed: PP Kintzer. WB Saunders company, Philadelphia. pp 349-357
- Kissel JT, Levy RJ, Mendell JR y Griggs RC (1986).- Azathioprine toxicity in neuromuscular disease. *Neurology*. **36**: 35-39
- Kitani K, Machida J, Wada Y, Yoshida H y Ueda S. (1996).- Effect of cyclosporin A on isolated rabbit bladder and urethral smooth muscle. *Int J Urol* **3**: 145-149
- Kittas C y Henry L (1979).- Effect of sex hormones on the immune system of ginea-pig and on the development of toxoplasmic lesion in non-lyphoid organs. *Clin Exp. Immunol* **36**: 16-23
- Kochakian CD (1976).- Body and organ weights and composition. En *Anabolic-Androgenic Steroids*. Ed: CD Kochakian. Handbook of experimental pharmacology, new series, Vol 43, Springer-verlua Beril, pp 73-154
- Koyle MA, Sikka SC, Lemmi C y Rajfer J (1986).- Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Surg Forum* **37**: 471
- Kozma C, Macklin W, Cummins L M y Maver R. (1974).- En: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Eds: S.H Weisbroth., R.E. Flatt y A.L. Kraus. Academic Press, New York. pp 1-54

- Kraus AL, Weisbroth SH, Flatt RE y Brewer N (1984).- Biology and diseases of rabbits. En: *Laboratory Animal Medicine*. Eds: JG Fox, BJ Cohen y FM Loew . Academic Press, Inc. pp 207-240
- Krom RA, Wiesner RH, Haagsma EB, Ludwig J, Gips CH, Grond AJ y Houthoff HJ (1987).- A comparison of azathioprine and cyclosporine in liver transplantation: a study of two personal series. *Transplan Proc* **19**: 2440-2442
- Krueger BA, Trakshel GM, Sluss PM y Maines MD (1991).- Cyclosporine-mediated depression of luteinizing hormone receptors and heme biosynthesis in rat testes: A possible mechanism for decrease in serum testosterone. *Endocrinology* **129**: 2647-2654
- Kullmann F, Kullmann M, Leser HG, Kramer BK, Riegger AJ y Scholmerich J (1996).- Nephrotic syndrome as the initial symptom of Crohn disease. *Z Gastroenterol* **34**: 757-762
- Kurunzi S y Mark I (1993).- The effect of cyclosporin A on rabbit nephrotoxic glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol* **74**: 55-63
- Kuwahara M, Jacobsson J, Kuwahara M, Kagan E, Ramwell PW y Foegh ML (1991).- Coronary artery ultrastructural changes in cardiac transplant atherosclerosis in the rabbit. *Transplantation* **52**: 759-65
- Lafferty KJ, Borel JF y Hodgkin P (1983).- Cyclosporine A (CsA): model of the mechanism of action. *Transplant Proc* **15(1)**: 2230-2241
- Laine J, Fyhrquist F y Holmberg C (1994).- Effect of donor source on renal allograft function in children on triple immunosuppression. *Nephrology Dialysis Transplantation* **9**: 1468-1473
- Laine J y Holberg C (1995).- Renal and adrenal mechanisms in cyclosporine-induced hyperkalaemia after renal transplantation. *J Clin Invest* **25**: 670-676

- Laine J, Jalanko H, Leijala M, Sairanen H y Holmberg C (1997).- Kidney function in cyclosporine-treated pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. **16**: 1217-1224
- Laird CW y Fox RR (1970).- Diurnal variations in rabbits: biochemical indicators of thyroid function. *Life Science* **9 (2)**: 191-202
- Laird CW (1972).- Representative values for animal and veterinary populations and their clinical significances. Hycel, Inc., Houston. pp 23-64
- Laird CW (1974).- Clinical pathology: blood chemistry. En: *Handbook of Laboratory Animal Science Vol II*. Ed, EC Melby y NH Altman. CRC Press, Cleveland, Ohio. pp 345-436
- Lamm ME y Small PA (1966).- Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins II. M immunoglobulin. *Biochemistry* **5**: 267-276
- Leibowitz HM y Elliott JH (1966 a).- Chemotherapeutic immunosuppression of the corneal graft reaction. I. Systemic antimetabolites. *Archiv Ophthalmol* **75**: 826-835
- Leibowitz HM y Elliott JH (1966 b).- Chemotherapeutic immunosuppression of the corneal graft reaction. II. Combined systemic antimetabolites and topical corticosteroid therapy. *Archiv Ophthalmol* **76**: 338-344
- Lindholm A, Pousette A, Carlstrom K y Klintmalm G (1988).- Ciclosporin-associated hypertrichosis is not related to sex hormone levels following renal transplantation. *Nephron* **50**: 199-204
- Lipinski M, Tursz T, Kreis H, Finale Y y Amiel JL. (1980).- Dissociation of natural killer cell activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in kidney allograft recipients receiving high-dose immunosuppressive therapy. *Transplantation* **29**: 214-218
- Loo TL y Nelson JA (1982).- Purine antimetabolites. En *Cancer Medicine*. Eds: JF Holland y E. Frey. Lea and Febiger. Philadelphia. pp 790-800

- Lopez-Calderón A (1992).- Estrés. En: *Fisiología Humana*. Ed: JAF Tresguerres. McGraw-Hill Interamericana, España. pp 1146-1154
- Lyson K y McCann SM (1992).- Induction of adrenocorticotropic hormone release by interleukin-6 in vivo and in vitro. *Annals New York Academy of Science* **650**: 182-185
- Malagón MJ, Domínguez J, Árias M y Sánchez-Vizcaíno JM (1986).- Aplicación del anticuerpo monoclonal F1C3 para la cuantificación de IgG porcina, mediante un ensayo inmunoenzimático. *Med Vet* **3**: 397-383.
- Manthorpe R, Garbarsch C y Lorenzen I (1975).- Glucocorticoid effect on repair processes in vascular connective tissue. Morphological examination and biochemical studies on collagen RNA and DNA in rabbit aorta. *Acta Endocrinologica*. **80**: 380-397
- Massicot F, Thevenin M, Martin C, Warnet JM, Dutertre-Catella H y Claude JR (1994).- Effects of cyclosporin on kidney glutathione metabolism and cytochrome P-450 in the rabbit: possible implication of eicosanoid metabolism. *Drug Chem Toxicol*. **17**: 449-62
- Mazzocchi G, Markowska A, Andreis PG, Tortorella C, Neri G, Gottardo G, Malendowicz LK y Nussdorfer GG (1994).- Effects of cyclosporine-A on steroid secretion of dispersed rat adrenocortical cells. *Exp Toxicol Pathol*. **45**: 481-488
- McCauley J, Fung J, Jain A, Todo S y Starzi TE (1990).- The effects of FK 506 on renal function after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* **22**: 17-20
- McCormack JJ y Johns DG (1982).- Purine antimetabolites. En: *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. Ed: BA Chabner. WB Saunders Co. Philadelphia. pp 213-228.
- Melby JC (1977).- Clinical pharmacology of systemic corticosteroids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **17**: 511-527

- Mendelsohn J, Multer MM y Bernheim JL (1977).- Inhibition of human lymphocyte stimulation by steroid hormones: cytokinetic mechanism. *Clin Exp Immunol* **27**: 127-134
- Mestecky J y Kilian M (1985).- Immunoglobulin A (IgA). En: *Methods in Enzymology* **116**: 37-75
- Mestecky J y Schrohenloher RE (1974).- Site of attachment of J chain to human immunoglobulin M. *Nature* **249**: 650-652
- Michael SD (1981).- The role of the endocrine thymus in female reproduction. *Arthritis Rheum.* **22**: 1241-1243
- Michael SD, Taguchi O y Nishizuka Y (1980).- effect of neonatal thymectomy on ovarian development and plasma LH, FSH, GH and PRL in the mouse. *Biol Reprod* **22**: 343-349
- Middleton DJ, Watson ADJ y Howe CJ (1987).- Suppression of cortisol response to exogenous adrenocorticotrophic hormone, and the occurrence of side effects attributable to glucocorticoid excess, in cats during therapy with megestrol acetate and prednisolone. *Can J Vet Res* **51**: 60-65
- Mitruka BH y Rawnsley HM (1977).- En: *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals*. Masson Publishing USA, Inc., New York.
- Monaco DO, Wait RB, Friedman AL y Kahng KU (1988).- Effects of chronic cyclosporine metabolism therapy on renal vascular reactivity in the isolated perfused rabbit kidney. *Transplant Proc* **20**: 578-583
- Mooradian AD, Morley JE y Korenman SG (1987).- Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* **8**: 1-28
- Moore GE, Mahaffey EA y Hoening M (1992).- Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am J Vet Res* **53**: 1033-1037

- Mori T, Kobayashi H, Nishimoto H, Suzuki A, Nishimura T y Mori TS (1977).- Inhibitory effect of progesterone and 20-hydroxy-pregn-4-en-3-one on the phytohaemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* **127**: 151-157
- Moriello KC (1987).- Acute pancreatitis in two dogs given azathioprina and prednisona. *J Am Vet Med Assoc* **191**: 695
- Mostov KE, Friedlander M y Blovel G (1984).- The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* **308**: 37-43
- Munro C y Stabenfeldt G (1984).- Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrinol* **101**: 41-49.
- Murase N, Kim D-G, Todo S, Cramer DV, Fung JJ y Starzl TE (1990).- Suppression of allograft rejection with FK 506. *Transplantation* **50**: 186-189
- Myers MJ y Peterson BH (1985).- Estradiol induced alterations of the immune system. I Enhancement of IgM production. *Int. J. Immunopharmac.* **7**: 207-213
- Nadeau KC, Azuma H y Tilney NL (1996).- Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunopressed with maintenance cyclosporine or mycophenolate mofetil. *Transplantation* (Baltimore) **62**: 1363-1366
- Nakagawa T, Sukhova GK, Rabkin E, Winters GL, Schoen FJ y Libby P (1995).- Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. *Circulation* **92**: 987-993
- Nagamatsu T, Kojima N y Suzuki Y (1994).- Effects of cyclosporin A on experimental nephritis in rats: Cyclosporin A suppresses the development of accelerated passive Heymann nephritis. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. **103(1)**: 19-26
- Neild GH, Ivory K y Williams DG (1983).- Glomerular thrombi and infarction in rabbits with serum sickness following cyclosporine therapy. *Transplant Proc* **15**: 2782-2786

- Nell A, Matejka M, Solar P, Ulm C y Sinzinger H (1996).- Evidence that cyclosporine inhibits periodontal prostaglandin I<sub>2</sub> synthesis. *J Periodontal Res* **31**: 131-134
- Nelson JL y Steinberg AD (1987).- Sex steroids, autoimmunity, and autoimmune disease. En *Hormones and Immunity*. Eds: I Berczi y K Kovack.. MTP Press, The Hague. pp 93-119
- Nelson JM, Hall EJ, Manuel-Limson G, Freidberg H y Obrien FJ (1967).- Effect of pregnancy on the thymo lymphocyte system .I. Changes in the intact rat after exogenous HCG, estrogen, and progesterone administration. *Am J Obst Gynecol* **98**: 895-899
- Nieto MA, González F, Gambón F, Diaz-Espada F y López-Rivas A (1992).- Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. **88**: 341-344
- Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN y Woernley DC (1960).- Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bounds. *Arch Biochem Biophys* **89**: 230-244
- Nisonoff A, Hopper JE y Spring SB (1975).- En: *The Antibody Molecule in Immunology*. Eds: Dixon FJ y Kunkel HG. Academic Press. NY. pp 340-406
- Obminska-Domoradzka B, Switala M, Debowy J y Garbulinski T (1995).- Effects of levamisole, DTC and low-dose mechlorethamine on humoral response of SRBC-immunized rabbits exposed to cold stress. *J Vet Med Series B* **42**: 12-18
- Orsini MW y Blazkovec AA (1974).- Sexual dimorphism in the secondary immune response of the syrian hamster. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **46**: 858
- Paavonen T, Andreson LC y Adlercreutz H (1981).- Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J Exp Med* **154**: 1935

- Palacios R y Sugawara I (1982).- Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 Producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T cell growth factor. *Scan J Immunol* **15**: 25-31
- Paller MS y Murray BM (1985).- Renal dysfunction in animal models of cyclosporin toxicity. *Transplant Proc* **17 (suppl)**: 155-159
- Pearson DC, May GR, Fick GH y Sutherland LR (1995).- Azathioprine and 6-Mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Int Med* **123**: 132-142
- Pham-Huy C, Sadeg N, Becue T, Martin C, Mahuzier G, Warnet M, Hamon M y Claude JR (1995).- In vitro metabolism of cyclosporin A with rabbit renal or hepatic microsomes: analysis by HPLC-FPIA and HPLC-MS. *Arch Toxicol.* **69**: 346-349
- Polack FM (1965).- Inhibition of immune corneal graft rejection by azathioprine (imuran). *Archiv Ophthalmol* **74**: 683-689
- Poljak RJ (1975).- Tree-dimensional structure, function and genetic control of immunoglobulins. *Nature.* **256**: 373-375
- Porter RR (1959).- The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* **73**: 119-126
- Porter RR (1973).- Structural studies of immunoglobulins. *Science* **189**: 713-716
- Ragan HA (1989).- Markers of renal function and injury. En: *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. Ed, Loeb WF y Quimby FW. Pergamon Press. New York. pp 321-343
- Rajfer J, Sikka SC, Lemmi C y Koyle MA (1987).- Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinology* **121**: 586

- Rayat G, Yatscoff R, Silverman R y McKenna R (1993).- A comparison of the immunosuppressive effects of cyclosporine A and cyclosporine G in vivo and in vitro. *Transplantation*. **55**: 623-626
- Rebar RW, Morandini IC, Erickson GF y Petze JE (1981a).- The hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: diminished gonadotropin concentrations in prepubertal female. *Endocrinology* **180**: 120-126
- Rebar RW, Miyaka A, Low TLK y Goldstein AA (1981b).- Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor. *Science Wash DC*. **214**: 669-671
- Rebar RW, Miyaka A, Erickson GF, Low TLK y Goldstein AL (1983).- The influence of the thymus gland on reproductive function: A hypothalamic site of action. En: *Factors Regulating Ovarian Function*. Eds: GS Greenwald y PF Terranova. Raven Press NY. pp 465-478
- Rees L, Greene SA, Adladr P, Jones J, Haycock GB, Rigden SPA, Preece M y Chantler C (1988).- Growth and endocrine function after renal transplantation. *Archives of Disease in Childhood* **63**: 1326-1332
- Rivier C y Rivest S (1991).- Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*. **45**: 523-532
- Rogers WA y Reubner BH (1977).- A retrospective study of probable glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* **170**: 603-611
- Ryffel B, Siegl H, Petric R, Muller AM, Hauser R y Mihatsch MJ (1986).- Nephrotoxicity of cyclosporine in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and vascular lesions. *Clin Nephrol* **25**: S193-198
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P y Vale W (1987).- Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* **238**: 522-524

- Sarna S, Laine J, Sipila I, Koistinen R y Holmberg C (1995).- Differences in linear growth and cortisol production between liver and renal transplant recipient on similar immunosuppression. *Transplantation (Baltimore)* **60**: 656-661
- Schobitz B, De Kloet ER, Sutano W y Holsboer F (1993).- Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* **5**: 1426-1435
- Schreiber AD, Netti FM, Sanders MC, King M, Szabolcs P, Friedman D y Gomez F (1988).- Effect of endogenous and synthetic sex steroids on the clearance of antibody-coated cells. *J Immunol* **141**: 2959-2966
- Schuurman HJ, Van Loveren H, Rozing J y Vos JG (1992).- Chemicals trophic for the thymus: risk for immunodeficiency and autoimmunity. *Int J Immunopharmacol* **14**: 369-375
- Schuurs AHWM y Verheul HAM (1990).- Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* **35**: 157-172
- Schwartz RS y Dameshek W (1959).- Drug-induced immunological tolerance. *Nature*. **183**: 1682-1683
- Seethalakshmi L, Flores C, Khauli Rb, Diamond DA y Menon M (1990).- Evaluation of the effect of experimental cyclosporine toxicity on male reproduction and renal function. *Transplantation* **49**: 17-19
- Sekiya S, Kamiyama M y Takamizawa H (1975).- In vivo and in vitro tests of inhibitory effect of progesterone on cell-mediated immunity in rats bearing a syngenic uterine adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* **54**: 769-774
- Sell S (1964).- Evidence for species of differences in the effect of serum  $\gamma$ -globulin concentration on  $\gamma$ -globulin catabolism. *J Exp Med* **120**: 967-986

- Selye H (1936).- Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br J Exp Pathol* **17**: 234-238
- Selye H (1973).- The evolution of the stress concept. *American. Scientific* **61**: 692-699
- Shek PN y Sabiston BH (1983).- Neuroendocrine regulation of immune processes: change in circulating corticosterone levels induced by the primary antibody response in mice. *Int J Immunopharmacol* **5**: 23-33
- Shevach EM (1990).- Intercellular interactions in the immune response. En *Immunophysiology*. Eds: Oppenheim JJ y Shevach EM. Oxford University Press. pp 104-128
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI y Pfaff DW (1983).- Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* **304**: 345-347
- Siiteri PK y Stites DP (1982).- Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol Reprod* **26(1)**:1-14
- Sikka SC, Bhasin S, Coy DC, Koyle MA, Swerdloff RS y Raifer J (1988).- Effects of cyclosporine on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat: Mechanism of action. *Endocrinology* **123**: 1069-1074
- Silván G (1991).- Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.
- Silván G, Illera JC, Martín J, Manjón R e Illera M (1990).- Variaciones fotoperiódicas de las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejos. *Rev Esp Fisiol* **46**: 177-182
- Silván G, Illera JC y Illera M (1993).- Determination of follicular fluid estradiol levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *Steroids* **58**: 324-329

- Slijivic VS (1986).- Sex hormones and the Immune response. En: *Laboratory Animals*. Laboratory animals models for domestic animal production, World Animal Science. Eds: EJ Ruitenber y PWJ Peters. Elsevier Science Publishers BV. pp 217-252
- Skowron-Cendrzak A., Plonka I, BubaK M y Rembiesa R (1975).- Reduction of the graft-versus-host reactivity of mouse and rat spleen cells by 5-androstene-3,17-dione. *Folia Biol (Praha)* **12**: 190-197
- Smith KA (1990).- Interleucina-2. *Investigación y Ciencia* **164**: 14-22
- Sinha KP y Saran A (1972).- Serum transaminase levels during the course of repeated administration of carbon tetrachloride to rabbits. *Ind J Med Res* **60**: 1378-1385
- Sobhon P y Jirasattam C (1974).- Effect of sex hormones on thymus and lymphoid tissue of ovariectomized rats. *Acta Anat.* **89**: 211-225
- Spiegelberg HL (1985).- Immunoglobulin D (IgD). En: *Methods in Enzymology* **116**: 95-101
- Steinberg WM y Lewis JM (1981).- Steroid-induced pancreatitis: Does it really exist?. *Gastroenterology* **81**: 799
- Steinberg AD, Melez KA, Raveche ES, Reeves JP, Boegel WA, Smathers PA, Taurog JD, Weinlein L y Duvic M (1979).- Approach to the study of the role of sex hormones in autoimmunity. *Arthritis Rheum* **22**: 1170
- Stephanou A, Sarlis NJ, Knight RA, Lightman SL y Chowdrey HS (1992).- Effects of Cyclosporine A on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and anterior pituitary interleukin-6 RNAm expression during cronic inflammatory stress in the rat. *J Neuroimmunol* **41**: 215-222
- Sterlz J (1960).- Inhibition of the inductive phase of antibody formation by 6-mercaptopurine examined by the transfer of isolated cells. *Nature* **185**: 256-257

- Stern K y Davidsohn I (1955).- Effect of estrogen and cortisone on immune hemoantibodies in mice of inbred strain. *J Immunol* **74**: 479
- Stimson WH (1987).- Sex steroids, steroid receptors and immunity En *Hormones and Immunity*. Eds: I. Berczi y K Kovacs. MTP Press, The Hague. pp 43-53
- Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, Macdonald GB, Schubert MM, Atkinson K y Thomas ED (1981).- Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* **57**: 267-276
- Tamolang MB, Liu WT, Pang H, Ren Y y Wong- Y (1995).- A rifampicin-induced hepatic microsomal enzyme system for the generation of cyclosporine metabolites. *Pharmacol Res.* **32**: 141-148
- Taylor R (1991).- Regulación de la respuesta inmunitaria. En: *Inmunología*. Eds: I Roitt, J Brostoff y D Male. Salvat Editores. pp:10.1-10.10
- Terres G, Morrison SL y Habicht GS (1968).- A quantitative difference in the immune response between male and female mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **27**: 664-667
- Thliveris JA, Yatscoff RW, Lukowski MP y Copeland-KR (1991).- Cyclosporine nephrotoxicity experimental models. *Clin Biochem.* **24**: 93-95
- Thliveris JA, Solez K y Yatscoff-RW (1995).- A comparison of the effects of rapamycin and cyclosporine on kidney and heart morphology in a rabbit heterotopic heart transplant model. *Histol Histopathol.* **10**: 417-421
- Thompson AW (1983).- Immunobiology of cyclosporin A- a review. *Aust J Exp Biol Med Sci* **61**: 147-172

- Tillman P y Norman C (1983).- Droperidol-fentanil as an aid to blood collection in rabbits. *Lab Anim Sci* **3**: 181-182
- Tizard I (1987).- Modificación de las respuestas biológicas. En: *Inmunología Veterinaria*. Ed: I Tizard. Interamericana, McGrau-Hill. pp 392-400
- Tonegawa S (1983).- Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-581
- Tonegawa S (1985).- Moléculas del sistema inmunitario. *Investigación y Ciencia* **111**: 90-99
- Torpy DJ y Chrousos GP (1996).- The three-way interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes and the immune system. *Bailliere's Clinical Rheumatology* **10**: 181-198
- Turner BB (1990).- Sex differences in glucocorticoid binding in rat pituitary is estrogen dependent. *Life Sciences* **46**: 1399-1406
- Turner BB (1992).- Sex differences in binding of type I and type II corticoesteroid receptor in rat hippocampus. *Brain Research* **581**: 229-236
- Turner MW (1991).- Moléculas que reconocen al antígeno. En: *Inmunología*, Eds: Roitt I M., Brostoff J. y DK. Male. Salvat Editores SA, España. pp 5.1-5.11
- Wan Y, Yang G, Wan SX, Yang B, Ying R y Xi ZX (1996).- Renin-angiotension system-stress hormone response system. *Sheng Li Hsueh Pao*. **48**: 521-528
- Weinberg JM (1985).- Issues in the pathophysiology of nephrotoxic renal tubular cell injury pertinent to understanding cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant. Proc.* **17**: 81-83
- Weinstein Y y Berkovich Z (1981).- Testosterone effect on bone marrow, thymus and supressor T cells in the (NZB x NZW) F<sub>1</sub> mice: its relevance to autoimmunity. *J Immunol* **126**: 998-1002

- Wenger R (1985).- Síntesis total, modificación de una molécula, actividad biológica: la ciclosporina como ejemplo. *Sandorama IV*
- Wenger RM, Payne TG y Schreier MH (1986).- Cyclosporine: Chemistry, structure-activity relationship and mode of action. En: *Progress in Clin Biochem and Med*. Springer-Verlag, Berlin. pp 157-191
- Weston WT, Mandel MJ, Yeckley JA, Krueger GG y Claman HN (1973).- Mechanism of cortisol inhibition of adoptive transfer of tuberculin sensitivity. *J Lab Clin Med*. **82**: 366-371
- Wieneke H, Otte B, Lang D y Heidenreich S (1996).- Predictive value of IgG subclass levels for infectious complications in renal transplant recipients. *Clin Nephrol* **45**: 22-28
- Wilder RL (1995).- Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **13**: 307-338
- Williams GH y Dluhy RG (1991).- Enfermedades de la corteza suprarrenal En: *Harrison: Principios de Medicina Interna*. Eds: JD Wilson, E Braunwald, KJ Isselbacher, RG Peterdorf, JB Martin, AS Fauci y RK Root. Interamericana Macgraw-Hill. España. pp 1988-2014
- Williams G, Ghanadian R, Papadopoulos AS y Castro JE (1978).- Hormonal environment of immunosuppressed mice. *Br J Cancer* **37**: 123
- Wilson PD y Hartz PA (1991).- Mechanisms of cyclosporine A toxicity in defined cultures of renal tubule epithelia: a role for cysteine proteases. *Cell Biol Int Rep*. **15**: 1243-1258
- Wira CR y Sandoe CP (1980).- Hormonal regulation of immunoglobulins: Influence of estradiol on immunoglobulins A and G in the rat uterus. *Endocrinology* **106**: 1020
- Woodman (1997).- Reproductive hormones En: *Laboratory Animal Endocrinology*. Ed Woodman pp 453-499

- Wu TT y Kabat EA (1970).- An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp Med* **132**: 211-250
- Wyle FA y Kent JR (1977).- Immunosuppression by sex steroid hormones. I. The effect upon PHA and PPD-stimulated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* **27**: 407-415
- Yasmeen D, Ellerson R, Dorrington KJ y Painter RH (1976).- The structure and function of immunoglobulin domains. IV: The distribution of some effector functions among the C $\gamma$ 2 and C $\gamma$ 3 homology regions of human immunoglobulin G1. *J Immunol* **116**: 518-526
- Yin YR y Yang G (1996).- Effect of angiotensin II on the adrenal glucocorticoids secretion *Sheng Li Hsueh Pao*. **48**: 501-506
- Yoshimura R, Kahan BD, Matsui S, Kita M, Hamashima T y Oka T (1988).- Cyclosporine effects on immunoregulatory cells in kidney transplant recipients: suppression of gamma-interferon and interleukin production. *Transplantation Proceedings* **20**: 69-74
- Yoshimura R, Yoshimura N, Nakatani T, Kusunose E, Yamaguchi T, Oka T y Kishimoto T (1993).- The effects of cyclosporin on renal microsomal cytochrome P-450 systems. *Clin Nephrol* **40(6)**: 339-345
- Zipf WB, Bacon GE y Kelch RP (1980).- Hormonal and clinical responses to prednisone treatment in adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Hormone Research* **12**: 206-217
- Zubiaga AM, Muñoz E y Huber BT (1992).- IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid induced apoptosis. *J Immunol* **149**: 107-112