

## Tesis de Posgrado

# Mecanismo de acción de ciclosporina A

Leoni, Patricia R. D.

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Leoni, Patricia R. D.. (1980). Mecanismo de acción de ciclosporina A. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1628\\_Leoni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1628_Leoni.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Leoni, Patricia R. D.. "Mecanismo de acción de ciclosporina A". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1628\\_Leoni.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1628_Leoni.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMO DE ACCION DE CICLOSPORINA A

Autor: Patricia R.D. Leoni

Directores: Dr. Anthony C. Allison, Dr. Héctor N. Torres

Lugar de trabajo: Clinical Research Centre, Harrow e Instituto  
de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 5 2 5 4

Por cierto, no me fué fácil llegar hasta este punto, a pesar de que no lo hice sola. Llegué, porque el Dr. Eduardo F. Recondo me abrió las puertas, Llegué, porque el Dr. Héctor N. Torres me enseñó cómo. Llegué, porque pude compartir la experiencia de otros miembros del IIB, un verdadero privilegio si se tiene en cuenta que el Dr. Luis F. Leloir es uno de ellos. Llegué, porque mis amigos me ayudaron.

A Bamba

## ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
Ab	Anticuerpo
DNA	Acido desoxiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
LPS	Lipopolisacárido
PHA	Fitoheмоaglutinina
PWM	Mitógeno de pokeweed
Con A	Concanavalina A
TCA	Acido tricloroacético
IMP	Inosina monofosfato 5'
DTT	Ditiotreitol
ATP	Adenosina trifosfato 5'
HGPRTasa	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
IMP	Inosina monofosfato 5'
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
PEI-celulosa	Polietilenimino-celulosa
BTB	Azul de bromo timol
PPO	2,5 difenioxazol
POPOP	1,4-bis-(5-feniloxazol-2il)-benceno
UMP	Uridina monofosfato 5'
UDP	Uridina difosfato 5'
UTP	Uridina trifosfato 5'
UR	Uridina
CR	Citidina
AR	Adenosina
GR	Guanosina
TdR	Timidina
Leu	Leucina

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	
Respuesta Immune	1
Immunosupresión	11
Ciclosporina A	15
MATERIALES Y METODOS	
Cultivos	19
Síntesis de DNA y captación de precursores	21
Medición de fosforibosilpirofosfato	21
Medición de actividades enzimáticas	21
Cromatografía en placas de PEI-celulosa	23
Marcación y aislamiento de nucleótidos	24
Marcación de células con uridina y timidina tritiadas	24
Marcación con $^{111}\text{I}$ Indio	25
Marcación con $^{51}\text{Cr}$	25
Preparación de Ciclosporina A- $^{125}\text{I}$	25
Medición de la radiactividad	25
Microscopía electrónica	26
Determinación de viabilidad con azul tripan	26
Reactivos	27
RESULTADOS	
Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de DNA en linfocitos	28
Efecto de Ciclosporina A sobre linfocitos estimulados y no estimulados	28
Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de TdR- $^3\text{H}$	33
Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de uridina	38
Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR- $^3\text{H}$	38

Efecto de UR exógena sobre el transporte de TdR	39
Cinética de captación de UR. Efecto de Ciclosporina A	39
Relación dosis respuesta entre la concentración de Ciclosporina A y la captación de UR	39
Especificidad del efecto de Ciclosporina A: efecto sobre las cinéticas de captación de CR, AR y GR	45
Acción de la Ciclosporina A sobre la metabolización de nucleósidos incorporados	50
Estudios sobre fosforilación de nucleósidos y nucleó- tidos, por extractos crudos de linfocitos	50
Efecto de Ciclosporina A sobre la incorporación de Leu	56
Latencia en el efecto de Ciclosporina A sobre la captación de leucina	56
Efectos posteriores a la inhibición de la captación de precursores	59
Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de RNA temprano	61
Requerimiento de la síntesis de macromoléculas	63
Asociación de Ciclosporina A- <sup>125</sup> I con células	64
Toxicidad de la Ciclosporina A	66
Muerte celular	66
Marcación con TdR- <sup>3</sup> H	72
Marcación con UR- <sup>3</sup> H	75
Observaciones al microscopio electrónico	79
Efecto de Ciclosporina A sobre células en cultivo	83
Importancia del camino metabólico de recuperación de purinas en el efecto de Ciclosporina A	87

## DISCUSION

Efectos inmunitarios	93
Efecto citotóxico y sobre la proliferación celular	94
Efecto sobre la captación y metabolismo de precursores	95

## BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

### Respuesta Immune

El conjunto de reacciones específicas que se producen en un animal cuando un material extraño se introduce en su cuerpo se conoce bajo la denominación de Respuesta Immune. Esta consiste en la producción de inmunoglobulinas específicas y/o células específicamente reactivas, que circulan en la sangre de un organismo vivo y pueden reaccionar específicamente con dicho material. Como resultado de la reacción, el material extraño puede ser inactivado (p.ej. toxinas bacterianas), muerto (p.ej. organismos infectantes o células transplantadas) y/o fagocitado por células del retículo endotelial.

El éxito del proceso immune se basa en la habilidad del organismo vivo de reconocer por distintos medios; que se trata de moléculas extrañas, no relacionadas con su propia estructura.

En general la respuesta inmunitaria que puede ser transferida de un animal a otro por intermedio del suero de un dador previamente sensibilizado se denomina Respuesta Immune Humoral, mientras que la que puede ser transferida por células sensibilizadas de dicho dador, pero no por su suero, se denomina Respuesta Immune Mediada por Células.

### Sistema de células responsable de la respuesta immune

#### Linfocitos T, linfocitos B y macrófagos

En el desarrollo de la respuesta immune intervienen células linfocíticas que interaccionan de forma compleja; estas son: los linfocitos, células portadoras de un sistema de reconocimiento del Ag y los macrófagos que son carentes de tal especificidad.

Los linfocitos a su vez se agrupan en dos clases diferentes según sea el camino seguido durante su diferenciación. Estas clases se denominan B y T. Las diferencias entre los mismos están tanto a nivel de sus



funciones como en la localización celular donde se ha operado su diferenciación.

Las células precursoras de los linfocitos T tienen su origen en tejidos hematopoyéticos (saco vitelino, hígado fetal y sangre en embriones, y médula osea en adultos) y de estos migran al timo. Allí las células se diferencian para cumplir funciones inmunológicas específicas. Posteriormente, y luego de esta diferenciación operada bajo la influencia del timo, los linfocitos T migran hacia otros órganos linfáticos periféricos y/o circulan en la sangre y linfa del conducto torácico.

Estos linfocitos derivados del timo, son los responsables de los distintos fenómenos involucrados en la inmunidad mediada por células y además constituyen el principal tipo de células relacionadas con la actividad de otras células del sistema inmune (1-5).

Los linfocitos B tienen un origen similar al de las células T, pero existe controversia con respecto al lugar de regulación de la diferenciación de precursores de células B, a células B funcionales (6, 7), a pesar de ello está claro que la Bursa de Fabricius cumple un papel muy importante en el desarrollo de la línea B en aves (8). En mamíferos sin embargo, no se ha podido identificar un órgano equivalente y no existen evidencias fehacientes de que los tejidos linfoideos asociados al aparato digestivo cumplan funciones importantes como tejido linfoideo primario equivalente a la Bursa. Estos linfocitos son los precursores de las células formadoras de Abs.

Los linfocitos circulan continuamente por la sangre hacia los tejidos y estructuras linfoideas y de estos hacia la sangre. Pueden llegar a los nódulos linfáticos migrando a través de tejidos periféricos o directamente desde la sangre. Pueden salir de la circulación a través de las células endotélicas morfológicamente especializadas en las vénulas postcapilares de los nódulos linfáticos y también pueden salir a través de capilares y pequeños vasos del bazo y otros tejidos. Después de un período variable de residencia en nódulos linfáticos o bazo, pueden volver a la circulación directamente o via canales linfáticos y conducto torácico. Tanto los linfocitos B como los T pueden recircular, pero la recirculación de los B es más lenta y tienden a ser más sedentarios en tejidos hematopoyéticos y linfoideos. En linfa del conducto torácico el 85% de las células son linfocitos T.

Los macrófagos se originan en células precursoras de la médula ósea donde se diferencian, pasando luego al torrente sanguíneo. Los fagocitos mononucleares circulantes se denominan monocitos, mientras que los macrófagos, de localización tisular, reciben distintas denominaciones, según sea el órgano donde se los encuentra: células de Kupfer (hígado), células litorales (bazo), células reticulares (nódulos linfáticos), microglia (cerebro). Esta localización tisular es muy amplia ya que presenta el mismo grado de dispersión que el tejido conectivo. En su conjunto el sistema de macrófagos tisulares recibe el nombre de sistema retículoendotelial cuya función mejor conocida es la de ingerir y degradar partículas extrañas.

Los macrófagos cumplen además funciones muy importantes en la iniciación y regulación de la respuesta inmune. Por un lado modulan la interacción entre linfocitos T, B y Ag, a través de la presentación del Ag en forma altamente inmunogénica, y por otra parte secretan una variedad de sustancias muy importantes para el desarrollo de la respuesta inmune y otros procesos biológicos (9 -12).

### Propiedades funcionales de los linfocitos T

La población de linfocitos T representa una clase heterogénea de células inmunocompetentes con una gran variedad de funciones inmunológicas. Funcionalmente pueden dividirse en regulatorios y efectoras.

Los linfocitos T regulatorios a su vez comprenden dos tipos: los linfocitos T "ayudantes" o "helper" y los linfocitos T supresores.

Los linfocitos T "helper" participan en la elaboración de la respuesta inmunitaria humoral a ciertos Ags denominados T dependientes. Esa participación se manifiesta como facilitación de la producción de Abs en términos de magnitud, clase y afinidad, así como también calidad y cantidad de la memoria inmunológica (13).

Los linfocitos T supresores se definen funcionalmente como aquellos que actúan inhibiendo la transición de células B a células plasmáticas secretoras de Abs. Pueden ser específicos de Ag o no. Esto es, pueden activarse con un Ag y el efecto observarse con el mismo Ag u otro (14, 15).

Los linfocitos T efectoras comprenden a su vez al grupo de linfoci-

tos T citotóxicos, al grupo que participa en las reacciones del cultivo mixto de linfocitos (MLR) y al de los mediadores de hipersensibilidad retardada. El primer grupo se origina cuando se confrontan linfocitos T con células cuyos Ags de histocompatibilidad son distintos a los del linfocito. El linfocito se vuelve citotóxico contra células que posean los Ags contra los que fue sensibilizado, o sea que adquiere la capacidad de lizar a las mismas (16,17).

El segundo grupo participa de las reacciones que se originan cuando se cultiva una mezcla de linfocitos de distintos dadores. Luego de un período de incubación adecuado los linfocitos comienzan a proliferar como resultado de la diferencia entre los complejos de histocompatibilidad principal (18,19). Durante ese período se desarrollan linfocitos T citotóxicos para células que tengan los mismos Ags de histocompatibilidad contra los cuales los linfocitos se han sensibilizado (20-22).

En cuanto a las células T que median la hipersensibilidad retardada, son linfocitos que luego de ser estimulados son capaces de excretar mediadores biológicamente activos, de lo que resulta la acumulación de células mononucleares en la vecindad del Ag estimulante, y, asociado con esto, hay un aumento de la permeabilidad vascular (23-27).

#### Propiedades funcionales de los linfocitos B

Los precursores de células formadoras de Abs derivan de linfocitos de la serie B; sin embargo estos precursores difieren de varias maneras en términos de propiedades funcionales, indicando un considerable grado de heterogeneidad en su población (28-33).

Se pueden definir subpoblaciones funcionales de linfocitos B que difieren en su relativa dependencia de células T. Dependiendo de la estructura del Ag, la producción de Abs puede requerir o no de la presencia de células T (34-41). Los Ags que no requieren de células T para inducir la formación de Abs (Ags T independientes), generalmente presentan unidades idénticas (42,43), unidas en una secuencia repetitiva más o menos lineal, y provocan una respuesta de Ab predominantemente de la clase IgM; puede haber además una producción marginal de IgG. No obstante ello, en algunas respuestas de la clase IgM se ha demostrado la participación de linfocitos T (44). Conviene usar la categoría de depen

diente como relativa, desde el punto de vista cuali y cuantitativo.

Se pueden definir subpoblaciones funcionalmente diferentes de linfocitos B usando criterios como: distribución en tejidos y esquema de migración; diferencia de tamaño y propiedades de adhesión; diferencias en marcadores de superficie; diferencia de reactividad a Ags y diferencia de sensibilidad a radiaciones ionizantes. Las diferencias se encuentran en general entre células de distinto estadio de maduración o entre células en reposo diferenciadas.

En la figura 1 se muestra un esquema de la diferenciación de células linfocitarias.

### Desarrollo de la respuesta inmune

El dogma central de la inmunología es la hipótesis de selección clonal, según la cual, en algún momento del desarrollo ontogénico, e independientemente del Ag, queda determinado que un linfocito responda a un solo tipo de Ag. Esta propiedad es consecuencia de la existencia de receptores específicos en la membrana celular. La interacción del Ag con su receptor iniciaría la activación de cada célula.

Los linfocitos B poseen en su superficie inmunoglobulinas que son los receptores para Ag, cuyos sitios de combinación con el mismo son iguales a los de los Abs secretados. La especificidad para el Ag de los receptores y del Ab es también la misma (45).

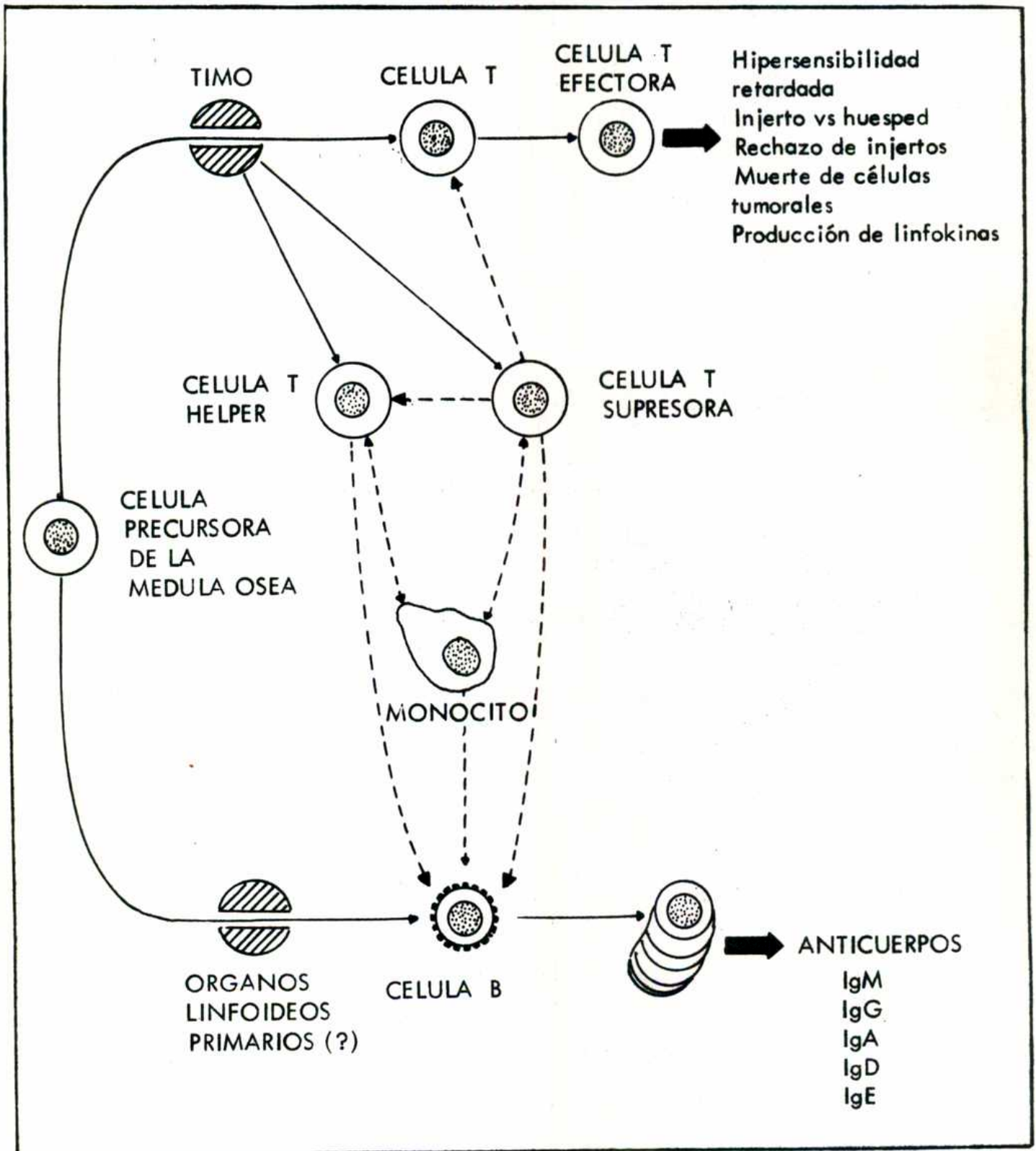
La naturaleza química de los receptores en los linfocitos T da lugar a controversias, pero aparentemente se trata de productos de los genes de respuesta inmune, Ir, asociados genéticamente al complejo de histocompatibilidad principal (46).

Cuando un organismo es invadido por algún material extraño, puede ocurrir como resultado la proliferación y diferenciación de linfocitos para convertirse en células efectoras en algún tipo de respuesta inmune. Esto depende de la naturaleza y concentración del Ag, y de interacciones complejas entre linfocitos y macrófagos.

Cuando las células B se activan, se dividen y diferencian en blastos con abundante retículo endoplásmico. Algunas pasan a ser células plasmáticas; estas se quedan la mayor parte del tiempo en tejidos lin-

Figura 1

Regulación de la diferenciación de linfocitos humanos



foideos y secretan gran cantidad de Abs que circulan por la sangre. Los Abs posteriormente actúan en conjunción con otras células (p.ej. macrófagos, mastocitos y basófilos) y algunas enzimas del suero (p.ej. componentes del complemento) proveyendo inmunidad contra muchos agentes patógenos.

Otras permanecen como células de memoria. La producción de estas células es un mecanismo para la expansión del clon correspondiente y permite a un individuo que ha sido expuesto una vez a un Ag, responder más rápida y vigorosamente luego de una segunda exposición al mismo Ag.

Cuando las células T son activadas, proliferan y se diferencian a blasto pero no desarrollan cantidades significativas de retículo endoplásmico. Estas células T secretan una serie de factores (linfocinas) no específicas de Ag, como factores de inhibición de la migración, factores quimiotácticos, factores citotóxicos y mitogénicos, algunos de los cuales estarían involucrados en la respuesta inmune, y que participan en las reacciones clásicas de inmunidad celular tales como: hipersensibilidad retardada, reactividad en transplantes y resistencia a la infección mediada por células (47).

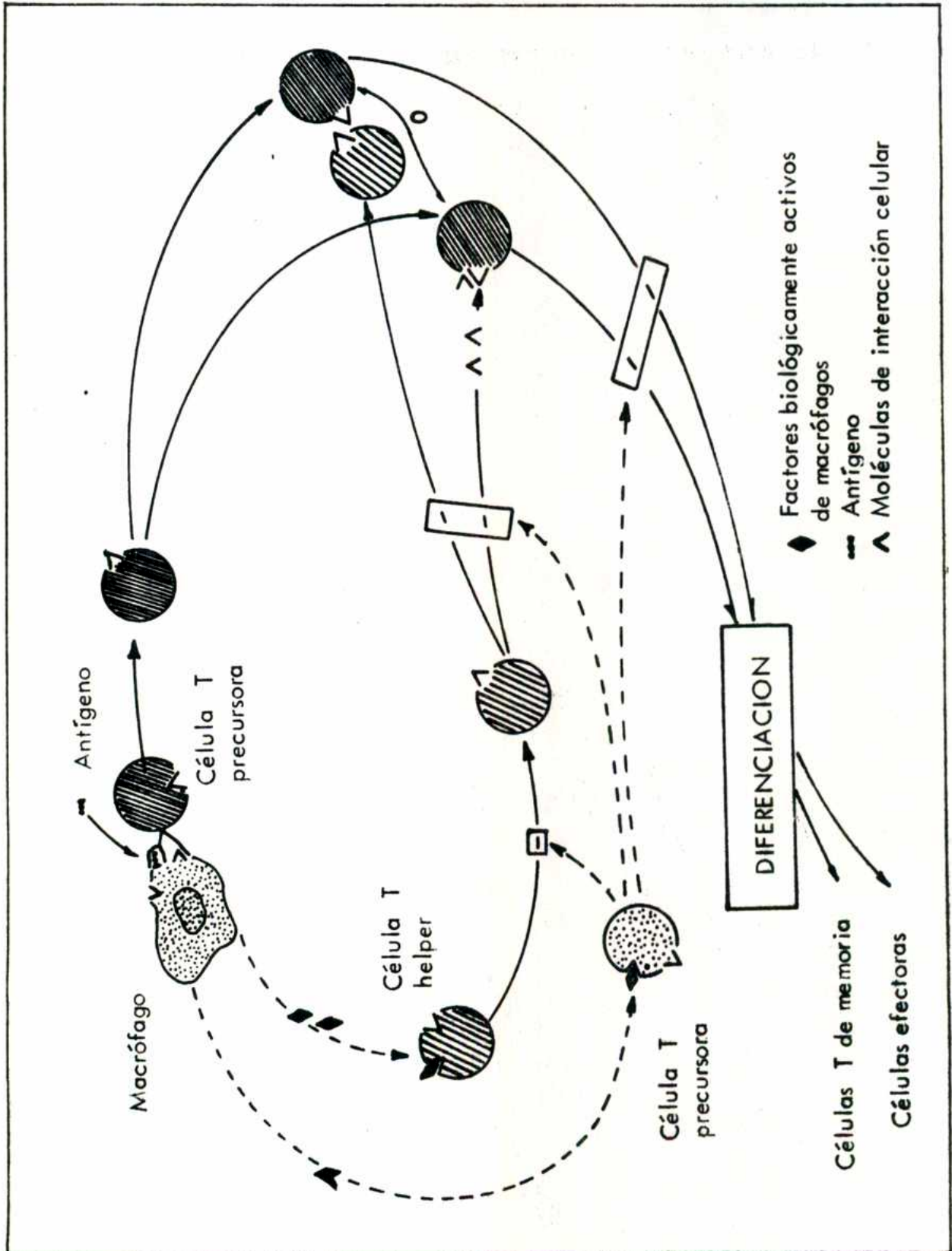
El desarrollo de la respuesta inmune requiere interacción entre las células participantes en las mismas. P.ej. interacción entre linfocitos T en el desarrollo de inmunidad mediada por células e interacción entre linfocitos B y T en el desarrollo de inmunidad humoral. En ambas intervienen además macrófagos y posiblemente factores secretados por las células involucradas.

De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento se han postulado modelos para las interacciones celulares en el desarrollo de la respuesta inmune (48).

Para la interacción entre células T en el desarrollo de la inmunidad mediada por células (Figura 2) se postula que después de reconocer al Ag, el linfocito entra en un estadio en el que necesita de la participación de otro linfocito T "helper" para su posterior diferenciación a célula T efectora madura. Luego de la interacción entre ellas, que puede ser por contacto directo entre las membranas celulares, via mediadores solubles, o ambas, se facilita la diferenciación de los precursores de linfocitos citotóxicos a células efectoras maduras o células de memoria. Las células T supresoras pueden interferir en este proceso en

Figura 2

Interacciones entre células T en el desarrollo de la inmunidad mediada por células



en uno o más puntos. El macrófago además, excretaría factores biológicamente activos que ejercerían efectos reguladores en el proceso.

Un esquema similar se propone para interacciones entre células B y T (Figura 3). En el caso en que el Ag sea un conjugado portador-hapteno el hapteno es reconocido por las células B y el portador por las T. La presentación del Ag por el macrófago favorece la inducción de células T "helper". El linfocito T podría tener un receptor para el complejo formado por el portador más una molécula de la superficie del macrófago, o tener un receptor específico para el portador e interactuar a su vez con una "molécula de interacción celular" (CI) del macrófago por otro sitio.

Es posible también que la célula T reconozca al Ag presentado por una célula y tenga interacciones celulares con otra. Una vez activado el linfocito T "helper", interactúa con la célula B específica para el hapteno, (que ya interactuó con los receptores presentes en su superficie), y facilita la diferenciación a células efectoras maduras: células plasmáticas secretoras de Abs o células de memoria.

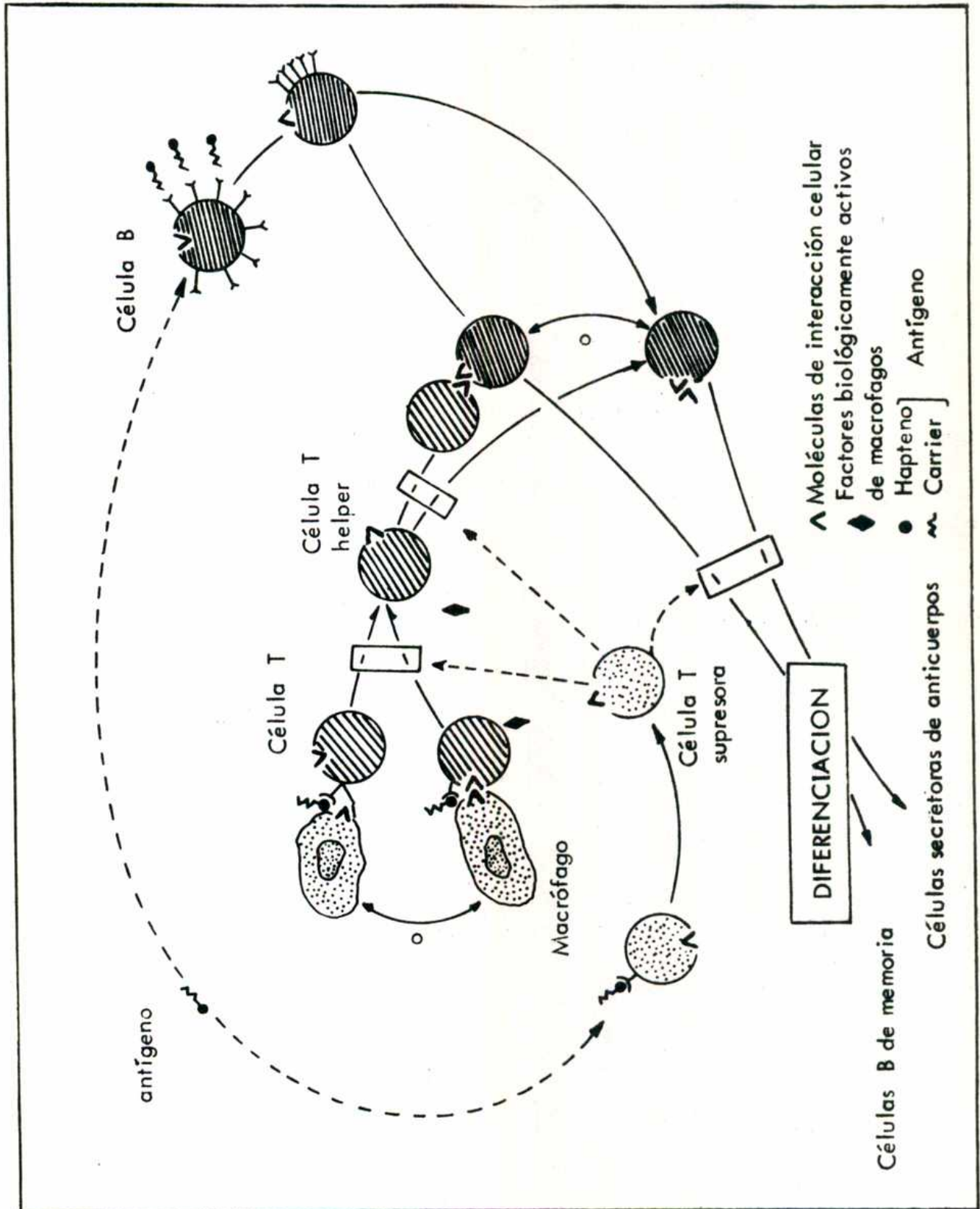
La interacción puede ocurrir vía contacto celular directo o vía factores solubles. Las células T supresoras también pueden influir en varios puntos. Se han identificado y caracterizado varias sustancias biológicamente activas, derivadas de linfocitos y macrófagos, capaces de influenciar la función de los linfocitos. Se han encontrado factores específicos y no específicos para Ag que pueden ejercer todos los efectos regulatorios que se considera que operan en el sistema inmune. Sin embargo no es posible llegar a una conclusión sobre la importancia biológica de muchos de ellos.

En la interacción celular también influyen otras estructuras de la membrana como algunos Ags de histocompatibilidad, receptores de Fc y C<sub>3</sub> etc., aumentando la complejidad del problema. Aun así, lo que se conoce hasta el momento puede ser sólo una pequeña parte, ya que es probable que la respuesta inmune esté sometida a un exquisito control homeostático, de manera que la interacción entre células linfoideas sea el primer paso de una cascada celular, análogo a la cascada de enzimas que intervienen en la activación del complemento o la coagulación.



Figura 3

Interacciones entre células B y T en el desarrollo de inmunidad humoral



## Inmunosupresión

La inmunosupresión es la prevención o reversión de respuestas inmunitarias establecidas. La disminución de respuesta inmunitaria puede lograrse de una variedad de maneras, aunque la mayoría de los mecanismos bioquímicos involucrados son desconocidos. Las formas de lograr tal disminución más conocidas son:

1- Alteración de células inmunocompetentes por medios no específicos. Se puede esperar una disminución de la respuesta inmunitaria como consecuencia de la destrucción de un número suficiente de células linfoides o por alteración funcional de células inmunocompetentes por manipulación terapéutica.

2- Remoción mecánica de células linfoides. La respuesta inmunitaria puede suprimirse por remoción de órganos linfoides primarios (timo y Bursa de Fabricius o su equivalente) o secundarios (nódulos linfáticos y bazo). La capacidad de producir respuesta puede anularse completamente o sólo producirse pequeñas anomalías en la misma, dependiendo del animal y su edad.

3- Radiación por rayos X. Muchas células linfoides son particularmente sensibles a irradiación. El tratamiento con rayos X destruye linfocitos y células precursoras de la médula ósea suprimiendo de esta forma el proceso inmune. Por supuesto el daño no es selectivo para células linfoides.

4- Supresión farmacológica de la inmunidad. Hay diversas drogas que se utilizan para modificar la respuesta inmune en individuos que han sufrido trasplantes así como en una variedad de enfermedades inmunológicas. En muchos casos el mecanismo de acción es poco conocido, en parte porque los caminos farmacológicos involucrados no están claramente definidos y en parte por la complejidad de la reacción in vivo. La mayoría actúa en varios puntos del proceso de respuesta inmune.

Los tipos de compuestos más utilizados para reducir la reactividad inmunológica son:

Esteroides adrenocorticales. A pesar de su uso desde hace dos décadas su mecanismo de acción es todavía incierto (49). La cortisona y sus análogos pueden inhibir la proliferación de un variado número de tipos de células incluyendo a las linfoides. Los esteroides se unen a recepto

res citoplasmáticos y son transportados a receptores intranucleares, iniciándose la síntesis de RNA y proteínas. Esto es seguido por una inhibición de la captación de moléculas pequeñas, una caída en la actividad de polimerasa e inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (50). Dentro de las dos horas se produce muerte celular y lisis. No obstante ello algunas poblaciones de linfocitos, células plasmáticas y células formadoras de Abs completamente diferenciadas, son insensibles a los esteroides.

Antagonistas de purinas. Los más estudiados han sido azatioprina y 6-mercaptopurina (51). Estos agentes afectan primariamente la síntesis de DNA (52), pero es probable que tengan además otros efectos debido a los distintos resultados obtenidos dependiendo de la dosis y período de administración. Su uso es bastante limitado debido a su alta toxicidad.

Antagonistas del ácido fólico. Se conoce relativamente bien la acción del metotrexato y aminopterina (53). Su administración bloquea el pasaje de ácido dihidrofólico a tetrahidrofólico, que es un paso esencial en muchos caminos metabólicos, incluyendo síntesis de DNA, RNA y coenzimas que contienen purinas. Son potentes inhibidores de la mitosis, pero además de la inhibición de la dihidrofólico reductasa, parecen tener efecto inmunosupresor a través de otros mecanismos.

Agentes alquilantes. Tienen un gran efecto sobre células en división siendo a la par carcinogénicos y mutagénicos. Alteran el DNA, e inhiben la síntesis de RNA y proteínas. La ciclofosfamida ha sido la más usada. Suprime las funciones de linfocitos T y B, pero es especialmente dañina para linfocitos B (54).

Antibióticos. Muchos antibióticos alteran la reactividad inmunológica, pero solo algunos han sido de utilidad. Estos incluyen: mitomicina, puromicina, Actinomicina C y D, azaserina y cloranfenicol.

La puromicina, inhibe la síntesis de proteínas, a nivel de traducción. Solo puede usarse in vitro por su extrema toxicidad.

La mitomicina despolimeriza y causa entrecruzamientos covalentes entre las cadenas de DNA e inhibe su replicación. A mayores concentraciones, también afecta directamente la síntesis de RNA y proteínas, es muy tóxico para ser usado clínicamente.

Las actinomicinas inhiben la síntesis de RNA dependiente de DNA. El cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas, tiene efecto no específico sobre la síntesis de Abs. La azaserina que bloquea la síntesis de novo de

purinas, se usa conjuntamente con análogos de purinas.

Otras drogas. Una gran variedad de drogas tienen efecto inmunosupresor, en general, inhibidores de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, como los alcaloides de plantas, p.ej. colchicina; inhibidores de proteólisis, p.ej. ácido epsilon-aminocaproico; asparaginasa; salicilatos y otras.

Esquema de los probables sitios de acción de agentes inmunosupresores comunes

Lugar de acción	Droga
Desarrollo de lesión inflamatoria no específica.	Esteroides adrenales. Antagonistas de purinas. Agentes alquilantes.
Captación de Ag. Procesamiento del Ag y transferencia al linfocito	Esteroides adrenales. Antagonistas de purinas.
Diferenciación y proliferación de la célula inmunocompetente.	Esteroides adrenales. Antagonistas de purinas. Agentes alquilantes.
Producción de anticuerpos.	Esteroides adrenales. Antagonistas de purinas. Antagonistas de ácido fólico. Agentes alquilantes.
Acción del complemento y desarrollo de lesiones inflamatorias específicas.	Esteroides adrenales.
Reconocimiento inmunológico mediado por célula y daño.	Esteroides adrenales. Antagonistas de purinas. Agentes alquilantes.

## Supresión de la respuesta inmune con materiales biológicos

### Globulina antilinfocítica

La globulina anti linfocitos heterólogos es el inmunosupresor más efectivo conocido hasta el momento, pero los resultados sobre los efectos de su administración en humanos han sido inconsistentes, debido a la variedad de condiciones en que ha sido aislada, purificada y administrada. Los componentes activos son anticuerpos de la clase IgG, que se producen como respuesta a los antígenos de la membrana del linfocito. Otros componentes celulares también provocan la síntesis de anticuerpos antilinfocito.

Las propiedades inmunosupresoras están relacionadas con la capacidad de combinarse específicamente con antígenos de la membrana del linfocito. El mecanismo por el que la célula se afecta no es conocido (55).

### Anticuerpos contra anticuerpos

Los anticuerpos anti inmunoglobulinas tienen efecto inmunosupresor, probablemente por interferir con receptores de los linfocitos B.

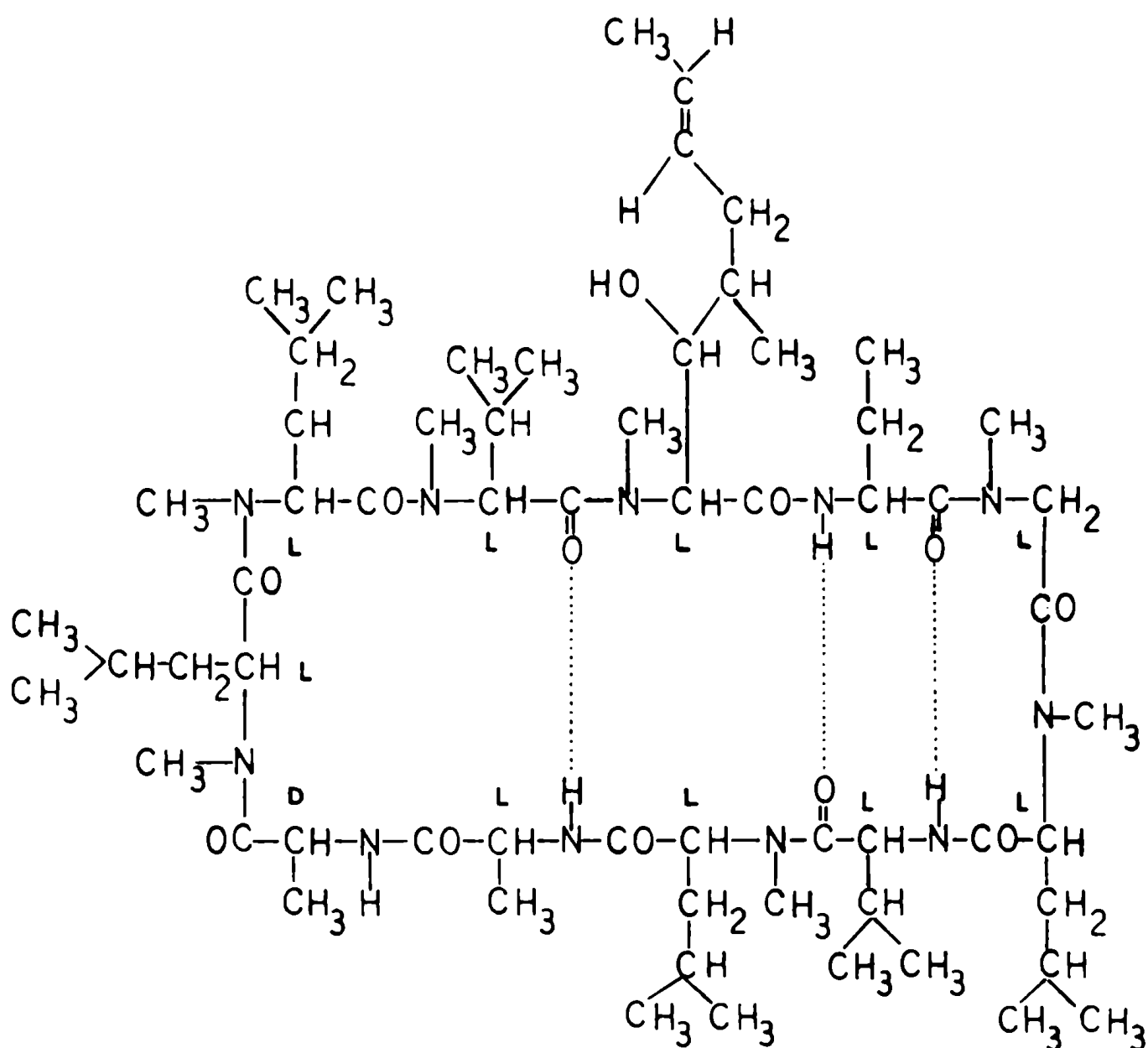
### Glicoproteína $\alpha_2$

La fracción  $\alpha_2$  de suero normal tiene actividad inmunosupresora. Parte de esta actividad puede explicarse por la presencia en el extracto de una ribonucleasa. Hay además alguna evidencia de que el efecto puede deberse a la activación de linfocitos T supresores. Este inmunosupresor puede ser de gran importancia clínica debido a su baja toxicidad.

Aunque se han logrado efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la prevención de rechazo de injertos usando los inmunosupresores químicos y biológicos de que se dispone, la principal limitación de las terapéuticas es su disminución inespecífica de resistencia inmune, marcado daño a órganos no linfoides y un aparente aumento en la incidencia de neoplasias.

Ciclosporina A

Es un péptido cíclico neutro formado por 11 aminoácidos, varios de los cuales son no convencionales o modificados. Su peso molecular es 1203, es insoluble en agua, pero soluble en aceites, alcoholes y otros solventes orgánicos. Basándose en evidencias químicas, espectroscópicas y cristalográficas se determinó la siguiente estructura (56):



Ciclosporina A

Se detectó ensayando la actividad inhibitoria de la producción de Abs en ratones, de extractos de hongos de las especies *Cylindrocarpon lucidum* Booth y *Trichoderma polysporum* Rifai, en la División de Investigación Médica y Biológica de Sandoz, Basilea (57).

Debido a su baja toxicidad, comparada con otros inmunosupresores, se estudiaron extensivamente sus efectos farmacológicos en distintos animales (57-60).

### 1) Efecto sobre inmunidad humoral

Se determinó midiendo dos parámetros:

a) Acción sobre la cinética de células formadoras de Abs de las clases IgM e IgG<sub>2</sub>, en ratones tratados con una sola dosis de ciclosporina A en el momento de la inmunización.

b) Efecto sobre la formación de hemaglutininas en suero de ratón, en respuesta a glóbulos rojos de oveja, suministrando la droga al mismo tiempo de la inmunización.

En ambos casos se encontró marcada inhibición. Ensayos posteriores indicaron que para encontrar efecto inhibitorio, la droga debe suministrarse poco antes, o dentro de las 24 horas después de la inmunización. La respuesta secundaria de células formadoras de Abs también se inhibe en ratón, cuando se lo trata con la droga antes y después de la reinyección del Ag (eritrocitos de oveja). No se obtiene inhibición si solo se lo trata después.

### 2) Efecto sobre formación de anticuerpos contra LPS en ratón

La respuesta a LPS en ratón atímico, puede tomarse como un modelo en el cual están involucrados solo linfocitos B. Tratando ratones *in vivo* con ciclosporina A, no se consiguió inhibir la inducción de IgM por LPS. Tampoco se inhibió la proliferación de células de bazo, estimuladas por LPS. Esto sugiere que la droga no afecta a los linfocitos B.

### 3) Efecto sobre inmunidad mediada por células

Se encontró que el tratamiento con ciclosporina A de ratas y rato-

nes sometidos a injerto de piel, aumenta significativamente su sobrevida. Después de un tiempo de interrumpido el tratamiento los animales comienzan a tener síntomas de la reacción injerto huesped (diarrea, alopecia, pérdida severa de peso). Si en este momento se vuelve a suministrar la droga, su condición mejora notablemente.

Posteriormente se encontró una potente acción inmunosupresora de la droga en injertos de corazón en ratas y cerdos, y riñón en perros y conejos (61,62). Suministrando la droga por varios días después de realizado el trasplante (hasta 4 semanas en conejos), en forma oral o por inyección intramuscular, se previno el rechazo por largos períodos sin necesidad de ninguna otra terapia inmunosupresora. Varios de los animales todavía están vivos y con todas sus funciones normales.

También se ha transplantado con éxito médula ósea en ratas, usando combinaciones donador-aceptor histoincompatibles, tratando a los animales con ciclosporina A durante 18 días después del trasplante (63).

#### 4) Efecto sobre reacciones inflamatorias

Se encontró una fuerte disminución de los síntomas de poliartritiden ratas con artritis experimental inducida por adyuvante de Freund a las que se suministró ciclosporina A oralmente durante varios días.

#### 5) Efecto sobre órganos hematopoyéticos

Se investigaron diversos parámetros en ratones tratados repetidamente con ciclosporina A, para determinar su efecto sobre órganos hematopoyéticos tales como: número de leucocitos, número de trombocitos, peso del bazo, número de células de médula ósea, número de células precursoras y su capacidad proliferativa.

Ninguno de los valores medidos indicó alteración con respecto a los normales, aun con dosis mucho mayores de las que producían inhibición de la respuesta inmune.

Los resultados obtenidos demuestran que la droga tiene muy baja toxicidad.

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento, indicarían



que la cyclosporina A actúa selectivamente en sistemas donde predominan las células linfoideas. Tiene marcada acción inmunosupresora en modelos experimentales de inmunidad humoral y mediada por células y también presenta efectos antiinflamatorios en cuadros crónicos. Una característica importante es su baja citotoxicidad. Aparentemente no tiene ninguna otra acción farmacológica.

El hecho de no inhibir la formación de Abs contra LPS, indicaría que no afecta a los linfocitos B. Pareciera que solo altera linfocitos T, y específicamente los pasos tempranos de la estimulación de las células inmunocompetentes. Tal aseveración se basa en el hecho de que para conseguir inmunosupresión el compuesto debe suministrarse durante la fase de sensibilización.

De cualquier forma, el mecanismo de acción de este fármaco es absolutamente desconocido.

## MATERIALES Y METODOS

### Cultivos

#### Purificación de linfocitos

Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica humana, por el método de Ficoll-Hypaque (64), utilizándose para ello la interfase de leucocitos que se obtiene luego de centrifugar la sangre y separar los eritrocitos y el plasma. Dicha interfase fue diluida en una solución de KCl 0,2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l, NaCl 8 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,16 g/l (PBSA) conteniendo heparina 10 u/ml, se agregó una solución de Dextrano T500 hasta una concentración de 1% y se dejó sedimentar a T ambiente durante 2 horas. De esta forma se consigue separar la mayoría de los eritrocitos, que sedimentan primero, y gran parte de los neutrófilos, que se depositan sobre los eritrocitos en una capa amarillo-verdosa.

La fase superior que contiene el resto de los leucocitos y plaquetas fué centrifugada a 400xg 10 minutos a T ambiente. El sedimento fue resuspendido en PBSA-heparina y se volvió acentrifugar por 10 minutos a 400xg. De esa forma se logró separar la mayoría de las plaquetas.

Se distribuyeron 40 ml de Ficoll-paque en 4 tubos cónicos. Se resuspendió el sedimento de células en 40 ml de PBSA-heparina y se depositan alícuotas de 10 ml en cada tubo, sobre el Ficoll-paque. Los tubos se centrifugan durante 30 minutos a 400xg a T ambiente.

En el interfase de las dos soluciones se encontraron las células mononucleadas y en el sedimento el resto de los neutrófilos y los eritrocitos contaminantes. La interfase fué lavada una vez con PBSA y una vez con medio RPMI 1640.

El sedimento de linfocitos y monocitos fue resuspendido en medio RPMI 1640, conteniendo glutamina 2 mM, estreptomycin 50 ug/ml, penicilina 100 u/ml y suero 10%, a una densidad no menor de  $2,5 \cdot 10^5$  cél./ml y no mayor de  $1 \cdot 10^6$  cél./ml. De acuerdo al destino de los linfocitos, se usó suero bovino, suero bovino fetal o suero equino.

El cultivo fué dividido en fracciones de aproximadamente 200 ml que se colocaron en frascos de Erlenmeyer estériles de 500 ml, y se in

cubaron en estufa a 37° con flujo de aire-CO<sub>2</sub> 5% durante 2 horas. La mayoría de las células adherentes quedaron pegadas al vidrio, y el sobrenadante conteniendo una población enriquecida en linfocitos T fue transvasado a recipientes adecuados para cada experimento. En algunos casos se usaron los cultivos incluyendo células adherentes.

La estimulación de los linfocitos se hizo utilizando PHA purificada 1 ug/ml. Con A 10 ug/ml o PWM 1% v/v del liofilizado reconstituido según instrucciones del fabricante. A veces se estimularon linfocitos dejando en cultivo durante varios días linfocitos de distintos dadores.

#### Cultivo de células leucémicas de pacientes

Se obtuvieron sedimentando la sangre con dextrano T-500 1%, centrifugando el sobrenadante y lavando el sedimento con PBSA. Se cultivaron en RPMI 1640 adicionado con suero fetal bovino 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 u/ml y estreptomycinina 50 ug/ml.

#### Cultivo de líneas celulares

Las células K 562 (mieloides eritroides humanas) y CIA 4 (linfoblastoides B humanas), se cultivaron en suspensión en medio RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino y las adiciones habituales.

Las células MRC-5 (fibroblastos de pulmón, humanas) se cultivaron en monocapa en medio MEM con suero bovino 10%.

Las células OCRF-HSB-2 (leucemia linfoblástica humanas), se cultivaron en suspensión en medio RPMI con suero fetal bovino 10%.

Las células CHO y CHO (HGPRT<sup>-</sup>) (ovario de hamster *Crisetulus griseus*), se cultivaron en monocapa en medio F-12 y MEM  $\alpha$  con suero fetal bovino 10%.

Las células 3T3 (clon A 31, BALB/c embrión de ratón), se cultivaron en monocapa en medio Eagle modificado por Dulbecco con suero bovino 10%, al igual que las L, de tejido conectivo de ratón.

Las células NB41A3 (neuroblastoma, ratón), se cultivaron en medio F-10 con 8,5% suero fetal bovino y 1,5% suero equino.

Estas células fueron obtenidas de ATOC (Washington-USA) y Clinical Research Centre (Londres-Inglaterra).

### Síntesis de DNA y captación de precursores

La determinación de síntesis de DNA se hizo incubando los linfocitos por períodos de tiempo que variaron de 3 a 8 horas, con ( $^3\text{H-CH}_3$ )-timidina 1 uci/ml. Las células se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio GF/C, se lavaron 2 veces con TCA 5% frío y una vez con metanol. Los filtros se dejaron secar, se pasaron a vailes de vidrio y se contó la radiactividad incorporada.

Los experimentos de captación se hicieron agregando el compuesto marcado ( $^3\text{H-CH}_3$ )-timidina 1 uci/ml, (5-6  $^3\text{H}$ )-uridina 1 uci/ml, 6 L-(4-5  $^3\text{H}$ )-leucina 2,4 uci/ml) a cultivos estimulados o no, y sacando alícuotas a distintos tiempos entre 0 y 20 minutos. Las alícuotas por duplicado o triplicado, fueron filtradas por discos de fibra de vidrio y lavadas con PBSA (captación total) o PBSA y TCA 5% (incorporación a material insoluble en ácido).

### Medición de fosforibosilpirofosfato (PRPP)

Se realizó sobre extractos de linfocitos preparados congelando y descongelando linfocitos resuspendidos en una solución de EDTA 2 mM, centrifugando luego a 10.000xg durante 10 minutos y calentando el sobrenadante así obtenido a 100° por 1 minuto. La determinación del contenido de PRPP se realizó incubando dicho extracto calentado con  $\text{MgCl}_2$  5 mM, buffer tris-ClH pH 7,7 35 mM, hipoxantina 8- $^{14}\text{C}$  (20 uci/ $\mu\text{mol}$ ) 0,07 mM y exceso de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa por 30 minutos a 37°. La reacción se detuvo agregando 0,5  $\mu\text{moles}$  de EDTA y 0,5  $\mu\text{moles}$  de IMP. La cantidad de IMP- $^{14}\text{C}$  formada se determinó por electroforesis de alto voltaje en buffer lactato 0,02 M pH 3,6 (65,66).

### Medición de actividades enzimáticas

Adenosina deaminasa. Se siguió básicamente el método descrito por Meyskens y Williams (67). Se homogeneizaron sedimentos de linfocitos en solución salina y se centrifugó el extracto a 10.000xg por 10 minutos. Los sobrenadantes así obtenidos se dializaron contra agua y se los incubó con buffer acetato 0,4 M pH 5,8 y adenosina (8- $^{14}\text{C}$ ) 35  $\mu\text{M}$

uci/ml, a 37° de 2 a 4 minutos. La reacción se detuvo por enfriamiento rápido. La adenosina ( $8\text{-}^{14}\text{C}$ ) consumida (inosina más IMP formados), se determinó por electroforesis en papel Whatman 3 MM durante 1 hora a un potencial de 60 volts por cm.

Quinasa de timidina. Para su determinación se utilizó el método de Bhuyan (68). Se homogeneizaron las células en una solución conteniendo KCl 150 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, buffer Tris-HCl pH 7,8 50 mM. El homogeneizado fue incubado con ATP 4 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, NaF 12 mM, PEP 4 mM, piruvato kinasa 26 ug/ml y timidina (metil- $^3\text{H}$ ) 40 uci/ml, deteniéndose la reacción por calentamiento a 100° durante 1 minuto. El TMP, TDP y TTP formados se aislaron colocando parte de la mezcla sobre discos de papel DEAE-celulosa, que se lavaron con formiato de amonio 1 mM. Luego de secados los discos, se determinó la radiactividad de los mismos.

#### PRPP Sintetasa

Purificación. Se centrifugaron cultivos de linfocitos 10 minutos a 400xg y el sedimento así obtenido se lavó con una solución de NaCl 0,7%. Luego de ello las células se resuspendieron en un buffer conteniendo 20 mM Tris ClH, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 20% glicerol, pH 7,4. Este buffer se utilizó a través de toda la preparación.

Luego de congelar y descongelar dicha suspensión con mezcla acetona-hielo seco, se centrifugó 10 minutos a 30.000xg. El sobrenadante se filtró a través de Sephadex G-25 y el eluido proteico se cromatografió en columna de DEAE-celulosa. La enzima se eluyó con KCl 0,2 M.

Medida de la actividad. La mezcla de reacción contuvo, en un volumen total de 0,1 ml, 40 mM buffer tris-HCl pH 7,4, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM ribosa-5P, 0,1 mM hypoxantina ( $8\text{-}^{14}\text{C}$ ) (20 uci/ $\mu\text{mol}$ ), 10 mM buffer fosfato de sodio pH 7,4, 0,180 mM ATP, exceso de HGPRTasa de eritrocitos y la preparación de PRPP sintetasa. Se incubó durante 20 minutos a 37° deteniéndose la reacción por agregado de 5  $\mu\text{moles}$  de EDTA y 0,5  $\mu\text{moles}$  de IMP. Alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla se someten a electroforesis en papel Whatman 3 MM en lactato de sodio 0,02 M pH 3,6, a 6 Kvolts durante 30 minutos. Las manchas de IMP se localizaron con luz UV; se cortaron y su radiactividad fue medida en un espectrómetro de centelleo líquido.

Quinasa de uridina. Se midió según el método usado por Lucas (69).

Se cultivaron linfocitos previamente estimulados con PHA, durante 20 horas en presencia o ausencia de Ciclosporina A 4,5 ug/ml. Se cosecharon las células, se lavaron una vez con PBSA, se resuspendieron en buffer conteniendo 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 y 1 mM trietanolamina, y se congelaron y descongelaron 4 veces en hielo seco-acetona. Dependiendo del experimento, se usó como fuente de enzima el extracto total, el sobrenadante obtenido después de centrifugar 2 veces a 12.000xg (30 y 15 minutos), o el sedimento resuspendido. La mezcla de incubación contuvo: MgCl<sub>2</sub> 1 umol, Tris-HCl pH 8,2 20 umoles, KCl 10 umoles, ATP 2 umoles, mercaptoetanol 1 umol, uridina-<sup>3</sup>H 2 mmoles 150.000 cpm y extracto enzimático 100 ul, en un volumen final de 200 ul. Las incubaciones se efectuaron a 37° deteniéndose la reacción por calentamiento a 100° durante 1 minuto. Luego de ello, se centrifugó 10 minutos a 2.000 rpm y el contenido de UMP, UDP y UTP se determinó por cromatografía en placa de PEI-celulosa.

Quinasas de adenosina, guanosina y citidina. Se midieron en forma similar a la quinasa de uridina, usando en cada caso adenosina-<sup>3</sup>H, guanosina-<sup>3</sup>H o citidina-<sup>3</sup>H.

#### Cromatografía en placa de PEI-celulosa

Se utilizó una modificación del método de Randerath (70).

La mezcla a analizar, a la que se añadió una mezcla de UMP, UDP y UTP no radiactivos, fue sembrada a 3 cm de la base de la placa. Se desarrolló durante 1 noche en una solución de metanol:agua 4:1. En estas condiciones la uridina migra junto con el frente, quedando los derivados fosforilados en el origen. Una vez secada la placa se transfirió a una cuba conteniendo LiCl 0,13 M y se desarrolló 3,5 cm por encima del origen. Esto fue seguido por otro desarrollo en LiCl 0,6 M hasta 8,5 cm sobre el origen, y otro en LiCl 1,3 M hasta 14 cm. Luego de secar la placa, la posición de los productos de reacción se visualizó con luz UV. Una vez localizados, se rasparon las manchas y se midió la radiactividad asociada a las mismas.

### Marcación y aislamiento de nucleótidos

Las células estimuladas durante 60-70 horas y luego tratadas o no con Ciclosporina A durante 16-20 horas, fueron sometidas durante las 3 últimas horas de cultivo a un pulso con el correspondiente precursor radiactivo: uracilo- $2^{14}\text{C}$ , citosina- $2^{14}\text{C}$ , adenosina- $8^{14}\text{C}$  o guanina- $8^{14}\text{C}$  aproximadamente 1 uci/ml.

Al final de la marcación se cosecharon las células y se lavaron con PBSA y solución salina. Finalmente fueron resuspendidas en 0,1 ml de agua, agregándose 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{HClO}_4$  4,2 M. Luego de ello los extractos fueron dejados en hielo durante una hora. Al cabo de dicho tiempo fueron centrifugados a  $1.200\times g$  por 10 minutos, y los sedimentos re-extraídos. Los sobrenadantes así obtenidos se neutralizaron con KOH 4,5 M controlando el pH con indicador interno (BTB). El  $\text{KClO}_4$  formado se eliminó por centrifugación. El sobrenadante conteniendo los nucleótidos se sometió a cromatografía en placas de PEI-celulosa.

### Marcación de células con timidina y uridina tritadas

Marcación de linfocitos estimulados. Los cultivos de células recibieron timidina- $\text{CH}_3^3\text{H}$  o uridina-( $5,6^3\text{H}$ ) a una concentración de 0,6 a 0,8 uci/ml y se incubaron durante 20-25 horas. Se centrifugaron las células, se lavaron 2 veces con medio, se resuspendieron y se agregó o no Ciclosporina A. En este momento se considera el comienzo de la eliminación de la marca. A distintos tiempos se toman alícuotas de los cultivos que se centrifugan 10 minutos a  $400\times g$ . Se determinó la radiactividad en los sobrenadantes y los sedimentos se someten a una purificación en gradiente de Ficoll-paque para separar las células muertas, que se encuentran en el sedimento del fondo del tubo, de las vivas que quedan en la interfase. Se determinó la radiactividad en ambos tipos de células, utilizando la mezcla centelleadora adicionada con Tritón X-100.

### Marcación de células K 562 y CIA 4

Se hizo de la misma manera que la de linfocitos, pero se suprimió

la centrifugación en Ficoll-paque debido a que no fue eficiente en la separación de células muertas de las vivas.

#### Marcación con $^{111}\text{I}$ ndio

Las células se resuspendieron en solución salina ( $10^7$  cél./ml) y se agregó una mezcla de  $^{111}\text{I}$ ndio (4 uci/ml) y oxina (7,5 ug/ml). Se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las células con solución salina (71).

#### Marcación con $^{51}\text{Cr}$

Se incubaron células (hasta  $2 \cdot 10^7$ ) en 150 ul de medio con 100-200 uci de isótopo (cromato de sodio 200-400 uci/mg) a  $22^\circ$  durante 30 a 60 minutos. Luego de marcadas las células, se lavaron 6 veces con medio y se resuspendieron a la concentración deseada.

#### Preparación de Ciclosporina A- $^{125}\text{I}$

Se disolvió la Ciclosporina A en buffer fosfato 70 mM, pH 7,4 conteniendo 50% de etanol, hasta una concentración de 2,6 mg/ml. Se agregó al tubo Cloramina T disuelta en el mismo buffer hasta una concentración de 0,13 mg/ml y 1 mci de  $^{125}\text{I}$  (Iodo libre de portador en solución de NaOH). Se agitó durante 30 segundos y se agregaron 8,4 mg de metabisulfito de sodio y 15 mg de KI, en solución acuosa. Luego se agregó agua hasta llevar el porcentaje de etanol a menos del 20%, para precipitar la Ciclosporina A. Después de centrifugar, se lavó el precipitado 2 veces con solución de  $\text{NaHCO}_3$  0,01 M en NaCl 0,9%. El precipitado se disolvió en etanol 50% hasta una actividad de 15 uci/ml. La eficiencia de la marcación fue de alrededor de 15%. Pasando la solución de Ciclosporina A- $^{125}\text{I}$  por una columna de Sephadex G-10 equilibrada en etanol 50%, toda la radiactividad se recupera en el excluido.

#### Medición de la radiactividad

Se realizó usando una mezcla centelleadora de tolueno, PPO y POPOP



( 2,5 l - 12,5 g - 125 mg ). Cuando fue necesario se agregó a la mezcla Tritón X-100 30%. Se utilizó un aparato LKB Wallac 81000 para  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ . La radiactividad de  $^{125}\text{I}$  fue detectada con un contador LKB Wallac 8000 gamma.

### Microscopía electrónica

Se realizó sobre sedimentos de células fijados de la siguiente manera: 15 minutos a  $22^\circ$  en buffer cacodilato 0,09 M, pH 7,2 conteniendo 2,5% glutaraldehído y  $\text{CaCl}_2$  3 mM. Subsecuentemente los sedimentos fueron fijados con tetróxido de osmio 1% en buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,2 durante 1 hora a  $22^\circ$ , lavados con agua destilada, fijados con acetato de uranilo 1% durante 1 hora a  $22^\circ$  deshidratados con etanol y embebidos en Araldita. Luego de fijados, se cortaron los bloques con un micrótopo LKB ultratome III, se tiñeron las secciones con citrato de plomo y se examinaron con microscopio electrónico AEI-EM6B.

### Determinación de viabilidad por exclusión de azul tripan

A 1 ml de suspensión de células, se agregó 0,1 ml de solución de azul tripan 0,4%. Se dejó a T ambiente durante 4 minutos y se contaron las células en un hemocitómetro.

REACTIVOS

La Ciclosporina A fué un regalo de Sandoz Ltd. Biological and Medical Research Division, Basilea. Dextrano T-500, nucleósidos y nucleótidos Sigma Chemical Company, Saint Louis. Ficoll-paque, solución acuosa de densidad  $1,077 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$ , que contiene 5,7 g de Ficoll 400 y 9 g de diatrizoato de sodio cada 100 ml, Pharmacia Fine Chemicals. Medios RPMI 1640, MEM, DMEM, F-12, MEM ; PBS, PWM, suero bovino, suero bovino fetal y suero equino, Grand Island Biological Co., New York. PHA, Wellcome Research Lab., Inglaterra. Con A, Boehringer. Filtros de microfibra de vidrio GF/C, Whatman Ltd., Inglaterra. Placas de PEI-celulosa, Eastman Kodak Co., Rochester. PPO, POPOP, Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee. Todos los compuestos radiactivos son de Radiochemical Centre Amersham, Inglaterra. PBSA: cada 100 ml contiene: NaCl 0,8 g, KCl 0,02 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,216 g. Todos los demás reactivos son de grado analítico.

## RESULTADOS

### Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de DNA en linfocitos estimulados por mitógenos y en cultivo mixto de linfocitos

Con el objeto de detectar la acción inmunosupresora de la Ciclosporina A "in vitro", se agregaron distintas cantidades de la misma a cultivos de linfocitos estimulados por alguna de las siguientes lectinas: PHA, PWM o Con A y se midió la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA a distintos tiempos después del agregado de la droga.

Esta incorporación incluye sólo el precursor radiactivo ligado a macromoléculas precipitables por TCA y abarca tanto el proceso de síntesis como el de reparación.

Como puede apreciarse en la figura 5, se observó una creciente inhibición de la síntesis de DNA que resultó dependiente de la dosis de Ciclosporina A.

La síntesis de DNA en cultivos de linfocitos mezcla de distintos dadores también se encuentra inhibida por Ciclosporina A (Fig.6). En este caso el estímulo mitogénico está dado por la interacción entre las poblaciones heterogéneas de linfocitos.

### Efecto de Ciclosporina A sobre linfocitos estimulados y no estimulados

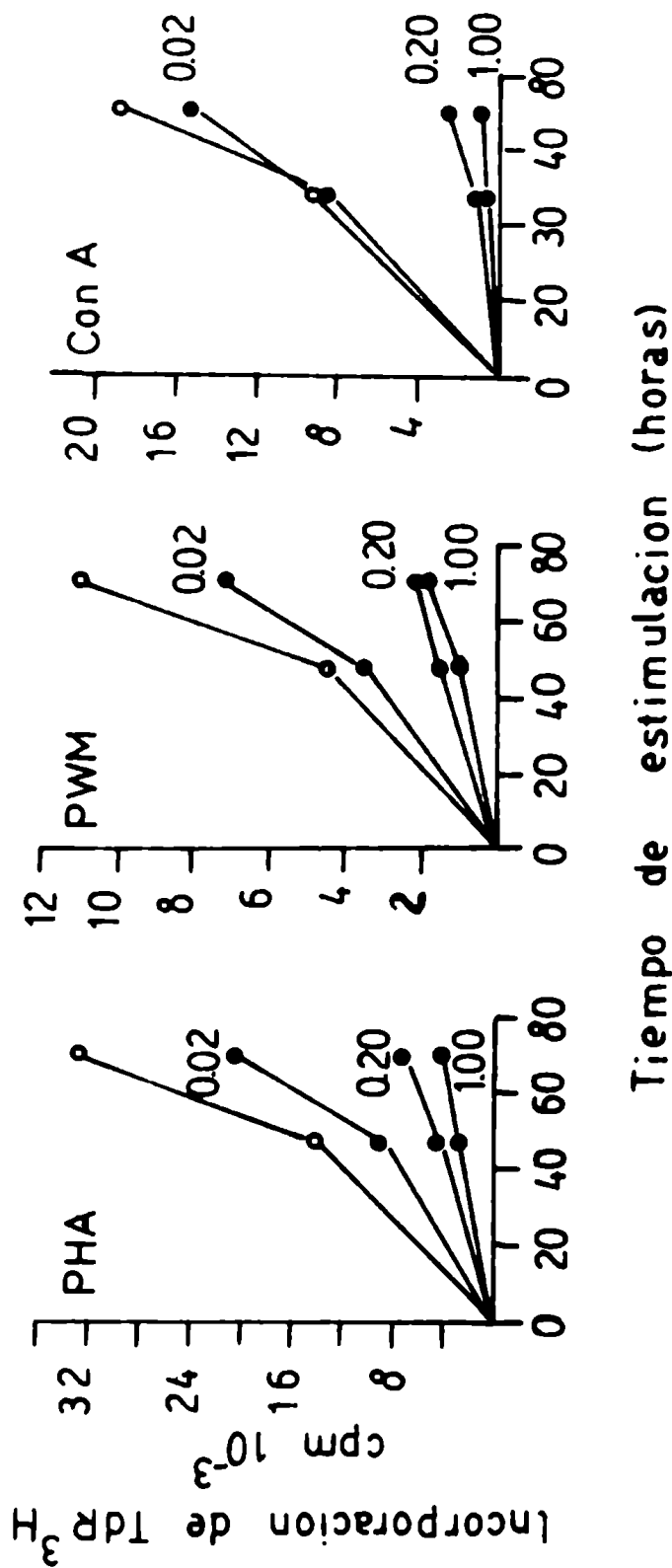
Cuando se agrega Ciclosporina A a cultivos de linfocitos, a distintos tiempos después del agregado de PHA, la disminución de la velocidad de síntesis de DNA que se obtiene es similar, independientemente del tiempo de la adición (Fig.7). Esto indicaría que la droga actuó en el proceso de transformación, ya sea al comienzo o durante el mismo, y no en el período de reposo del linfocito.

Esta conclusión también se deduce del número de blastos y linfocitos pequeños observados después de la adición de Ciclosporina A, ya sea desde el comienzo o después de un cierto tiempo de iniciada la proliferación (estimulación por mitógeno), como puede verse en la Tabla 1.

La disminución del número de células después del agregado de Ciclosporina A se debe principalmente a la disminución del número de

Figura 5

Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de DNA en Linfocitos

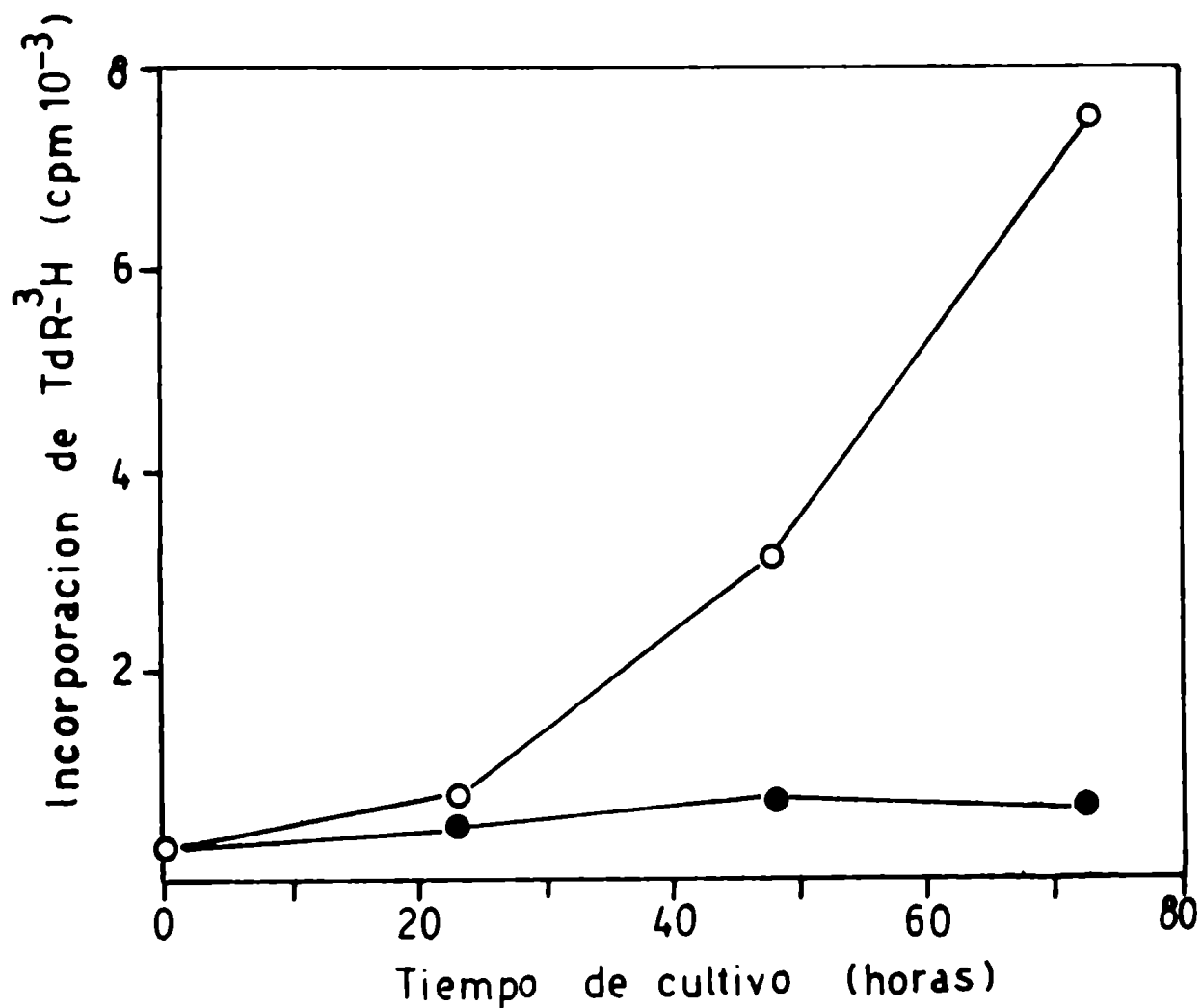


Se midió la incorporación de  $TdR-^3H$  a material insoluble en TCA 5%, a las 47 y 70 horas después de la adición de mitógenos a los cultivos. Duración del pulso: 5 horas. Los mitógenos se usaron en las siguientes concentraciones: PHA 1  $\mu g/ml$ , Con A 10  $\mu g/ml$ , PWM 1% (v/v del lio filizado reconstituido). En todos los cultivos la concentración de etanol fue 0,2%. Esta concentración no afecta el crecimiento de los linfocitos.

Los controles, que no tienen la droga, se indican en círculos abiertos. En círculos cerrados se expresan las incorporaciones en presencia de concentraciones crecientes de la droga, expresadas en  $\mu g/ml$ .

Figura 6

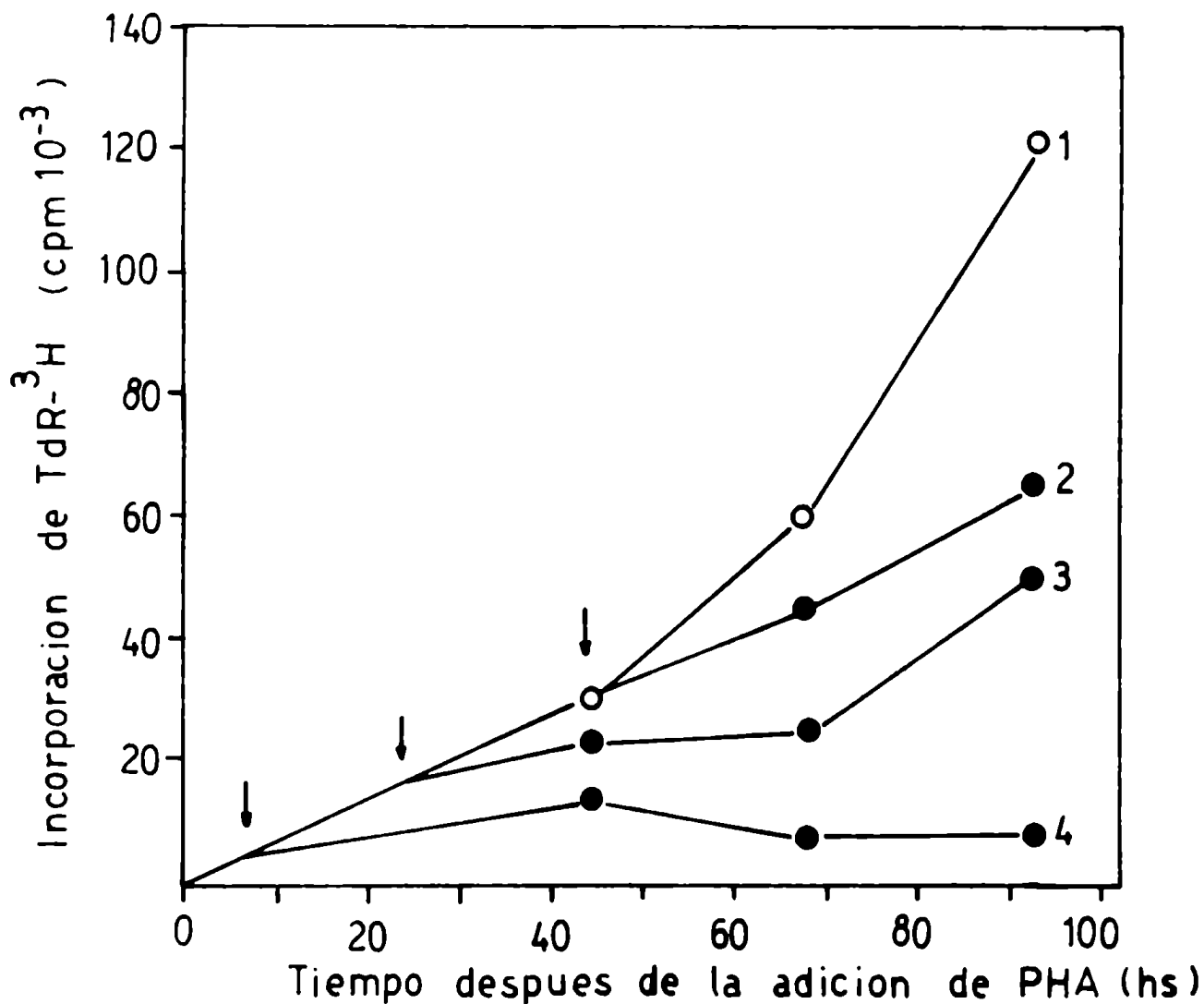
Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de DNA en cultivo mixto de linfocitos



Se cultivaron linfocitos obtenidos de una mezcla de sangre de 5 donadores y se midió la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA 5%, a distintos tiempos durante el cultivo, en ausencia de Ciclosporina A (O), o en presencia de Ciclosporina A 1 ug/ml (●).

Figura 7

Efecto de la adición de Ciclosporina A a distintos tiempos luego del agregado del mitógeno, sobre la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H.



Se midió la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a varios tiempos después de la adición de PHA. Las flechas indican los tiempos a los que se agregó 1 ug/ml de Ciclosporina A a cada serie de cultivos (curvas 2, 3 y 4). La curva 1 indica el comportamiento de cultivos controles que no recibieron la droga.

Tabla 1

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de  $\text{TdR-}^3\text{H}$  y el número de blastos y linfocitos pequeños en cultivos estimulados

Experimento	Período de cultivo (horas)	Ciclosporina A	Número de células (cél. $\cdot 10^{-4}$ /ml)		Diferencias		Captación de $\text{TdR-}^3\text{H}$ (cpm $10^{-3}$ /hora)		
			Total	Linfocitos pequeños	Blastos	Linfocitos pequeños	Total	Insoluble en TCA	
A	68	-	72	41	31	12	4	29,1	-
		+	56 (22%)	37	19 (39%)			12,7 (56%)	-
B	60	-	117	54	63	41	13	90,7	52,4
		+	63 (46%)	45	22 (65%)			14,2 (85%)	10,0 (81%)
C	98	-	86	38	48	12	0	136,2	-
		+	74 (14%)	38	36 (25%)			36,8 (73%)	-
		-	124	53	71	19	5	162,9	103,2
		+	100 (24%)	48	52 (27%)			50,1 (24%)	16,5 (84%)

Tabla 1. Experimentos A y B: los linfocitos fueron cultivados todo el tiempo en presencia de Ciclosporina A, 1 ug/ml y PHA, 1 ug/ml. Experimento C: los linfocitos se cultivaron 43 horas en presencia de PHA y luego se agregó la ciclosporina A. Los pulsos de TdR-<sup>3</sup>H y conteos se hicieron 25 y 56 horas más tarde. Los resultados son un promedio de 4 a 8 conteos. Los porcentajes entre paréntesis indican la inhibición por Ciclosporina A con respecto a los resultados obtenidos sin la droga.

blastos. No obstante ello la inhibición de la captación de timidina, ya sea la total, que incluye además del material incorporado a macromoléculas al conjunto de metabolitos del pool soluble, o la insoluble en TCA 5%, no puede explicarse solamente por la disminución del número de células. Debe haber además una inhibición similar de la captación e incorporación de timidina a DNA en las células sobrevivientes.

La inhibición de la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA 5% siempre estuvo acompañada por una inhibición similar de la captación total de timidina y de la incorporación a material soluble en TCA 5% (Fig. 3A, 3B, 3C).

Si se grafica la velocidad de síntesis de DNA en función de la captación total de TdR-<sup>3</sup>H o en función de la incorporación a material soluble, se encuentra una dependencia lineal de la síntesis de DNA con la captación del precursor radiactivo, y esta no varía en presencia de la droga. O sea que la velocidad de marcación de DNA es siempre proporcional a la marcación de la fracción soluble, independientemente de la presencia de la droga. En la figura 9 puede observarse que, alcanzada una determinada marcación del pool soluble, lo que requerirá un mayor tiempo en el caso en que la droga esté presente, la marcación de material insoluble en TCA 5% que se obtiene es la misma.

Esto indicaría que la inhibición de la incorporación del precursor a DNA en presencia de la droga es consecuencia de la disminución de la incorporación de precursor a la fracción soluble. O sea que, por lo menos en la primera etapa, se trataría de una inhibición a nivel de transporte del mismo.

#### Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de TdR-<sup>3</sup>H

Para descartar la posibilidad de que la acción de la Ciclosporina



Figura 8

Velocidad de incorporación de TdR-<sup>3</sup>H en presencia de Ciclosporina A

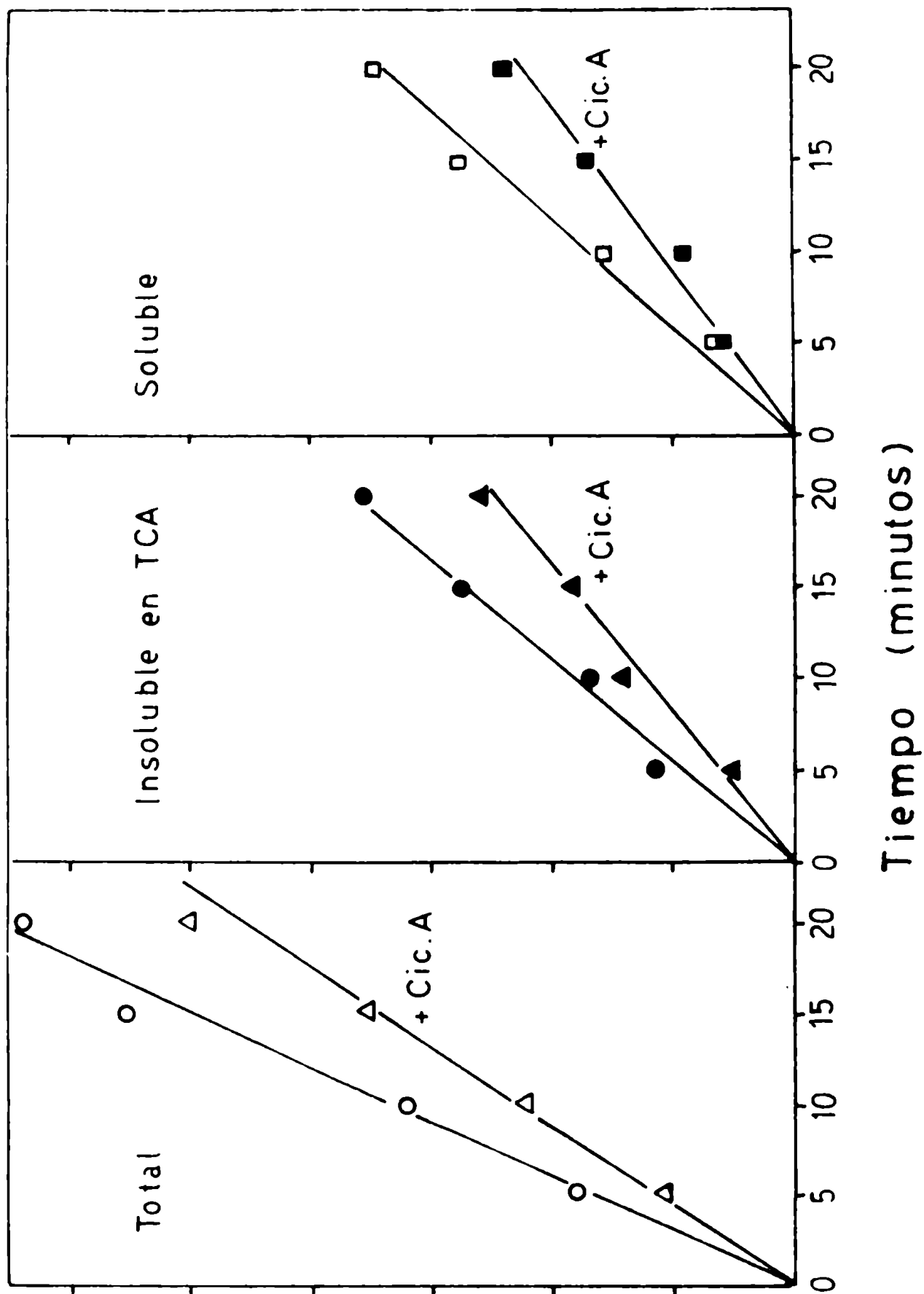


Figura 8. Se estimularon linfocitos durante 50 horas con PHA y se dividió el cultivo en 2 partes, a una de las cuales se agregó Ciclosporina A. Se dejó en cultivo durante 16 horas, después de las cuales se midió la velocidad de captación total de TdR-<sup>3</sup>H y la de incorporación a material insoluble en TCA 5%. Por diferencia se obtuvo la incorporación a material soluble.

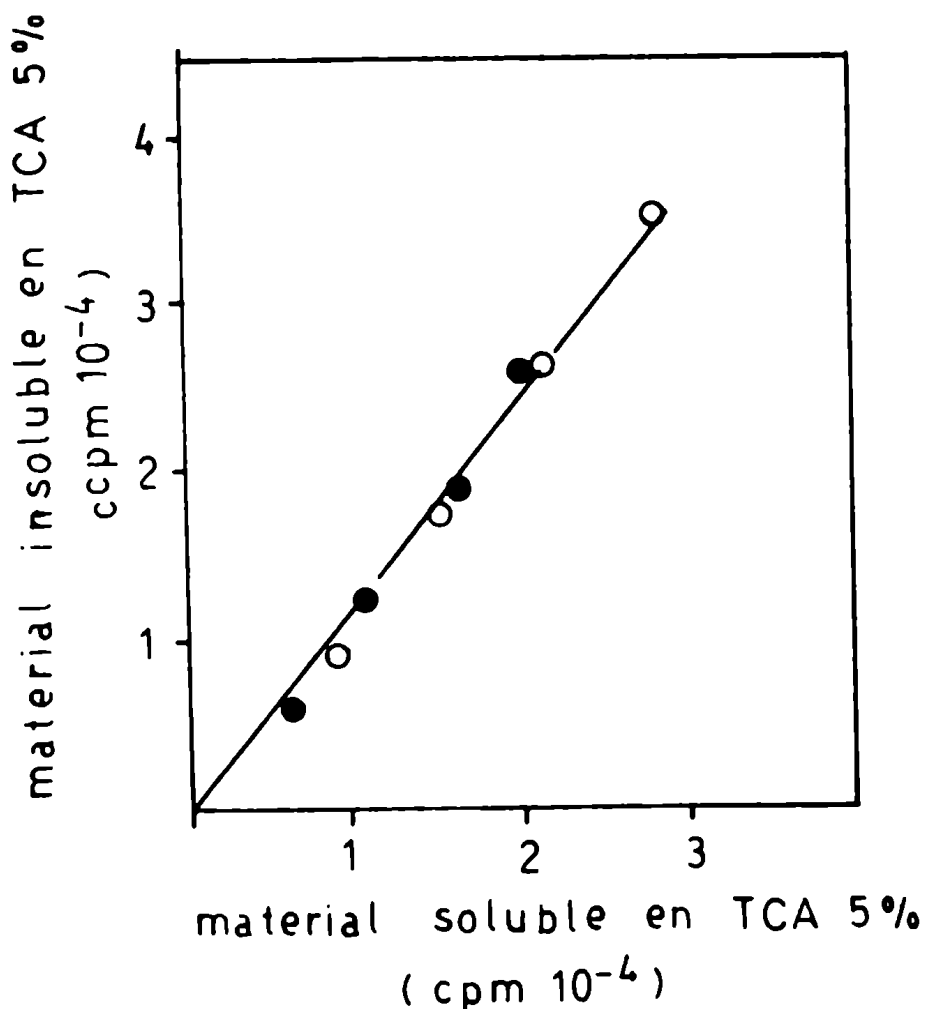
A: incorporación total de TdR-<sup>3</sup>H en presencia (  $\Delta$  ) y ausencia (  $\circ$  ) de Ciclosporina A.

B: incorporación a materia insoluble en TCA 5% en presencia (  $\blacktriangle$  ) y ausencia (  $\bullet$  ) de Ciclosporina A.

C: incorporación a material soluble en presencia (  $\blacksquare$  ) y ausencia (  $\square$  ) de Ciclosporina A.

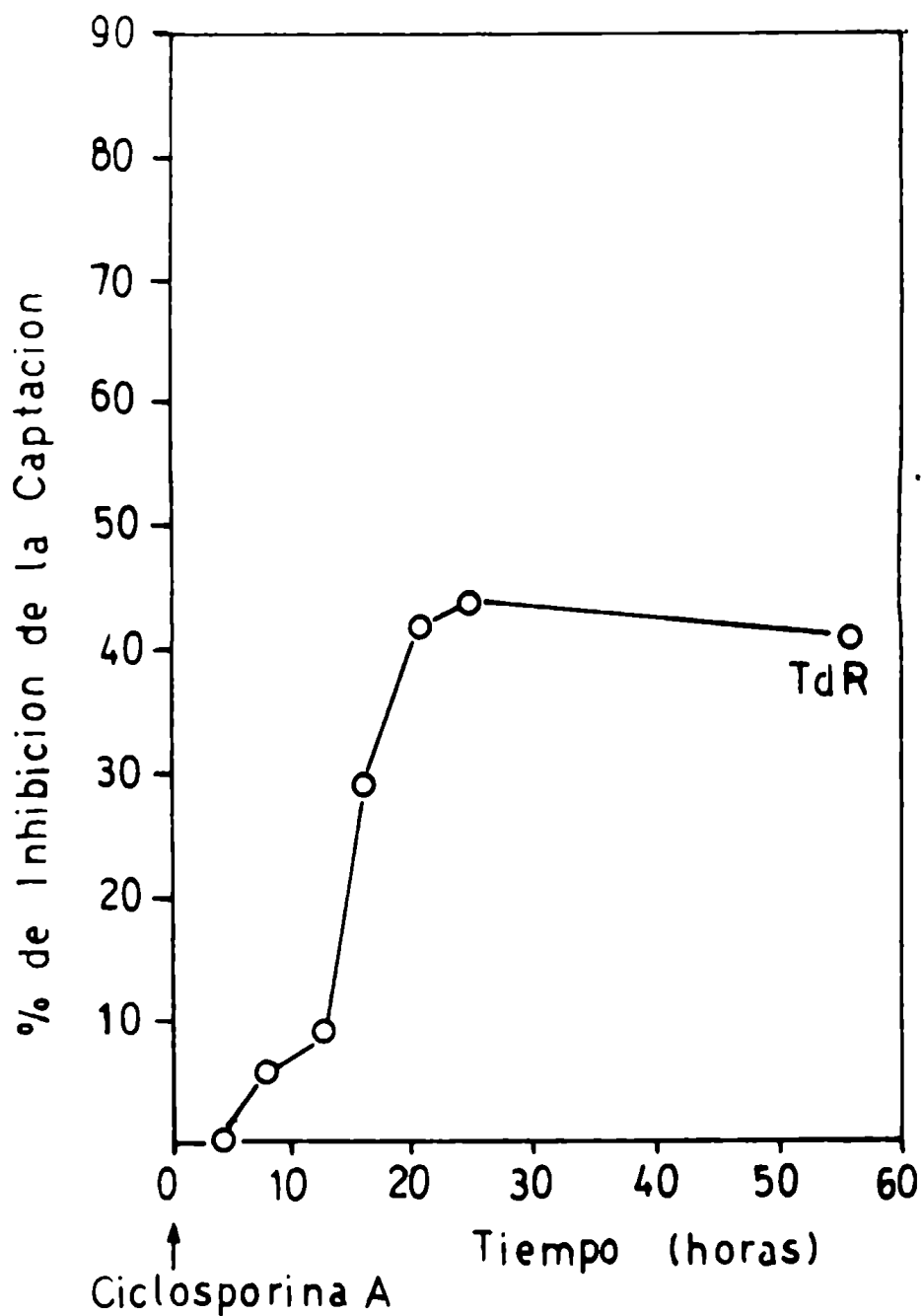
Figura 9

Incorporación a material insoluble en TCA 5% en función de la incorporación a material soluble.



Datos correspondientes al experimento anterior (Fig. 8).

Figura 10

Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de TdR-<sup>3</sup>H

Se cultivaron linfocitos durante 48 horas en presencia de PHA (1 ug/ml), luego de lo cual se agregó Ciclosporina A (1 ug/ml) al cultivo. A los tiempos indicados en la abscisa, se midió la velocidad de captación de TdR-<sup>3</sup>H, como se indica en materiales y métodos.

A sea una simple competición a nivel del sistema de transporte del precursor se determinó el tiempo requerido para que la droga comience a ejercer su efecto inhibitorio.

Para ello se midió la velocidad de captación de TdR-<sup>3</sup>H a distintos tiempos después del agregado de Ciclosporina A a cultivos de linfocitos estimulados previamente con PHA durante 48 horas.

Los resultados de la figura 10, graficados como % de inhibición en función del tiempo transcurrido después del agregado de la droga, muestran que la simple presencia de la misma no tiene ningún efecto sobre el ensayo de incorporación del precursor y que la captación de timidina comienza a inhibirse alrededor de 10 horas después del agregado de Ciclosporina A.

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de uridina

Como no se encontró efecto de Ciclosporina A en dosis de 0,25 ug por ml. sobre la actividad de timidina kinasa "in vitro", se consideró la posibilidad de que la droga tuviese acción generalizada sobre sistemas de transporte. Se decidió estudiar el efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR, obteniéndose resultados similares a los obtenidos en el caso de TdR (Tabla 2).

Tabla 2

Inhibición de la captación de UR-<sup>3</sup>H y TdR-<sup>3</sup>H por Ciclosporina A

Ciclosporina A	Captación de TdR- <sup>3</sup> H cpm/min			Captación de UR- <sup>3</sup> H cpm/min		
	Total	Insoluble en TCA 5%	"soluble"	Total	Insoluble en TCA 5%	"soluble"
-	3.400	1.750	1.650	2.200	1.100	1.100
+	2.400 (29%)	1.275 (27%)	1.125 (32%)	675 (69%)	375 (66%)	300 (73%)

Se estimularon linfocitos durante 42 horas con PHA, 1 ug/ml, luego se agregó Ciclosporina A, 1 ug/ml, y 16 horas más tarde se midió la captación de precursores radiactivos. Los números entre paréntesis indican los % de inhibición.

Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR-<sup>3</sup>H

La posibilidad de que la Ciclosporina A actuara inespecíficamente sobre todos los sistemas de transporte, se descartó midiendo el tiempo en el cual la captación de UR comienza a inhibirse en presencia de la droga.

Se midió la velocidad de captación de UR-<sup>3</sup>H, a distintos tiempos luego del agregado de Ciclosporina A, en cultivos de linfocitos estimulados. En este caso, se detecta efecto inhibitorio poco tiempo después del agregado de la droga (Fig. 11).

#### Efecto de UR exógena sobre el transporte de TdR en presencia y ausencia de Ciclosporina A

Ya que la captación de UR comienza a inhibirse varias horas antes que la de TdR, se intentó revertir la inhibición de la captación de esta última, haciendo el experimento en presencia de UR  $10^{-5}$  M. Como se ve en la figura 12 no se obtuvo ningún efecto de reversión por UR.

#### Cinética de captación de UR. Efecto de Ciclosporina A

Para determinar como se afecta el sistema de transporte de UR por Ciclosporina A, se midió la cinética de captación en presencia y ausencia de la droga. Los datos de velocidad de captación se obtuvieron midiendo la captación total del metabolito marcado a distintos tiempos, para diversas concentraciones del mismo.

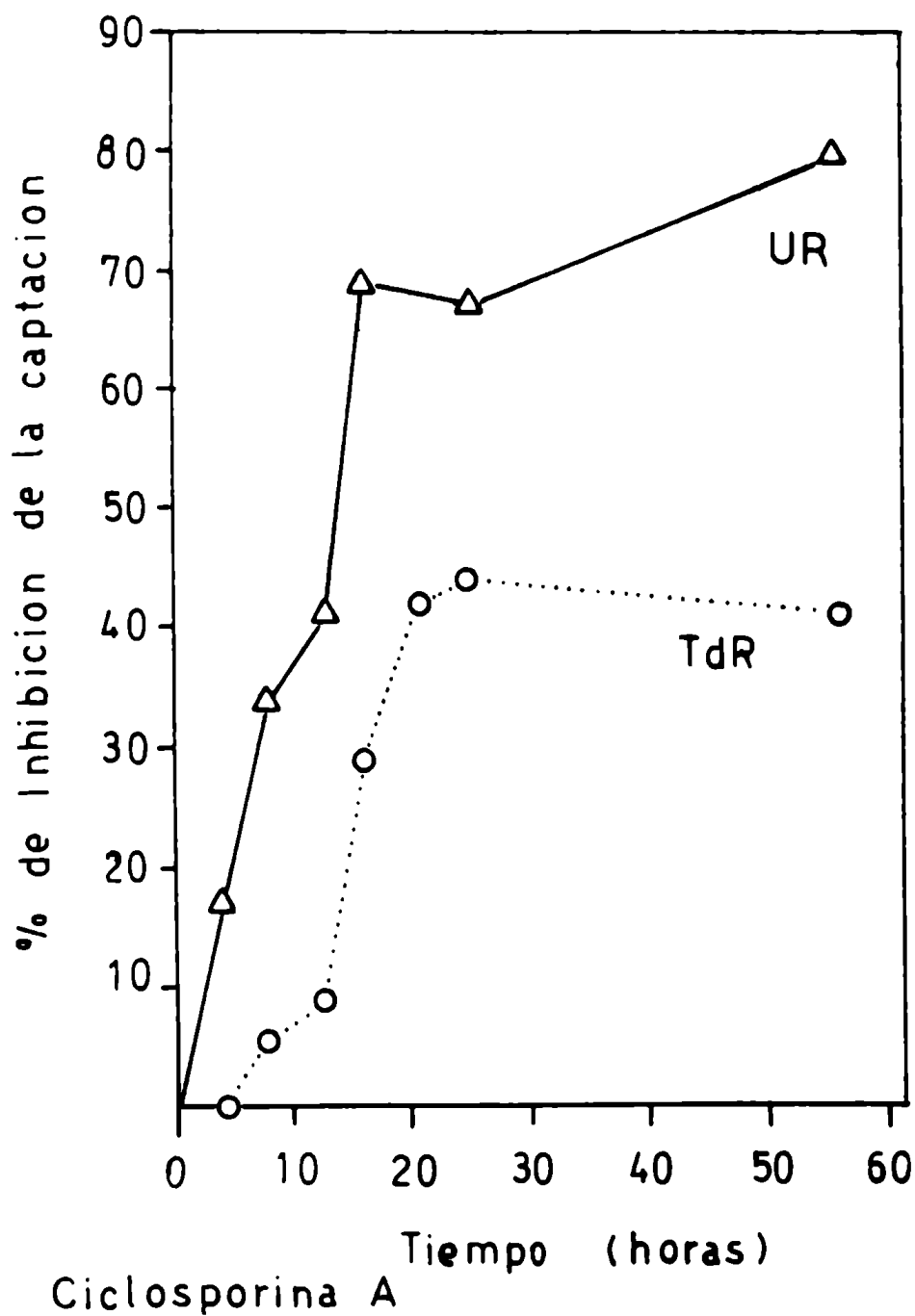
Representando la velocidad inicial para cada concentración de UR, en función de la concentración de la misma se obtuvo una cinética de captación de tipo Michaeliana. En el gráfico de Lineweaver-Burk, que representa las inversas de las velocidades de incorporación respecto de las inversas de las concentraciones de UR (Fig. 13) se observa que la Ciclosporina A incrementa el  $K_M$  aparente del sistema, mientras que la velocidad máxima no se encontró afectada.

#### Relación dosis-respuesta entre la concentración de Ciclosporina A y la captación de UR

El grado de inhibición de la captación es función de la concentración de Ciclosporina A en el cultivo. Como puede verse en la figura 14,  $K_{ap}$  para la incorporación de UR aumenta linealmente con el aumento de la concentración de la droga presente durante las últimas 6 horas de cultivo.

Figura 11

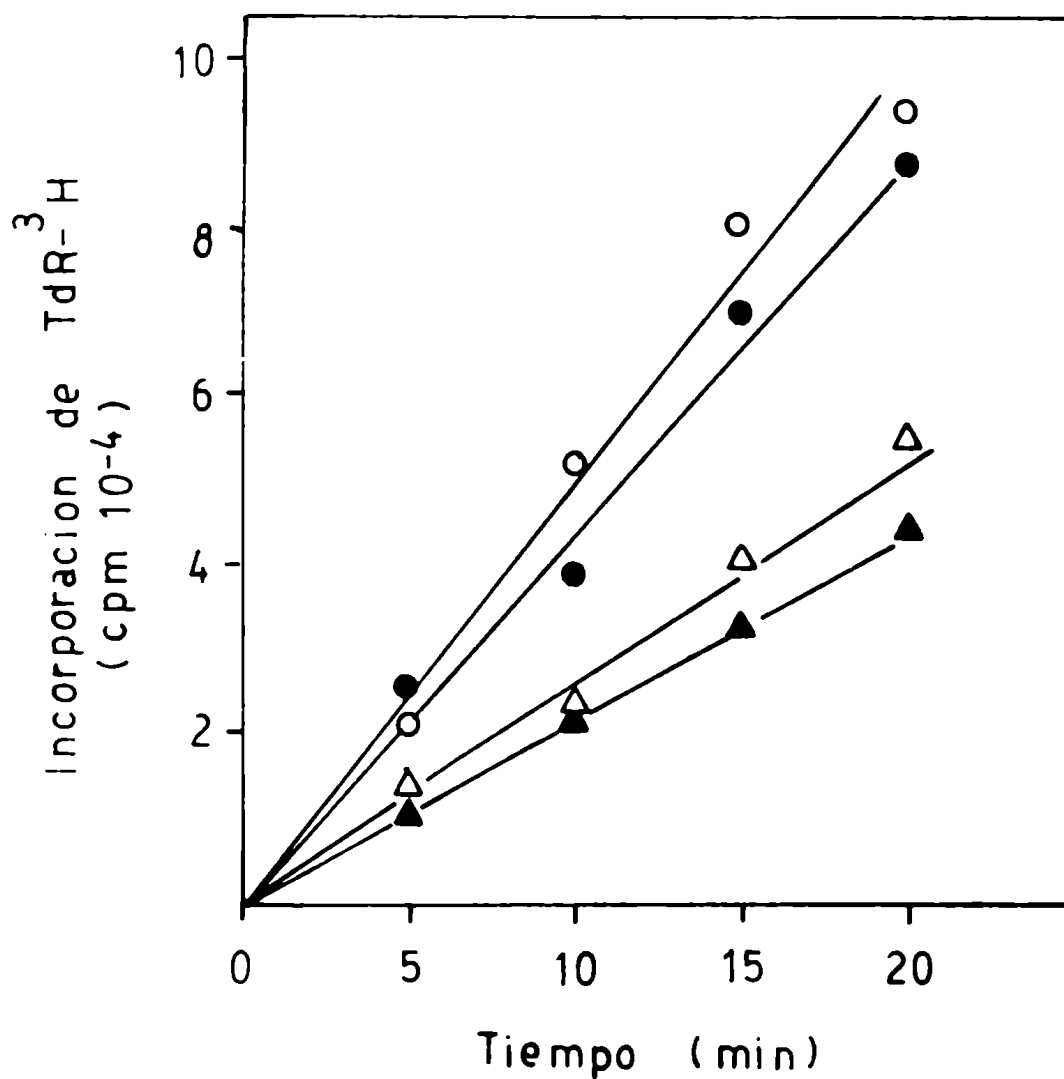
Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR-<sup>3</sup>H



Se cultivaron linfocitos durante 48 horas en presencia de PHA (1 ug/ml), luego de lo cual se agregó Ciclosporina A (1 ug/ml) al cultivo. A los tiempos indicados en la abscisa, se midió la velocidad de captación de UR-<sup>3</sup>H, como se indica en materiales y métodos.

Figura 12

Efecto de UR exógena sobre la acción de Ciclosporina A



Se cultivaron linfocitos durante 45 horas en presencia de PHA, se dividió el cultivo en 4 series y se hicieron los siguientes agregados: ( O ) sin adiciones, ( ● ) UR 10 uM, ( Δ ) Ciclosporina A 1 ug/ml, ( ▲ ) Ciclosporina A 1 ug/ml y UR 10 uM. Se dejó cultivando durante 11 horas más y se midió la captación de TdR-<sup>3</sup>H a distintos tiempos.



Figura 13

Efecto de Ciclosporina A sobre la cinética de incorporación de UR

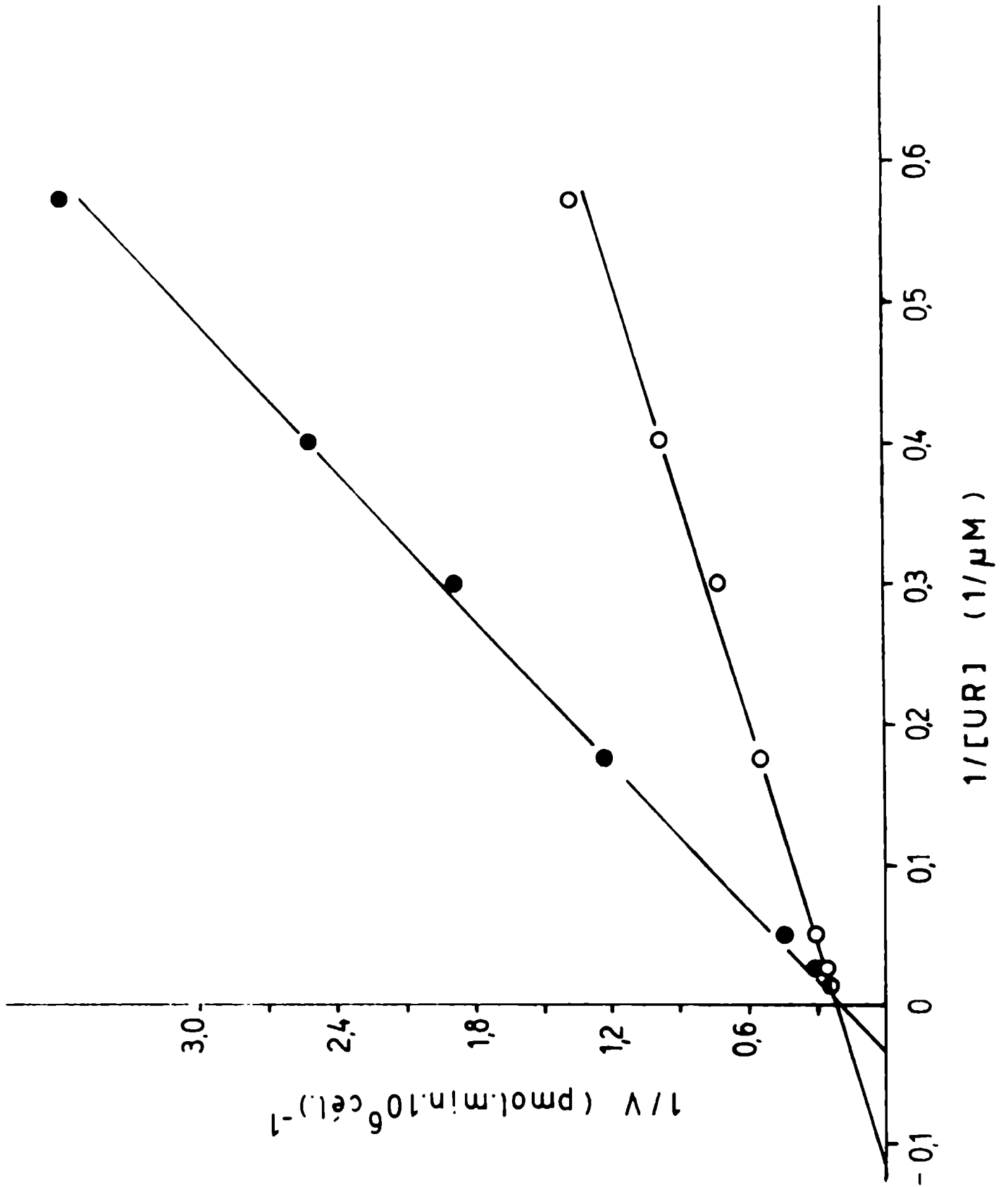


Figura 14 A

Efecto de Ciclosporina A sobre la  $K_{ap}$  para la captación de UR

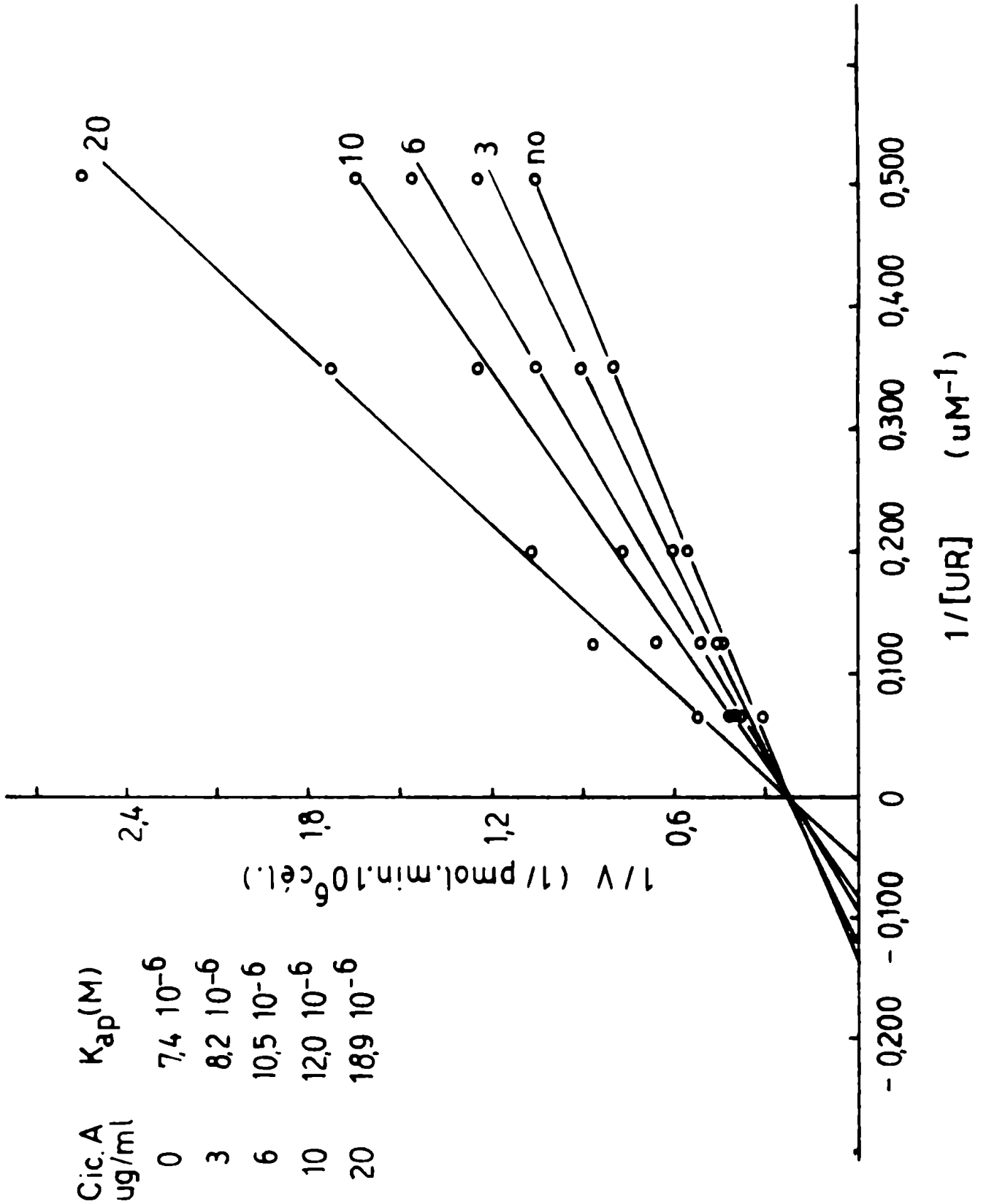


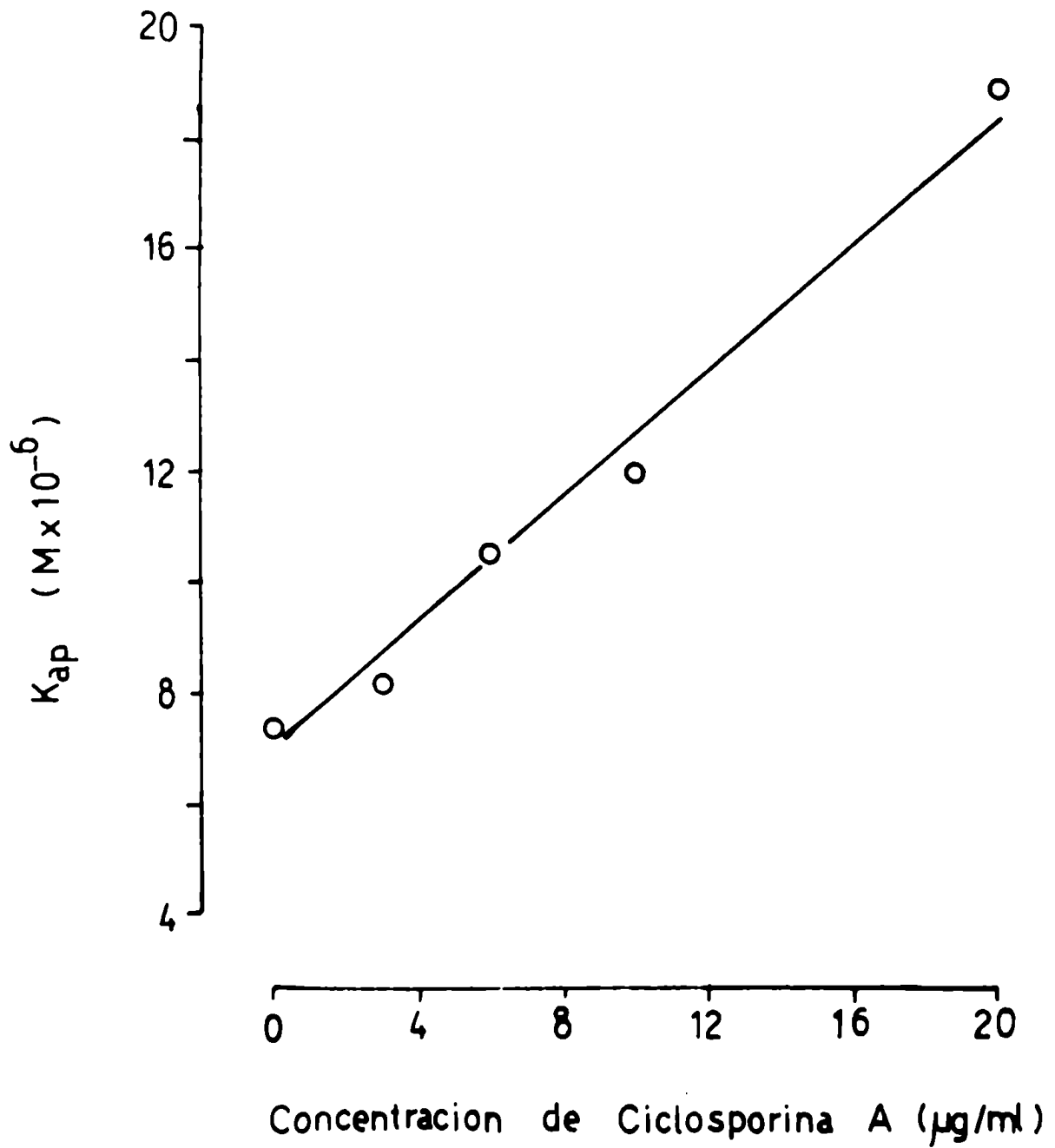
Figura 14 BEfecto de Ciclosporina A sobre la  $K_{ap}$  para la captación de UR

Figura 13. Se cultivaron linfocitos durante 64 horas en presencia de PHA, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en medio fresco con 8% de suero equino. Se agregó Ciclosporina A a algunas alícuotas y se siguió el cultivo por 6 horas más, al cabo de las cuales se determinó la velocidad de captación en función de la concentración de UR (2-100  $\mu\text{M}$ ) (1 uci/ml) y se calculó la velocidad aparente.

Figura 14 (A, B). Se estimularon linfocitos durante 80 horas con PHA, se cosecharon y resuspendieron en medio fresco con 3% de suero equino. Se agregaron distintas cantidades de Ciclosporina A a algunas alícuotas y se siguió el cultivo por 6 horas más. Luego se determinó la velocidad de captación en función de la concentración de UR (2-15  $\mu\text{M}$ ) (1 uci/ml) y se calculó la velocidad aparente. Las velocidades máximas fueron idénticas a todas las concentraciones de Ciclosporina A utilizada.

Especificidad del efecto de Ciclosporina A: efecto sobre la cinética de captación de citosina, adenosina y guanosina

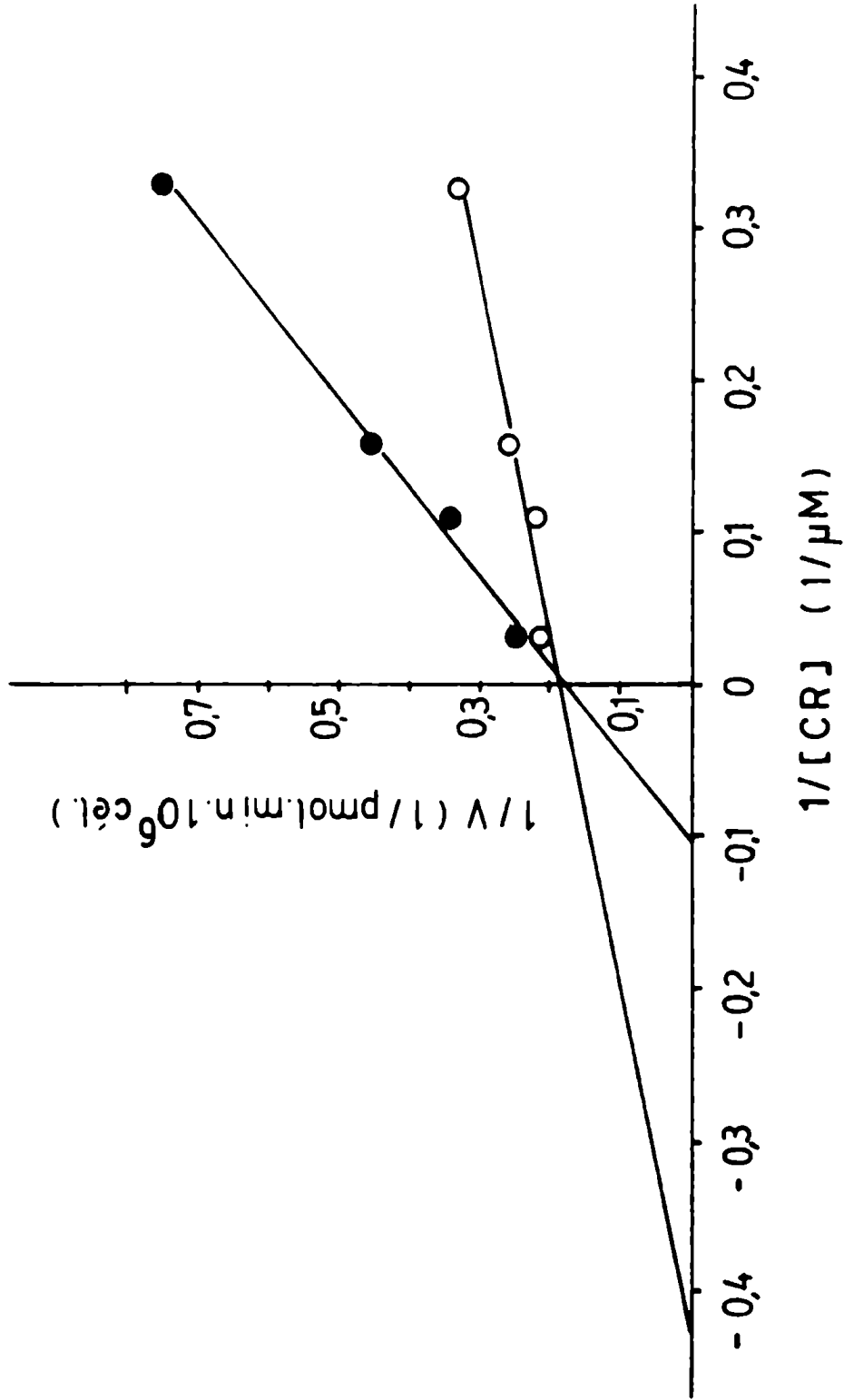
Para determinar si otros nucleósidos veían afectado su transporte en presencia de Ciclosporina A, se midió la cinética de captación de citidina, adenosina y guanosina en presencia y ausencia de la droga.

Con citidina y adenosina, se obtuvieron resultados similares a los de uridina, esto es, un aumento marcado del  $K_M$  aparente para la captación del nucleósido (Fig. 15, 16). Con guanosina, por el contrario, se encontró que la droga disminuye la velocidad máxima del sistema de transporte (Fig. 17).

En la tabla 3, se resumen los parámetros cinéticos de la captación de ribonucleósidos.

Figura 15

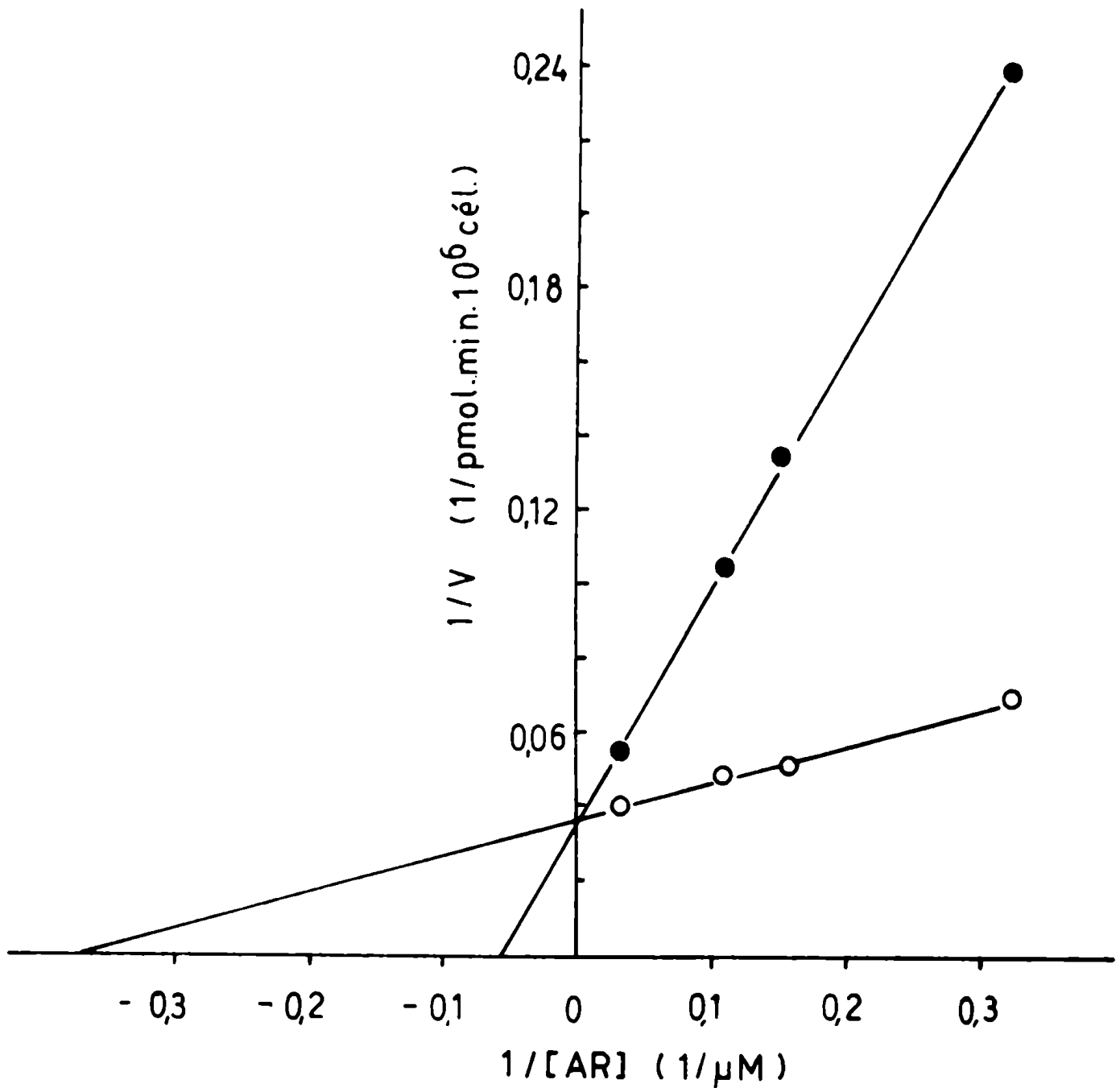
Efecto de Ciclosporina A sobre la cinética de captación de citosina



Se cultivaron linfocitos durante 67 horas en presencia de PHA, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en medio fresco con 5% de suero equino. Se dividió el cultivo en 2 series de alícuotas a las que se agregaron distintas cantidades de citosina (3 - 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), a una de las series se agregó Ciclosporina A. Se dejaron los cultivos durante 6 horas más y se determinó la velocidad de captación de CR para cada concentración.

Figura 16

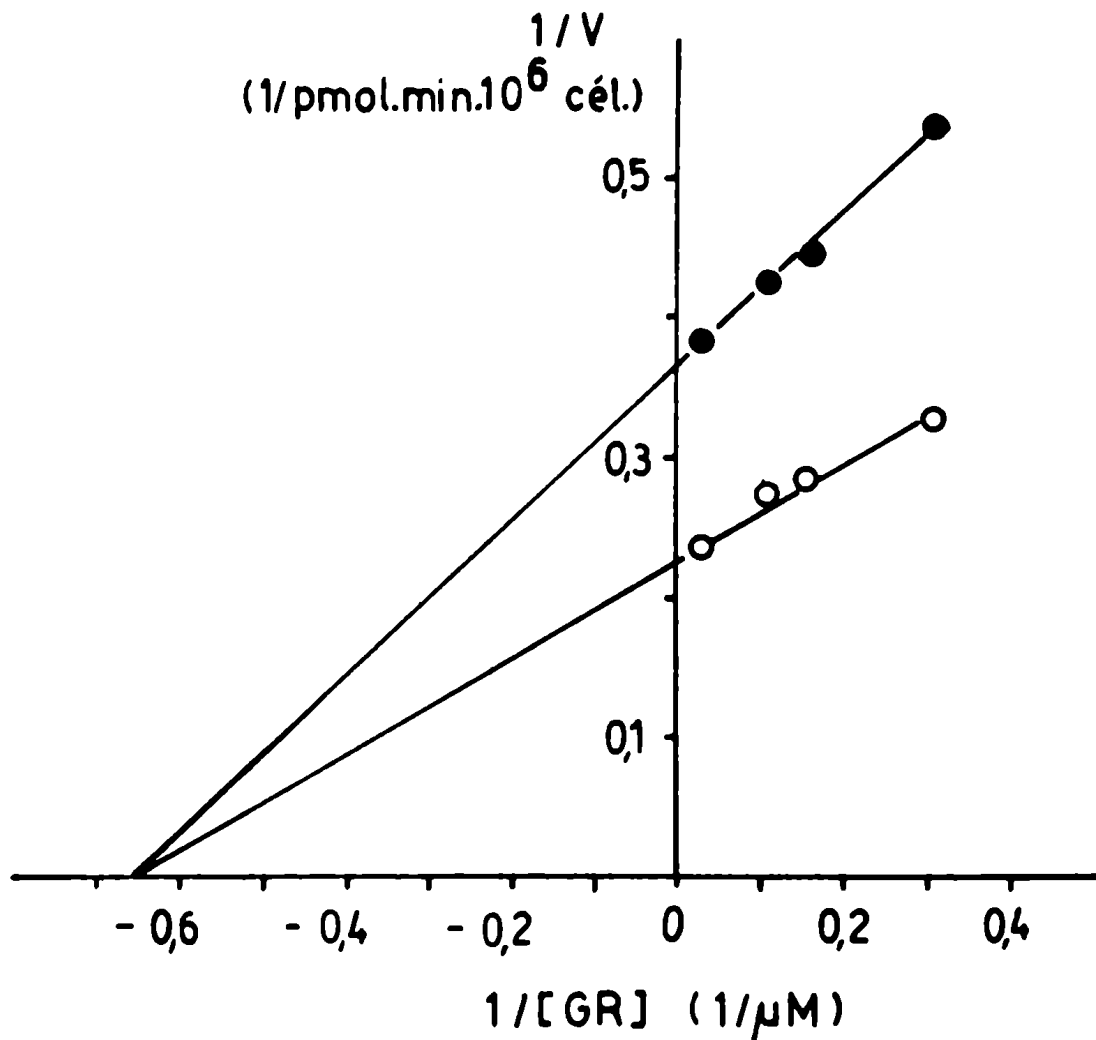
Efecto de Ciclosporina A sobre la cinética de captación de adenosina



Se cultivaron linfocitos durante 67 horas en presencia de PHA, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en medio fresco con 5% de suero equino. Se dividió el cultivo en 2 series de alícuotas a las que se agregaron distintas cantidades de adenosina (3-50  $\mu\text{M}$ ) (1uci/ml), a una de las series se agregó además, Ciclosporina A. Se dejaron los cultivos durante 6 horas más y se determinó la velocidad de captación de adenosina para cada concentración.

Figura 17

Efecto de Ciclosporina A sobre la cinética de captación de guanosina



Se cultivaron linfocitos durante 67 horas en presencia de PHA, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en medio fresco con 5% de suero equino. Se dividió el cultivo en 2 series de alícuotas a las que se agregaron distintas cantidades de guanosina (3-50  $\mu$ M) (1  $\mu$ ci/ml), a una de las series se agregó además, Ciclosporina A. Se dejaron los cultivos durante 6 horas más y se determinó la velocidad de captación de guanosina para cada concentración.

Tabla 3

Parámetros cinéticos de la captación de nucleósidos

Nucleósido	Ciclosporina A	$K_M$ o $K_{ap}$ ( $\mu M$ )	$V_M$ (pmoles/min. $10^6$ cél.)
UR	-	7,4	4,9
	+	10,5	4,9
CR	-	2,2	5,3
	+	9,5	5,3
AR	-	2,7	28,0
	+	18,2	28,0
GR	-	1,5	4,5
	+	1,5	2,8



### Acción de la Ciclosporina A sobre la metabolización de los nucleósidos incorporados

La inhibición de la captación de nucleósidos observada, puede deberse al efecto de la Ciclosporina A sobre los procesos de metabolización de los mismos. Para esclarecer este punto, se intentó medir el contenido de nucleótidos en linfocitos estimulados tratados y sin tratar con Ciclosporina A. Para ello se marcaron linfocitos en cultivo con bases o nucleósidos radiactivos, y se aislaron los nucleótidos según lo descrito en materiales y métodos. Paralelamente se midió la captación total de UR-<sup>3</sup>H para comprobar el efecto inhibitorio de la droga.

Se encontró que la radiactividad incorporada a nucleótidos en linfocitos tratados con Ciclosporina A, es mucho menor, pero esto es debido probablemente a la menor captación de precursores radiactivos.

Como no pudo medirse la cantidad absoluta de cada nucleótido, por razones de metodología, se decidió medir la proporción relativa de algunos nucleótidos analizándolos por cromatografía en placa de PEI-celulosa, para ver si ésta se encontraba alterada en presencia de la droga.

Utilizando como precursores radiactivos, bases marcadas con <sup>14</sup>C ó nucleósidos marcados con <sup>3</sup>H, en la mayoría de los experimentos se encontró una pequeña diferencia en la proporción de nucleótidos de adenina y uracilo. No se observó ninguna diferencia para los de citosina y guanina. En la tabla 4 puede observarse el resultado de un experimento típico.

### Estudios sobre fosforilación de nucleósidos y nucleótidos por extractos crudos de linfocitos

Con el objeto de determinar si la inhibición de la captación de nucleósidos podía deberse a una alteración en el proceso de conversión de los nucleósidos precursores en los correspondientes nucleótidos, se estudió el efecto de la droga sobre la capacidad de extractos crudos de fosforilar dichos nucleósidos. En un principio se utilizó UR como sustrato y como fuente de enzima extractos de linfocitos estimulados.

Tabla 4

Composición relativa de nucleótidos en linfocitos tratados y no tratados con Ciclosporina A

Nucleósido	Ciclosporina A	% XMP	% XDP	% XTP
UR	-	10	12	78
	+	16	18	66
CR	-	13	15	72
	+	14	16	70
AR	-	7	13	80
	+	14	18	68
GR	-	6	19	75
	+	6	19	75

Se cultivaron linfocitos durante 48 horas en presencia de PHA, Se dividió el cultivo en dos partes y a una se agregó Ciclosporina A, se dejó en cultivo durante 16 horas más, luego de lo cual se agregó a cada uno UR-<sup>3</sup>H, 2,5 uM final, 3,5 uci/ml. Se dejó durante 2 horas más y se cosecharon las células, se lavaron y extrajeron los nucleótidos. Se analizó la composición por cromatografía en capa delgada según lo descrito en materiales y métodos.

y cultivados en presencia o ausencia de Ciclosporina A durante las 5-6 últimas horas de cultivo, antes de la lisis.

Una de las características del proceso de fosforilación es que siempre se forman menores cantidades de UDP que de UMP y UTP. Esto indicaría que la conversión  $UDP \rightarrow UTP$  sería una reacción rápida, y la de UMP a UDP podría ser un paso limitante, en las condiciones de trabajo.

Las cantidades relativas de mono, di y tri fosforilados varían de acuerdo a la actividad de la preparación obtenida y al tiempo de incubación. Ejemplos de esto pueden verse en la figura 18. Durante los primeros 5 minutos de incubación, todas las preparaciones enzimáticas dan la misma proporción de nucleótidos, aproximadamente. Después de este tiempo, preparaciones con muy alta actividad en la formación de UTP (Fig. 18 A) no dan una alta proporción de UMP durante todo el período de incubación, sino que presenta un máximo y luego decae, concomitantemente con el aumento de la formación de UTP. Preparaciones menos activas en la síntesis de UTP (Fig. 18 B) dan un aumento continuo de los tres nucleósidos fosfato.

Utilizando este sistema se estudió la influencia de concentraciones crecientes de Ciclosporina A sobre la capacidad fosforilativa de UR, CR o AR de los respectivos extractos. Como puede verse en la figura 19 la droga disminuye en grado variable la capacidad fosforilante de dichos extractos. Es importante destacar que no se incluyen datos obtenidos con GR debido a las bajas incorporaciones observadas.

Por otro lado, cuando el experimento se realiza con células K 562, que son menos sensibles a Ciclosporina A, se encuentra que las fosforilaciones no se afectan significativamente (Fig. 20).

Figura 18. Las incubaciones se hicieron como se describe en materiales y métodos, usando  $UR-^3H$  10  $\mu M$  (5 mci/mmol) como sustrato y extractos de linfocitos estimulados como fuente de enzima. La mezcla de incubación contuvo además:  $MgCl_2$  5 mM, KCl 50 mM, ATP 10 mM, 2-mercaptoetano 5 mM y tris-HCl pH 8,2, 100 mM.

A: 67 horas de estimulación con PHA. B: 50 horas de estimulación.

Figura 18

Curvas de tiempo para la fosforilación de uridina

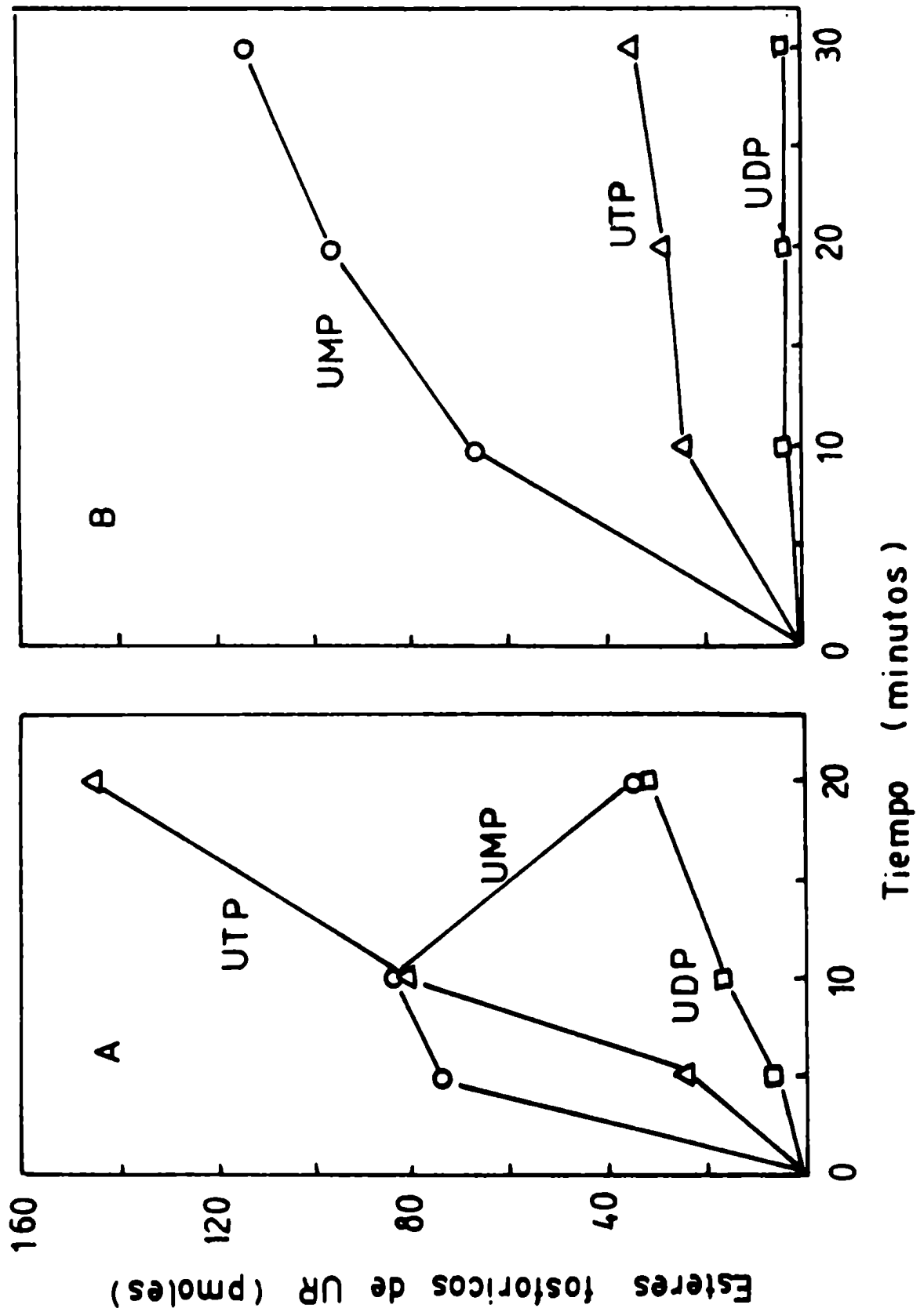
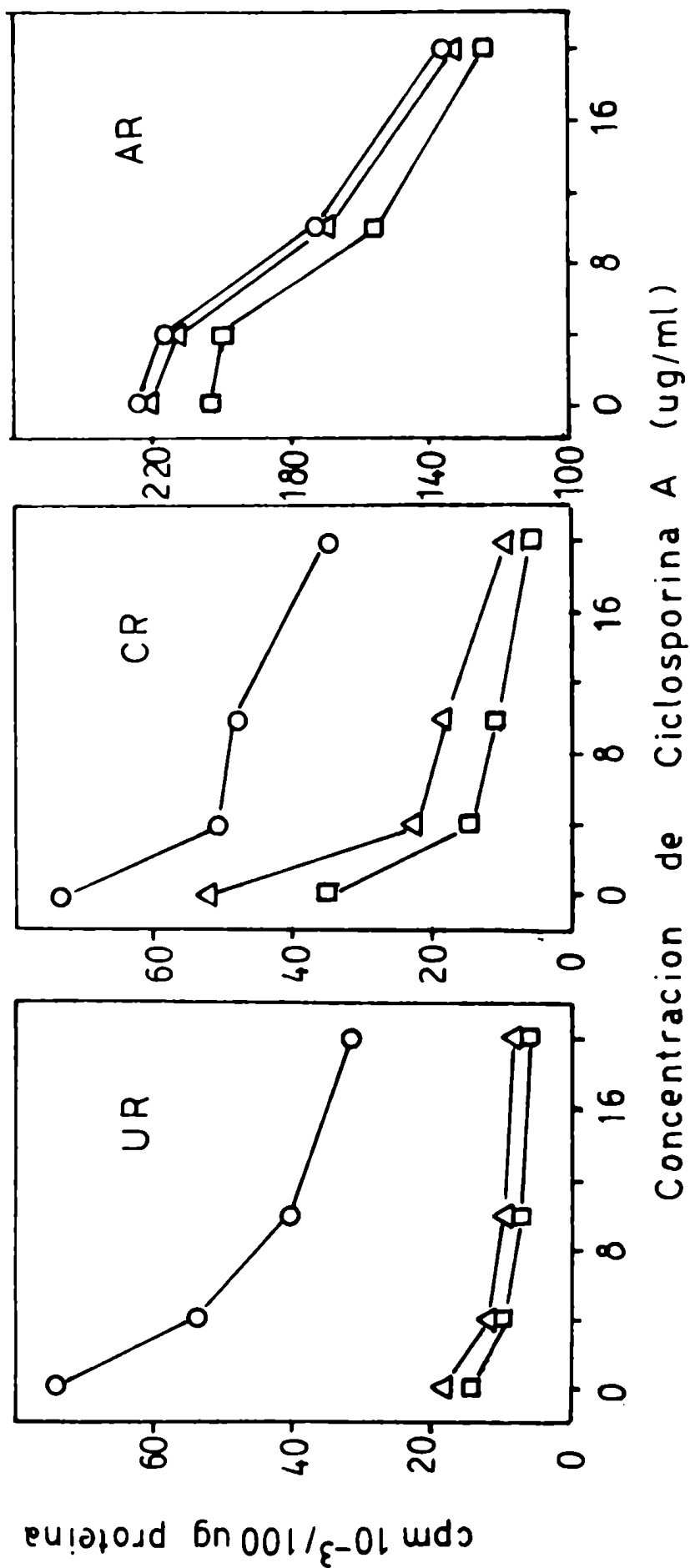


Figura 19

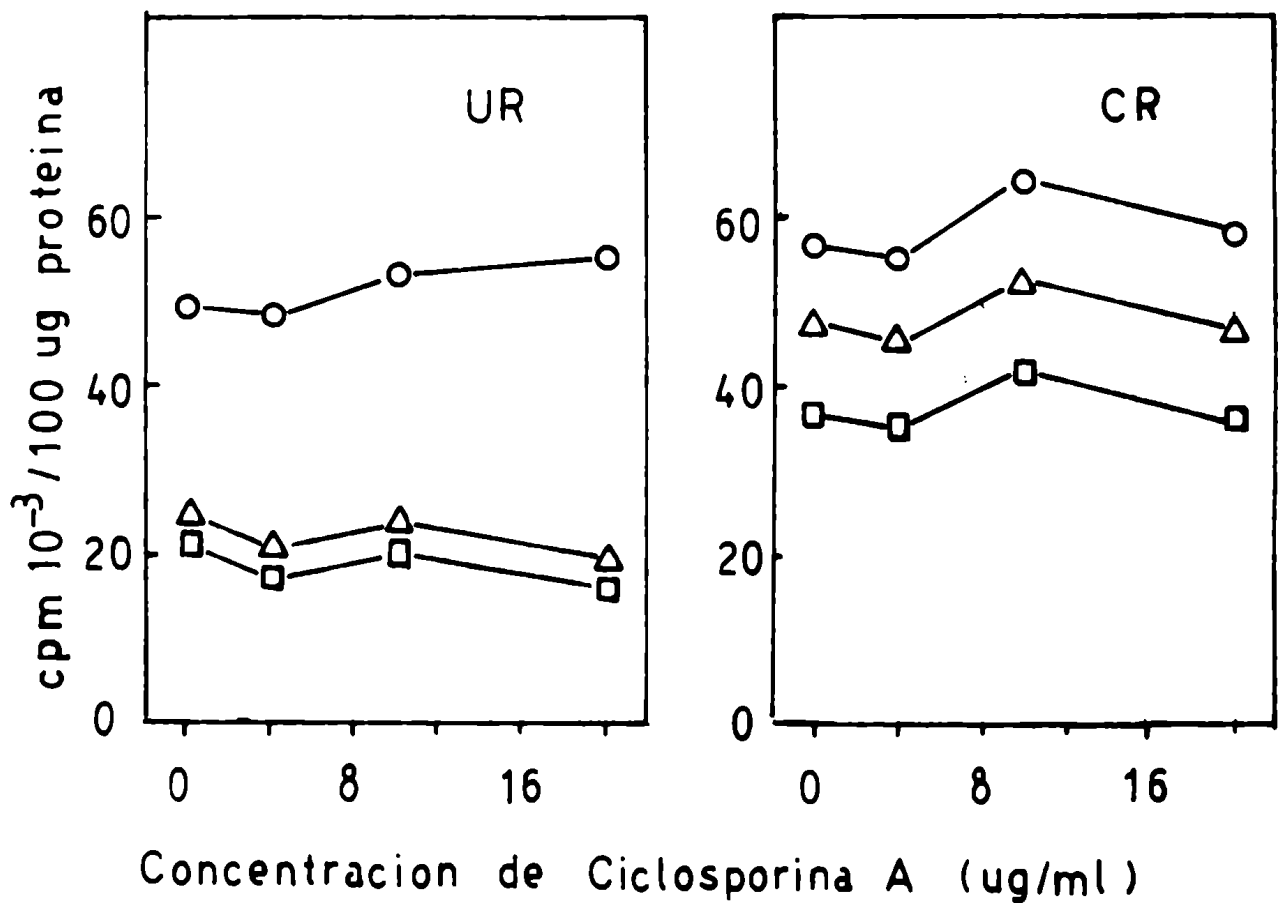
Efecto de Ciclosporina A sobre la fosforilación de nucleótidos por extractos de linfocitos



El procedimiento experimental fue el que se describe en materiales y métodos. La fuente de enzima fueron linfocitos cultivados durante 47 horas en presencia de PHA, que estuvieron durante las últimas 6 horas de cultivo en presencia de distintas cantidades de Ciclosporina A.  
( o ) UTP, ( □ ) UDP, ( Δ ) UTP.

Figura 20

Efecto de Ciclosporina A sobre la fosforilación de nucleósidos por extractos de células K-562



El procedimiento experimental fue el descrito en materiales y métodos. La fuente de enzima fue un extracto de células K-562, cultivadas durante las últimas 5 horas, en presencia de cantidades variables de Ciclosporina A. (  $\circ$  ) UMP, (  $\square$  ) UDP, (  $\Delta$  ) UTP.

### Efecto de Ciclosporina A sobre la incorporación de leucina

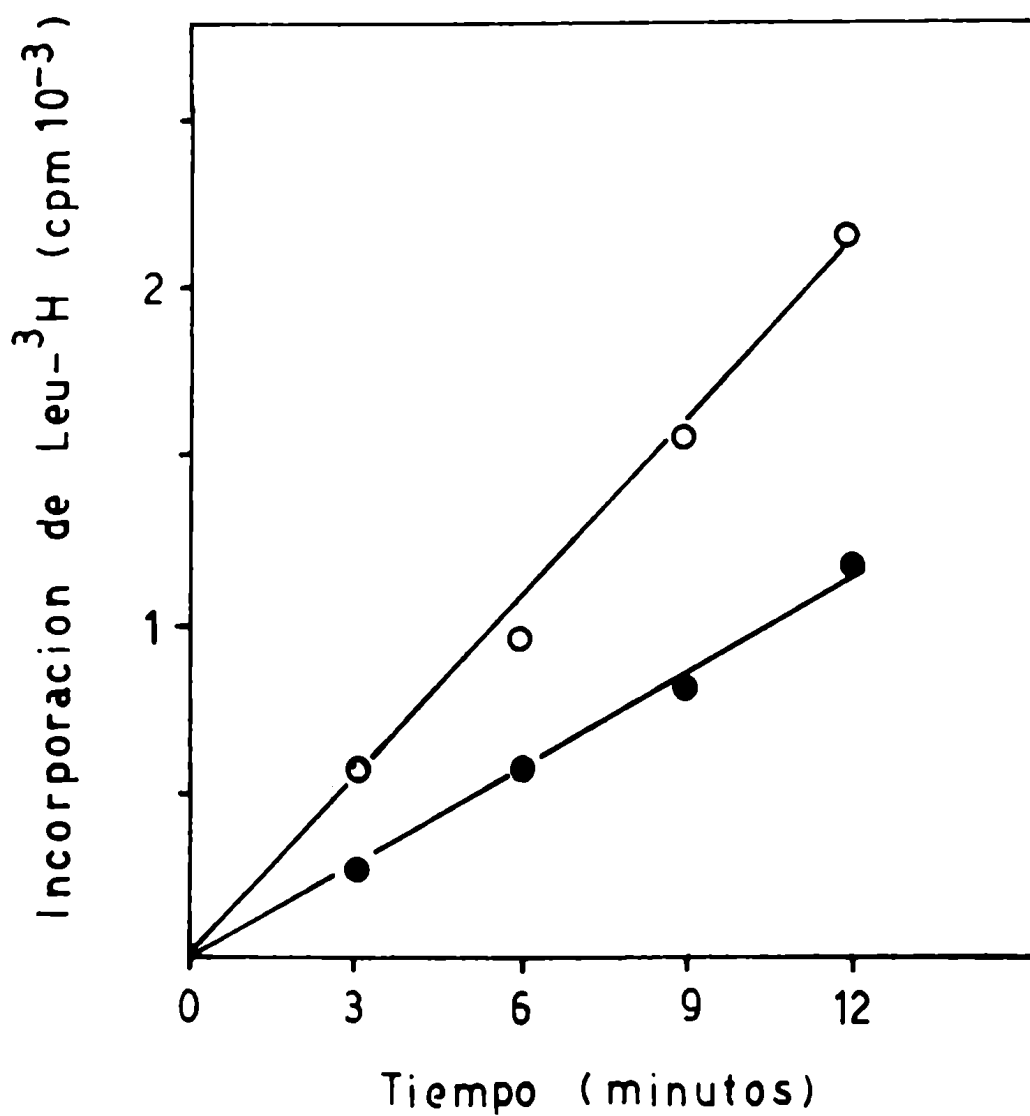
La captación de leucina también se encuentra inhibida luego de cultivar los linfocitos en presencia de Ciclosporina A (Fig.21 ), no pudo detectarse pool soluble de leucina ni en presencia ni en ausencia de la droga.

### Latencia en el efecto de Ciclosporina A sobre la captación de leucina

Debido a la diferencia encontrada entre el tiempo necesario para que la incorporación de TdR sea inhibida y el necesario para que la de UR sea inhibida, se decidió medir cuántas horas eran necesarias para detectar inhibición de la captación de leucina. Se encontró que ésta comienza aún más tarde que las dos anteriores, entre 35 y 45 horas después del agregado de Ciclosporina A (Fig.22 ). Este efecto parece ser secundario a otros, y no parece tener ninguna importancia en la explicación del mecanismo de acción de la droga.

Figura 21

Efecto de Ciclosporina A sobre la incorporación de leucina

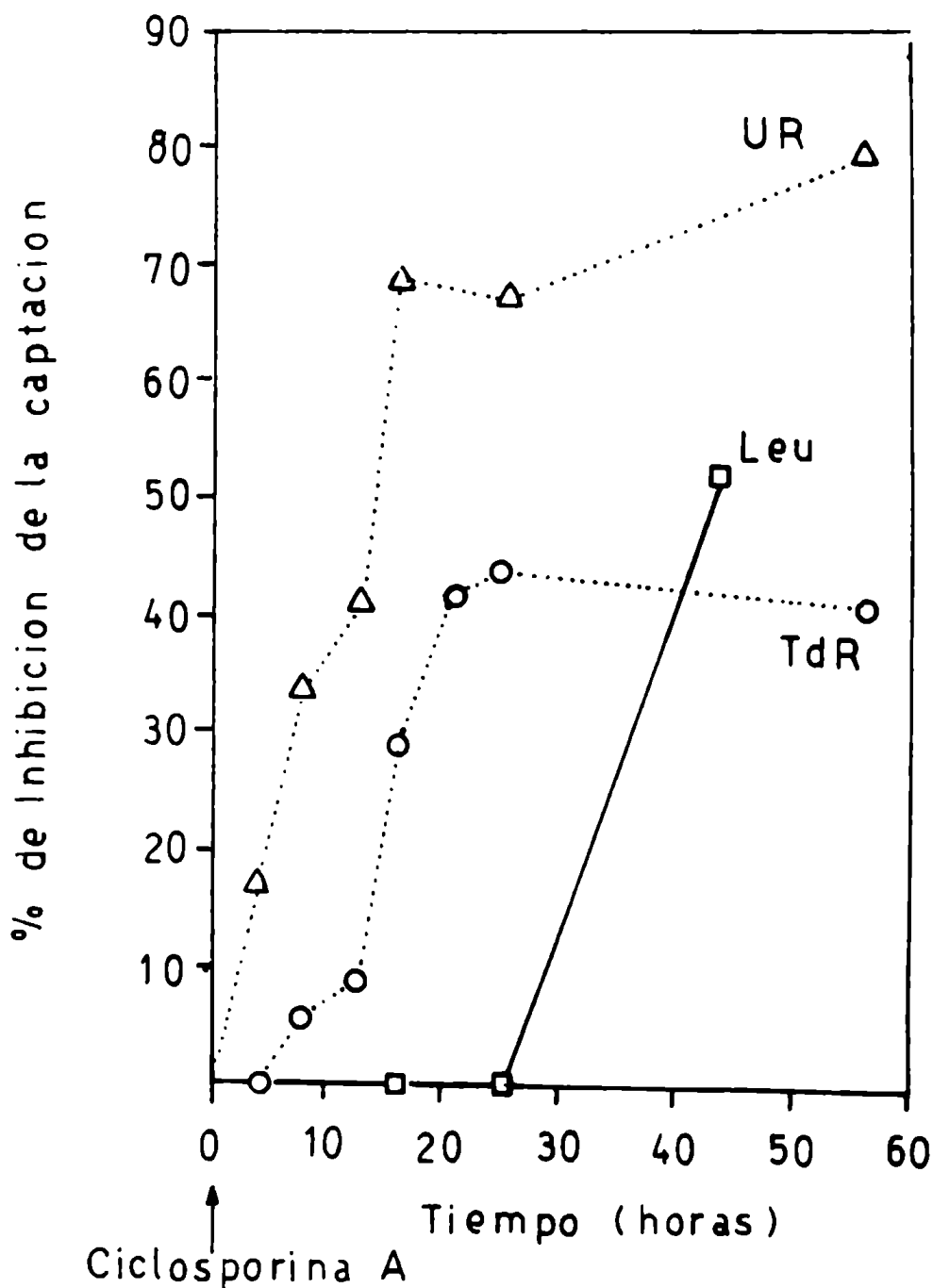


Se cultivaron linfocitos en presencia de PHA durante 48 horas y se midió la incorporación de Leu-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA 5% en ausencia (O) y presencia (●) de la droga, a distintos tiempos luego de agregada la marca.



Figura 22

Latencia del efecto de Ciclosporina A sobre la captación de leucina



Se cultivaron linfocitos durante 48 horas en presencia de PHA, luego de lo cual se agregó Ciclosporina A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) al cultivo. A los tiempos indicados en la abscisa, se midió la velocidad de captación de Leu, como se indica en materiales y métodos

### Efectos posteriores a la inhibición de la captación de precursores

Para detectar posibles alteraciones de la transcripción y síntesis de DNA, se midió el efecto sobre la captación de precursores a distintos tiempos después del agregado de Ciclosporina A, y se graficó la incorporación a material insoluble en TCA 5% (ácido nucleico sintetizado) en función de material soluble (pool de nucleótidos solubles). Como se vio anteriormente, este tipo de gráficos permite determinar si la inhibición de la incorporación a material insoluble en TCA 5% (en presencia de Ciclosporina A) es una simple consecuencia de la disminución de la captación de precursores por parte de la célula, o por el contrario, también se encuentra afectado el proceso de síntesis de macromoléculas.

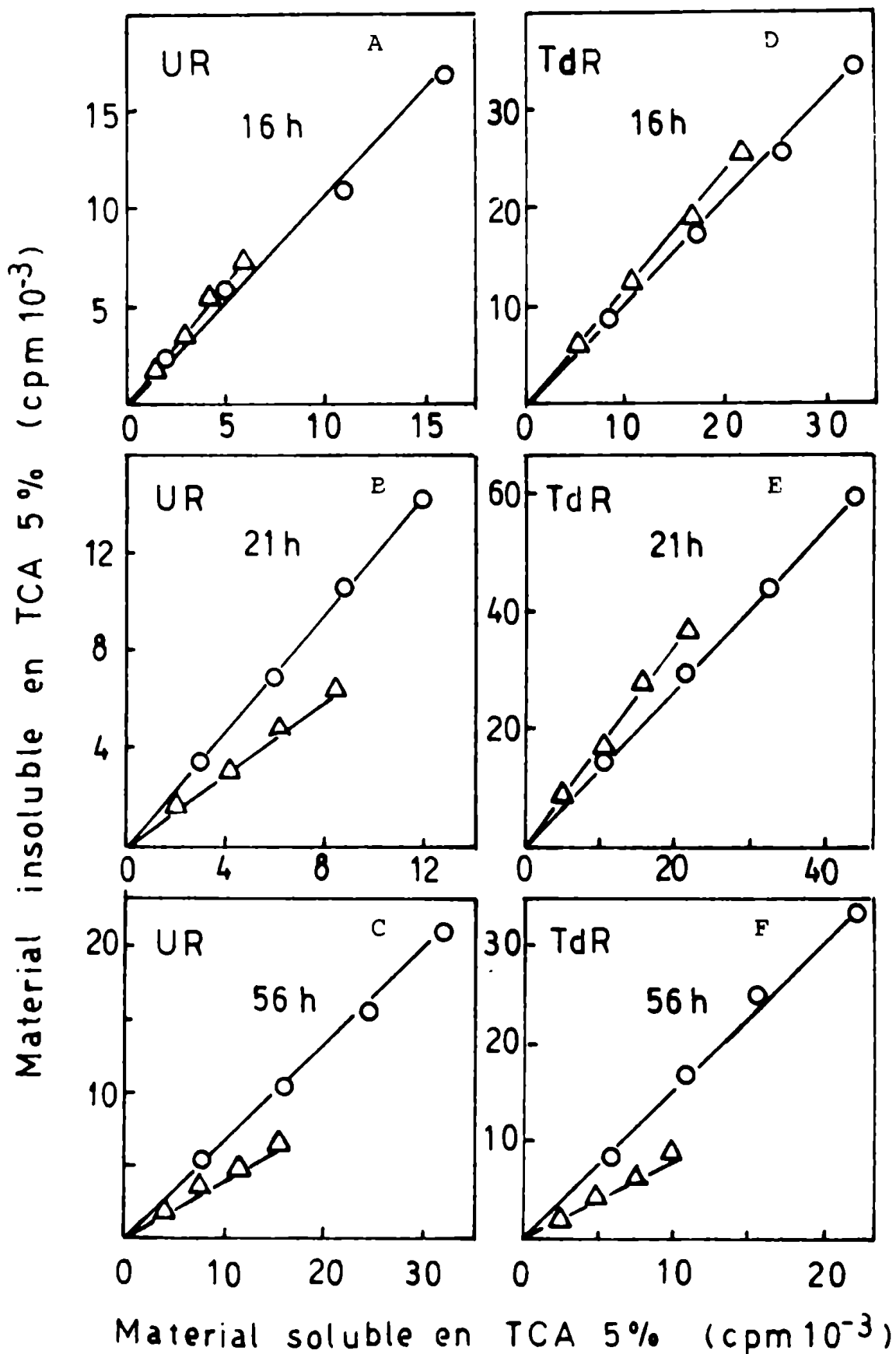
En la figura 23 A puede observarse que hasta las 16 horas no parece afectarse la síntesis de RNA, pero luego de 21 horas en presencia de la droga, existe una evidente inhibición de este proceso (Fig. 23 B, 23C). En cuanto a la síntesis de DNA, a las 16 y 21 horas no se observa inhibición de la misma (Fig. 23 D, 23 E), pero al cabo de 56 horas en presencia de la droga se encontró una apreciable inhibición (Fig. 23 F).

Es importante recordar que a la 16 horas, tanto la captación de uridina como la de timidina ya están inhibidas, por lo que parecería que la droga afecta más tardíamente tanto la transcripción como la síntesis de DNA.

Figura 23 Se estimularon linfocitos con PHA durante 48 horas, después de lo cual se agregó a los cultivos 1 ug/ml de Ciclosporina A, que fue dejada distintos tiempos. Al final de los mismos se midieron las velocidades de incorporación. Los datos representan la incorporación de  $UR-^3H$  y  $TdR-^3H$  a material soluble e insoluble en TCA 5%, a tiempos crecientes después del agregado del nucleósido radiactivo. Cada gráfico corresponde a un tiempo de acción de Ciclosporina A distinto.

Figura 23

Efecto de Ciclosporina A sobre las síntesis de DNA y RNA



Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de RNA temprano

El RNA temprano no es afectado por Ciclosporina A, ya que si se mide la inhibición de la velocidad de síntesis de RNA en linfocitos estimulados durante 3,5 horas con PHA y luego mantenidos 4 horas más en presencia de la droga, se encuentra que es la misma que la inhibición de la captación total (Fig.24 y Tabla5 ).

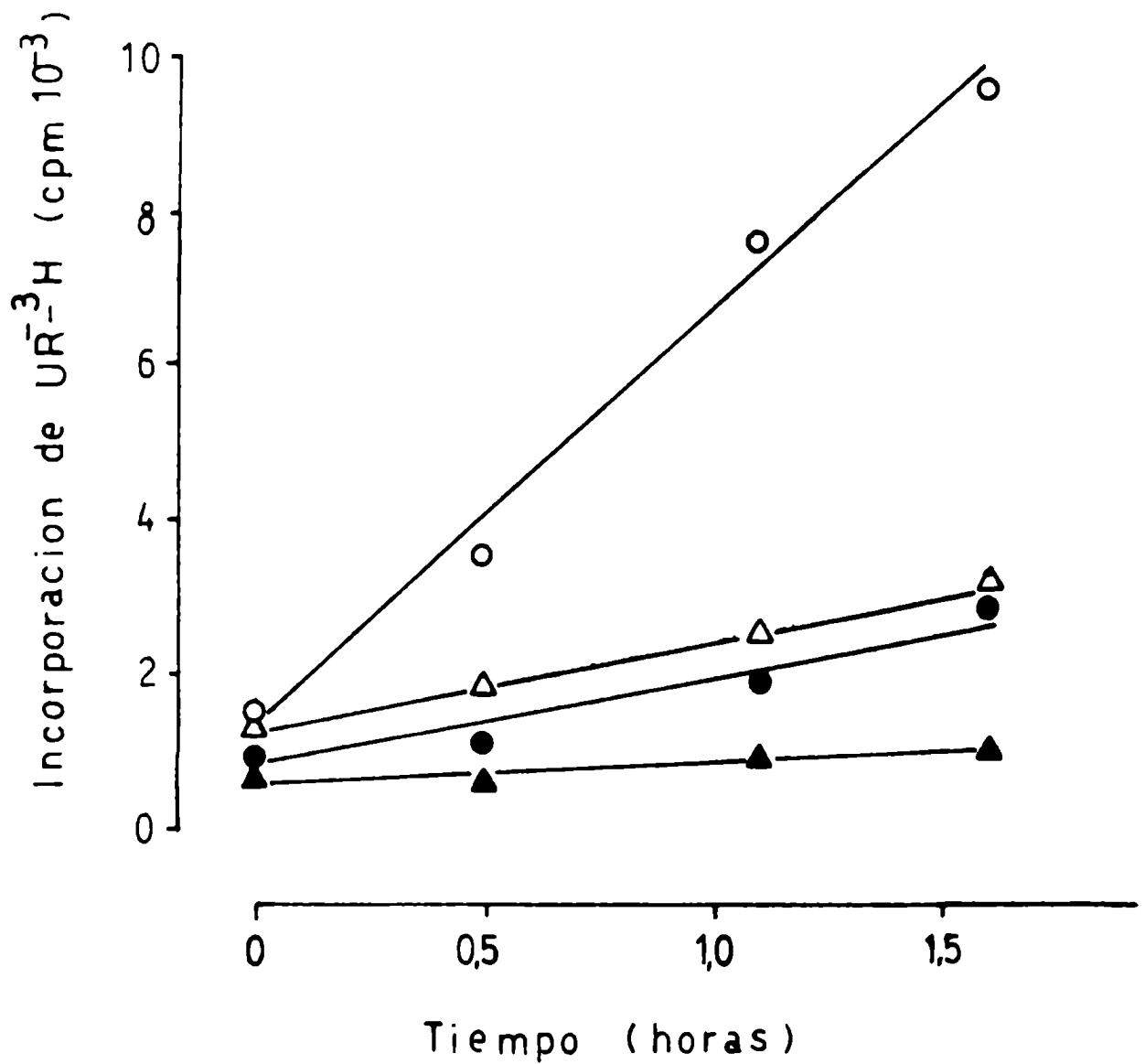
Tabla 5

	Velocidad (pmoles/h)		% Inhibición
	Control	Ciclosporina A	
Incorporación total	37,3	8,1	78
Incorporación a RNA temprano	8,1	2,0	75

Figura 24 y Tabla 5 . Se cultivaron linfocitos humanos durante 3,5 horas en presencia de PHA, se dividió el cultivo en dos partes, a una de ellas se agregó Ciclosporina A 1 ug/ml y se dejó durante 4 horas más. Se agregó a ambos cultivos UR-<sup>3</sup>H (1 uci/ml, 4 uM) y se tomaron alícuotas a distintos tiempos, se filtraron por discos de fibra de vidrio y se lavaron con PBSA y TCA 5%. Se determinó la radiactividad asociada a los discos.

Figura 24

Efecto de Ciclosporina A sobre la síntesis de RNA temprano



Cultivo control: (○) incorporación total  
 (●) incorporación a material insoluble en TCA 5%  
 Cultivo + Ciclosporina A: (△) incorporación total  
 (▲) incorporación a material insoluble en TCA 5%

Requerimiento de la síntesis de macromoléculas

Para determinar si el efecto producido por la Ciclosporina A requiere de la síntesis de macromoléculas, se midió la inhibición de la incorporación de UR-<sup>3</sup>H por la droga en linfocitos estimulados por PHA pretratados con cicloheximida, rifampicina y actinomicina D.

Los resultados (Tabla 6), indican que no se requiere síntesis de macromoléculas para que la Ciclosporina A produzca efecto inhibitorio

Tabla 6

Efecto de Ciclosporina A en presencia de inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas

Inhibidor	Control		+ Ciclosporina A	
	cpm	% Inhibición	cpm	% Inhibición
-	19.089	0	9.852	51
Actinomicina D	13.727	0	6.063	44
Rifampicina	13.420	0	8.041	59
Cicloheximida	12.305	0	5.847	47

Se cultivaron linfocitos durante 60 horas en presencia de PHA, luego de lo cual se dividió el cultivo en varias fracciones. Algunas se siguieron cultivando sin adiciones, a las otras se agregó Cicloheximida (50 ug/ml) ó Actinomicina D (0,25 ug/ml) ó Rifampicina (1 ug/ml). Se cultivaron los linfocitos en presencia de los inhibidores durante 30 minutos más y se agregó la Ciclosporina A (2ug/ml). Luego de 7 horas se hizo un pulso de 2 horas con UR-<sup>3</sup>H.

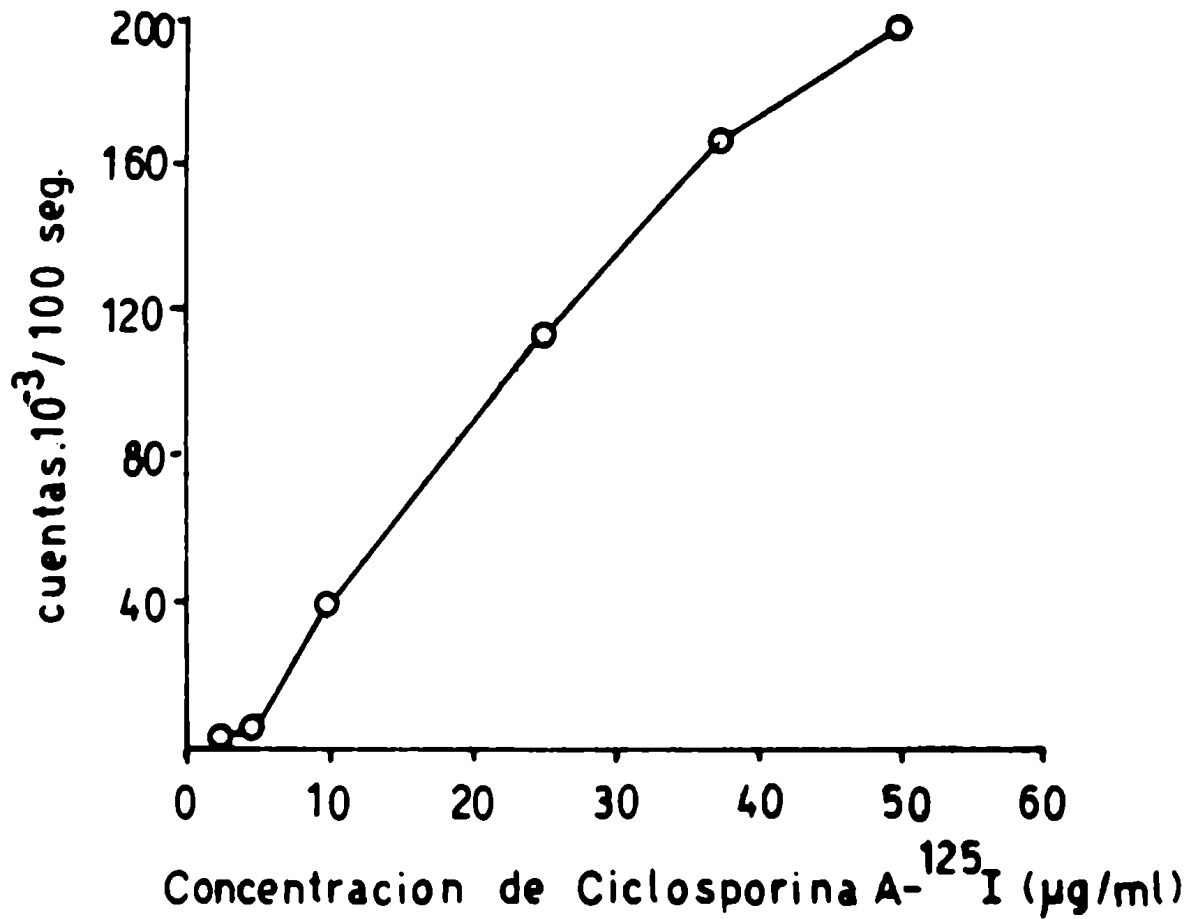
### Asociación de Ciclosporina A-<sup>125</sup>I con células

Se estudió la asociación de Ciclosporina A con linfocitos usando la droga marcada con <sup>125</sup>I. La curva de concentración (Fig.22') muestra que no se alcanza saturación, ni aún con cantidades mucho mayores que las necesarias para obtener efecto inhibitorio.

La asociación con las células es muy rápida, encontrándose toda la marca agregada asociada a las células en menos de 2 minutos a 37°.

Los linfocitos en reposo se marcan de la misma manera que los estimulados. La radiactividad asociada a las células disminuye con sucesivos lavados con medio libre de Ciclosporina A, pero la eliminación total de la marca se consigue cultivando por 6 ó 7 horas en medio fresco.

Figura 22'

Asociación de Ciclosporina -<sup>125</sup>I con células

Se agregaron distintas cantidades de Ciclosporina A ( 1 µg/ml, 2 uci/ml), a cultivos de linfocitos (  $5 \cdot 10^5$  cél./ml), se incubó por 2 horas a 37°; se filtró a través de papel de fibra de vidrio Whatman GF/C se lavó con medio de cultivo el filtro, se dejó secar y se midió la radiactividad asociada al filtro.



## Toxicidad de la Ciclosporina A

Independientemente de la etapa de estimulación mitogénica en que se encuentra el linfocito, al agregar la droga al cultivo se observa una pérdida selectiva de blastos. Se trató de establecer que el efecto de la droga no es detener la proliferación, sino que ejerce un efecto tóxico para linfocitos en proliferación.

Se midió la toxicidad usando varios criterios: aparición de células muertas medidas por inclusión de azul tripan y marcación con  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $\text{TdR-}^3\text{H}$  y  $\text{UR-}^3\text{H}$  y liberación de la marca. También se hicieron observaciones de las células al microscopio electrónico, luego de ser tratadas con Ciclosporina A. Se usaron linfocitos estimulados, células CLA 4 y K 562.

### Muerte celular

#### Linfocitos

Se cultivaron linfocitos estimulados en presencia de Ciclosporina A y se contaron las células vivas y muertas por un período de 3 días. Los resultados (Fig 26) indican una disminución sustancial de células vivas y muertas en los cultivos tratados con la droga, con respecto a los controles.

Las células en reposo mueren a menor velocidad que las estimuladas, en ausencia de la droga. Con esto se descartaría que el efecto de la droga es detener el crecimiento y que el número de células muertas es mayor debido a que las células en reposo mueren más rápido que las células en proliferación.

El número de células vivas en presencia de la droga no varía apreciablemente, pero disminuye notablemente en presencia de la misma.

Como puede observarse en la figura 27, el aumento de células muertas se debe mayormente a la desaparición de blastos. Por otro lado el número de células muertas en presencia de Ciclosporina A no aumenta hasta después de 10 horas de agregada la droga, lo que puede reflejar el tiempo mínimo que tardan las células en morir. El número de células muertas no es una medida precisa de la magnitud del efecto debido a la

Figura 26

Muerte de linfocitos en proliferación y en reposo, en presencia y ausencia de Ciclosporina A

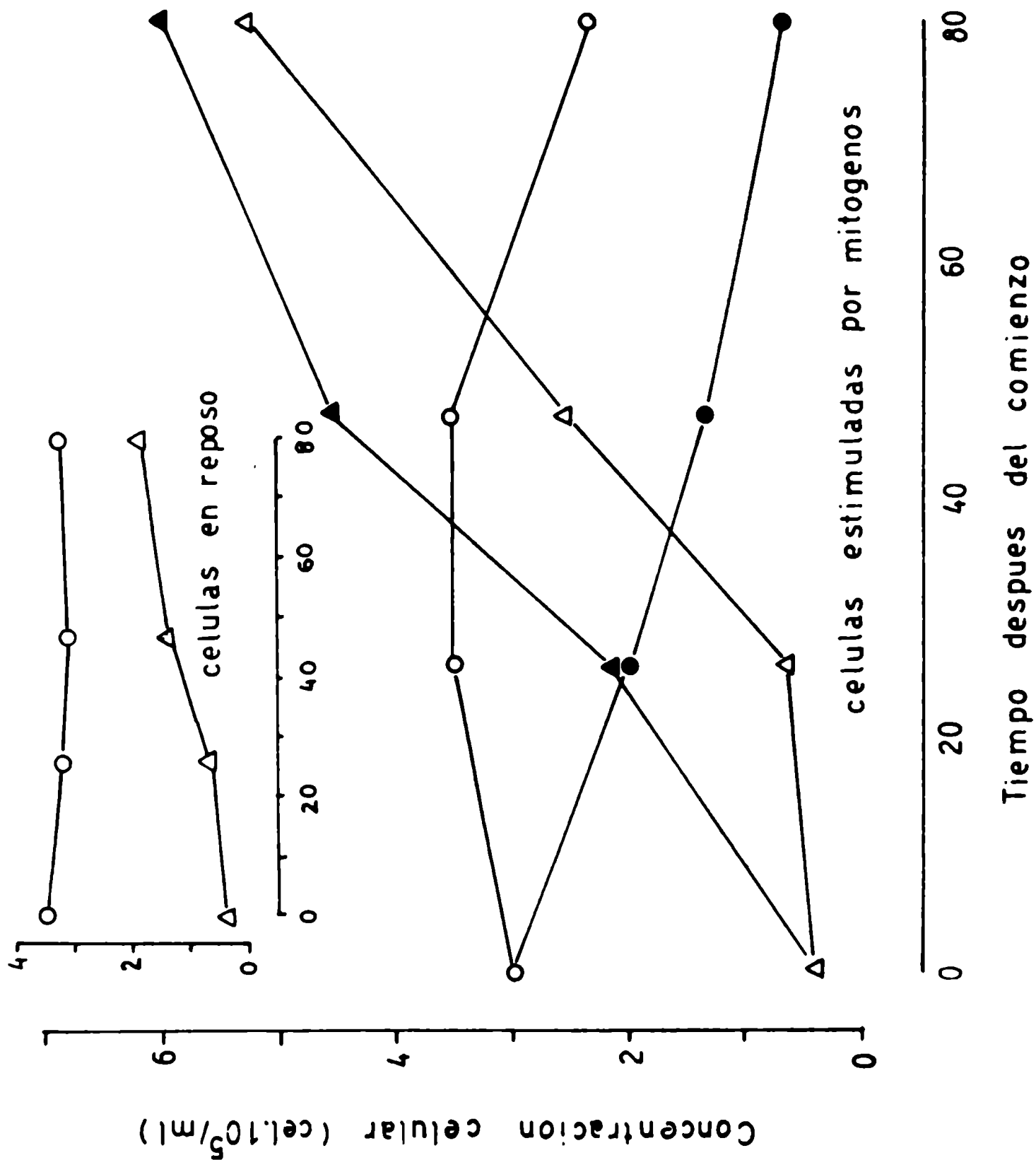
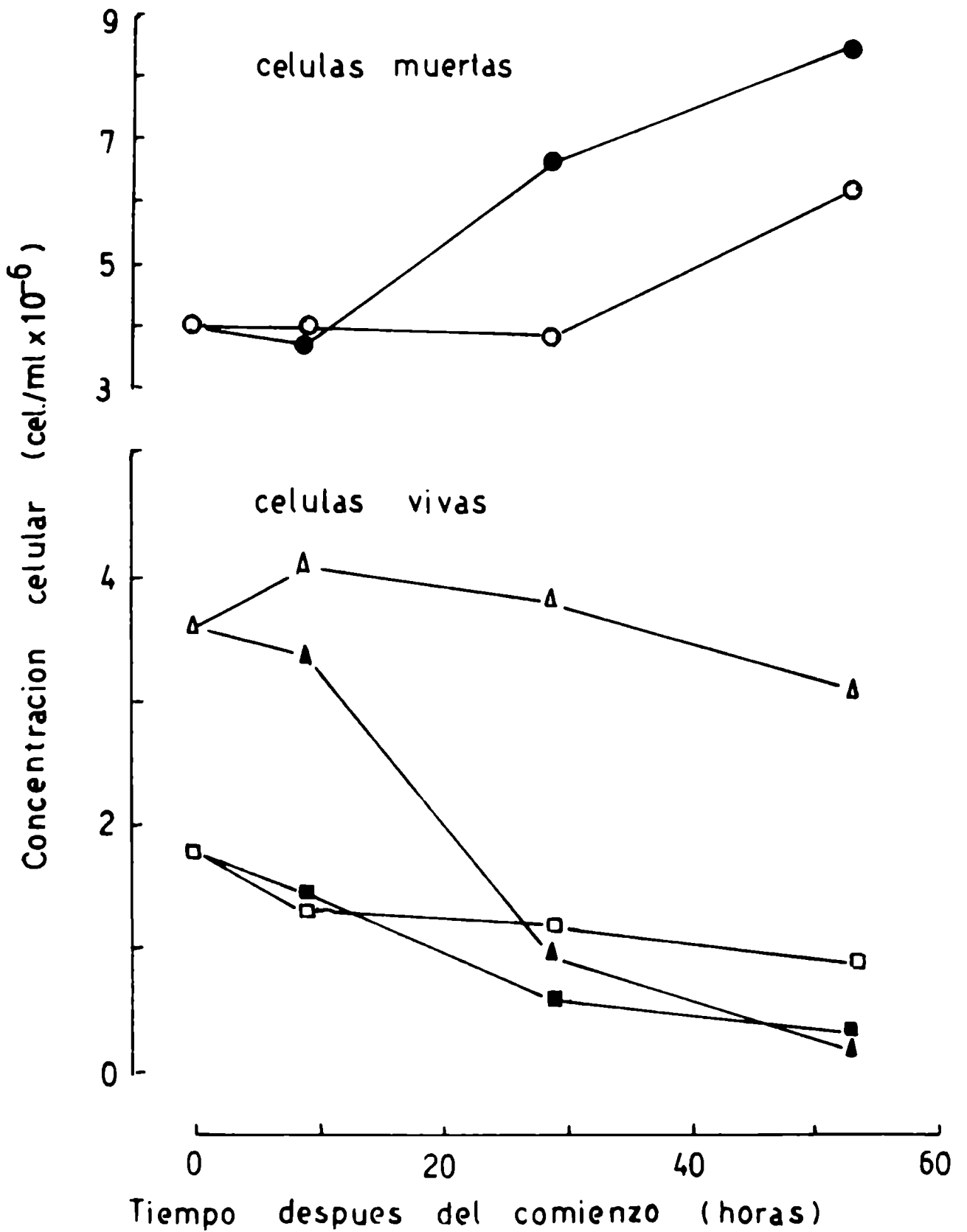


Figura 27

Efecto de Ciclosporina A sobre la proporción de blastos y linfocitos pequeños



desintegración celular que se produce.

#### Células CIA 4

Esta línea linfoblastoide no prolifera en presencia de Ciclosporina A, o la velocidad de muerte es considerablemente mayor que la de proliferación (Fig. 28).

#### Células K 562

A la concentración de Ciclosporina A utilizada, a las 27 horas no se observó ningún efecto. A las 46 horas aparecen células muertas pero en mucho menor proporción que en los casos anteriores (Fig. 29).

Figura 26. Se cultivaron linfocitos estimulados por PHA durante 63 horas, se lavaron y resuspendieron en medio fresco con 10% de suero fetal. La suspensión se dividió en alícuotas que se incubaron en presencia o ausencia de Ciclosporina A (12,5 ug/ml) por tiempos variables, al cabo de los cuales se midió el número de células vivas y muertas como se describe en materiales y métodos. La adición de Ciclosporina A indica el comienzo del experimento.

Al mismo tiempo se contaron las células vivas y muertas en un cultivo de linfocitos sin estimular (células en reposo)

Cultivo control: ( O ) vivas, ( Δ ) muertas.

Cultivo + Ciclosporina A: ( ● ) vivas, ( ▲ ) muertas.

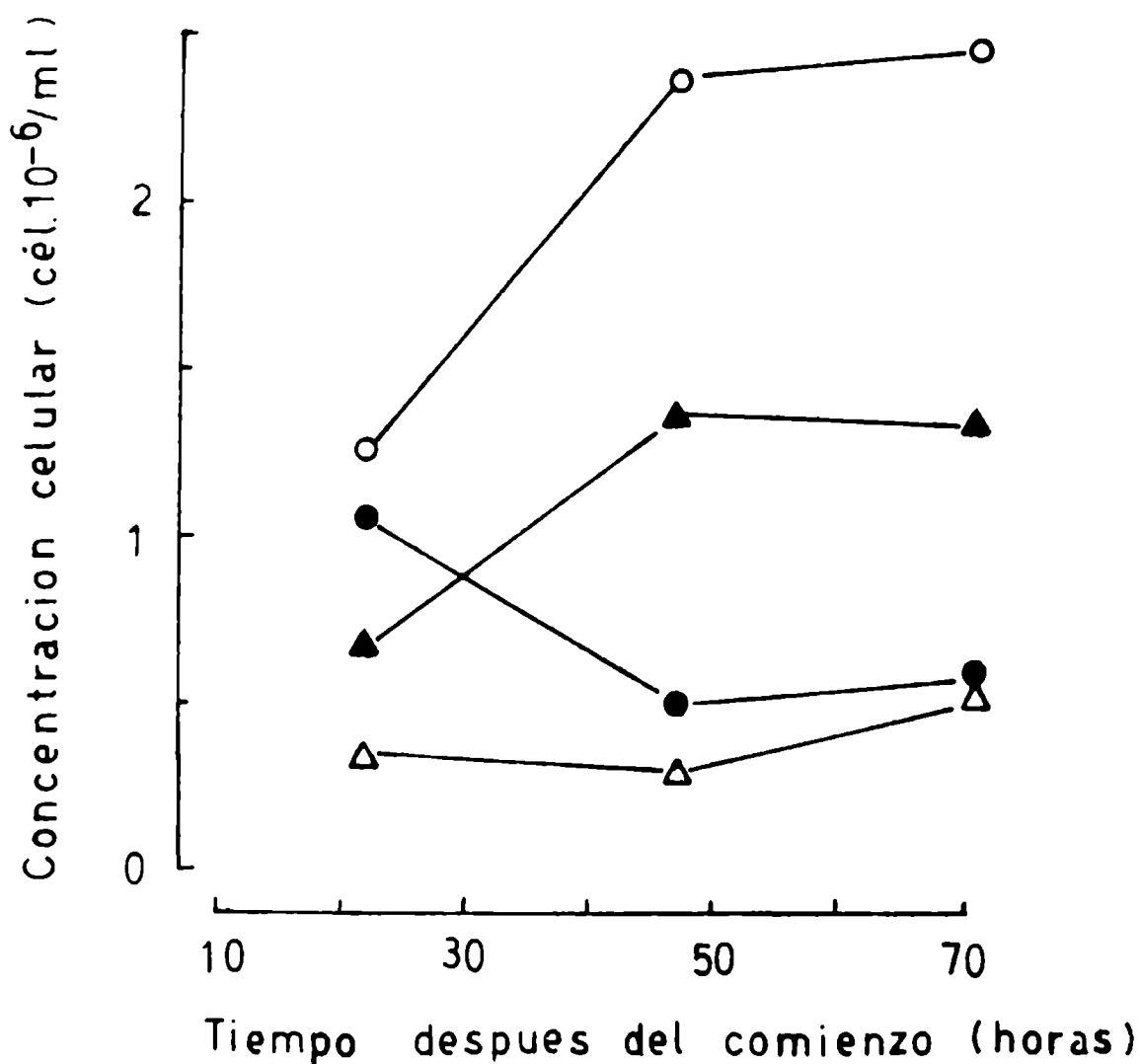
Figura 27. Se cultivaron linfocitos en presencia de PHA durante 69 horas, se lavaron y resuspendieron en medio fresco con 10% de suero fetal. Se dividió la suspensión celular en alícuotas y se incubaron en presencia o ausencia de 10 ug/ml de Ciclosporina A por tiempos variables, al cabo de los cuales se contó el número de linfocitos pequeños y grandes (blastos), y su viabilidad.

Símbolos vacíos: células no tratadas, símbolos llenos: células tratadas con Ciclosporina A.

( Δ ) blastos, ( □ ) linfocitos pequeños, ( O ) células muertas.

Figura 28

Muerte de células linfoblastoides en presencia y ausencia de Ciclosporina A



Se cultivaron células CLA-4 en presencia o ausencia de Ciclosporina A (11 ug/ml), y se determinó la viabilidad a distintos tiempos después de la adición de la droga.

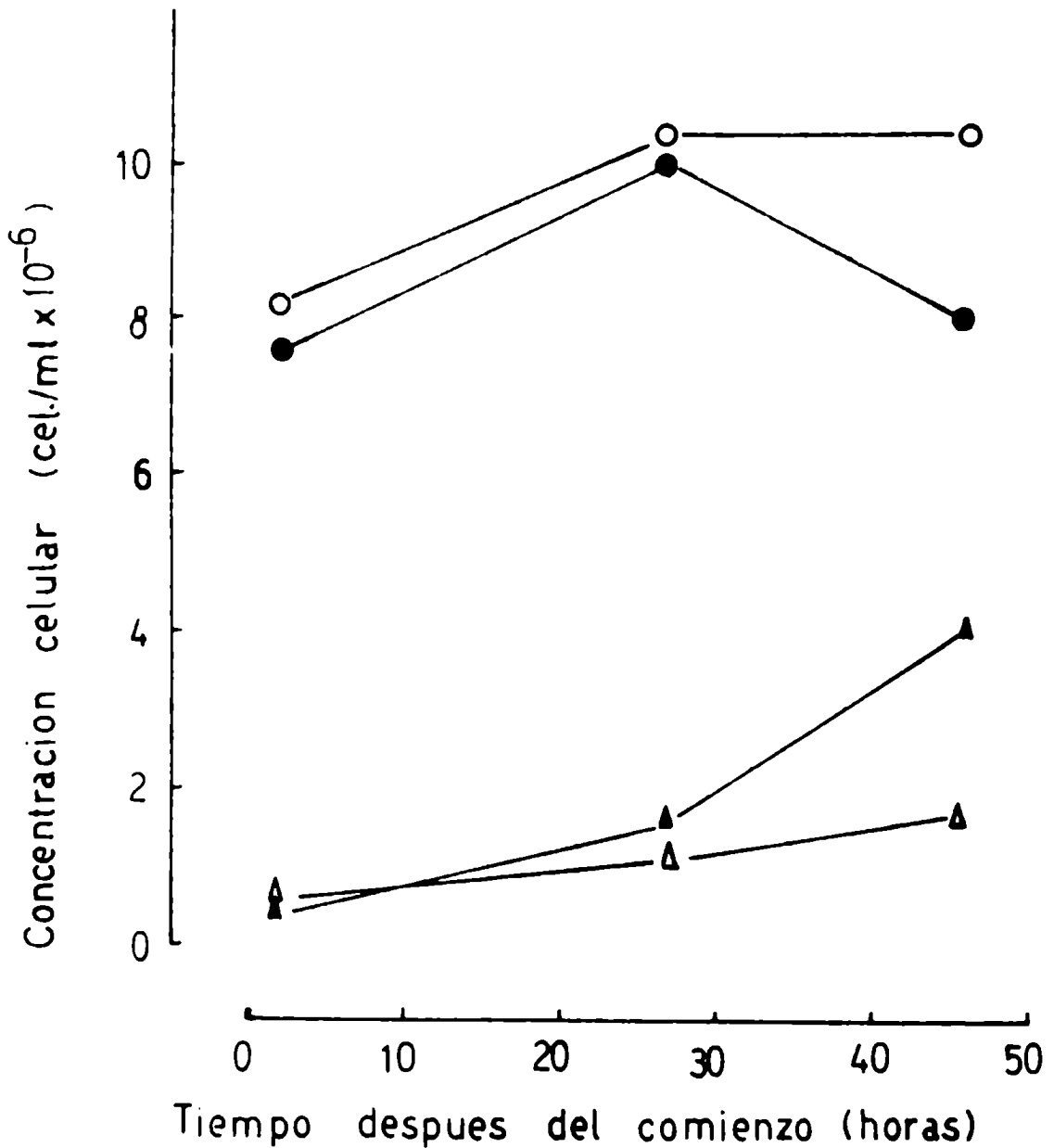
( ○ ) células vivas, ( △ ) células muertas

Símbolos vacíos: células no tratadas, símbolos llenos: células tratadas con Ciclosporina A.

La adición de la droga indica el comienzo del experimento.

Figura 29

Muerte de células mieloides-eritroides en presencia o ausencia de Ciclosporina A



Se incubaron células K-562 en ausencia y presencia de Ciclosporina A (11  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y se determinó la viabilidad a distintos tiempos después de la adición de la droga, lo que marca el comienzo del experimento.

Símbolos vacíos: células no tratadas, símbolos llenos: células tratadas con Ciclosporina A.

( O ) células vivas, ( Δ ) células muertas.

## Marcación con TdR-<sup>3</sup>H

### Linfocitos

Se marcaron linfocitos en proliferación y se estudió la distribución de la marca en ausencia y presencia de Ciclosporina A. Se había observado un pequeño aumento de la marca en el sobrenadante después de centrifugar los cultivos, a pesar de haber una gran número de células muertas en los mismos.

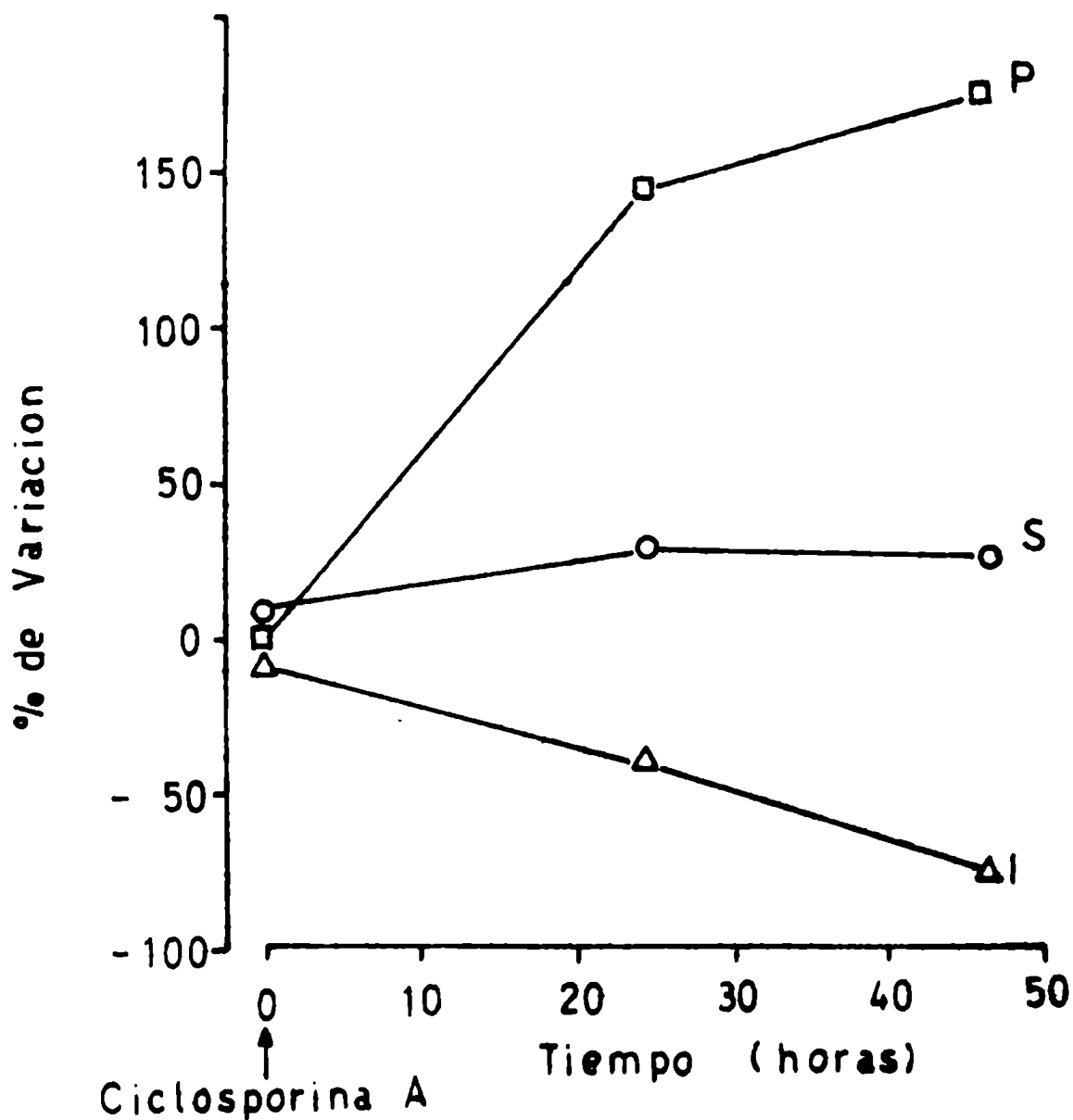
Se hizo entonces una centrifugación en gradiente de Ficoll-paque para separar los linfocitos vivos de los muertos. Estos últimos sedimentan mientras que los vivos quedan en la interfase. En la figura puede verse que hay una pequeña cantidad de marca en el sobrenadante y una gran cantidad asociada a las células muertas. Al mismo tiempo se observa disminución de la marca asociada a células vivas (Fig. 30).

### Células CIA 4

En este caso la marca es eliminada al medio, pareciera que estas células fueran más fácilmente desintegrables que los linfocitos. La presencia de Ciclosporina A hace que la eliminación de la marca aumente en 47% (Fig. 31).

Figura 30

Marca de TdR-<sup>3</sup>H asociada al medio de cultivo, linfocitos vivos y muertos



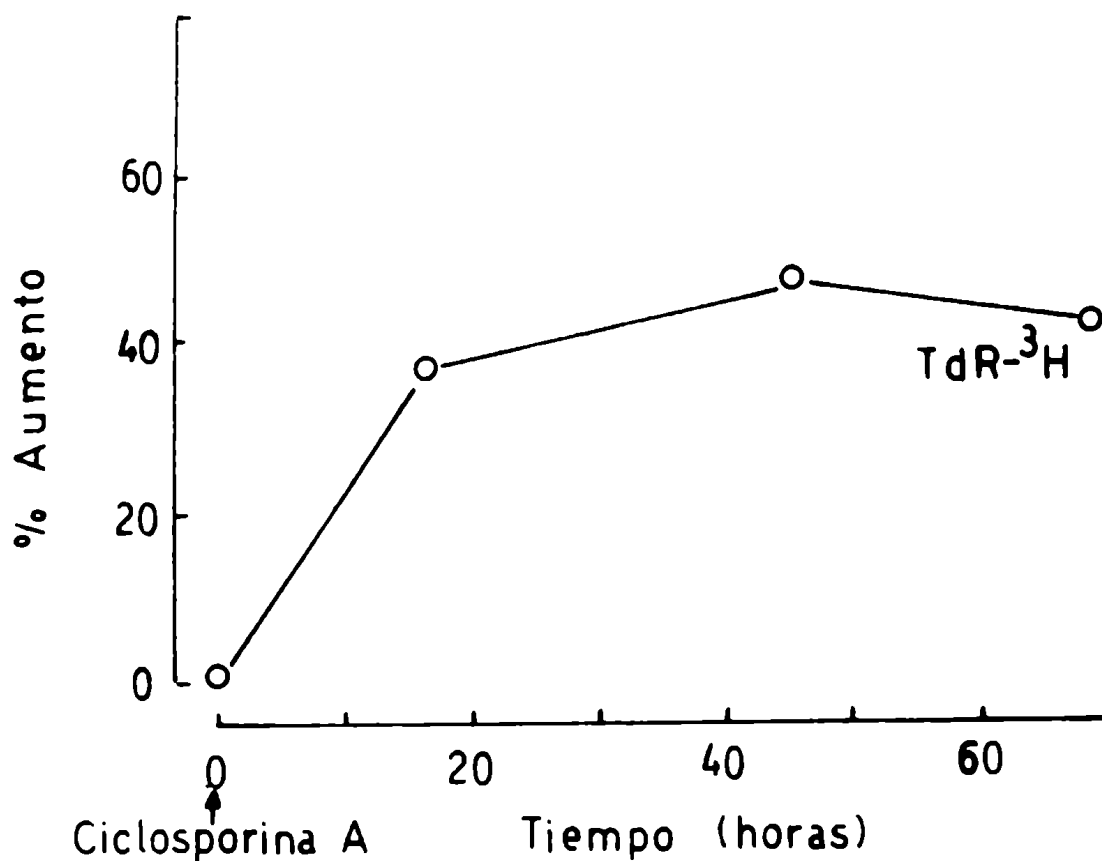
Se cultivaron linfocitos en presencia de PHA durante 48 horas, se marcaron con TdR-<sup>3</sup>H, lavaron y resuspendieron como se describe en materiales y métodos. Se agregó Ciclosporina A a algunas alícuotas y se incubaron 0, 24 y 46 horas, después de lo cual se centrifugaron las células a través de un gradiente de Ficoll-paque y se procesaron como se describe en materiales y métodos. Se calculó en cada caso el % de variación con respecto a cultivos controles sin tratar.

( O ) medio de cultivo (sobrenadante). ( □ ) células muertas ("pellet"). ( Δ ) células vivas (interfase).



Figura 31

Marca de TdR-<sup>3</sup>H eliminada al medio de cultivo por células CLA-4



La marcación y lavado de las células se hizo como se describe en materiales y métodos. Se midió la eliminación de la marca de TdR-<sup>3</sup>H al medio de cultivo a varios tiempos después de la adición de Ciclosporina A. Se calculó el % de aumento con respecto a cultivos controles que no recibieron la droga.

### Marcación con UR-<sup>3</sup>H

Las células marcadas con UR-<sup>3</sup>H, eliminan mucha más marca al medio de cultivo, en presencia de Ciclosporina A, que las marcadas con TdR-<sup>3</sup>H. Muy poca marca se encontró asociada con células muertas.

El aumento de la eliminación de la marca producido por la acción de la Ciclosporina A fué de 110% después de 2 días en cultivo para el caso de los linfocitos (Fig.32 ), 120% para células CLA 4 (Fig.33 ) y 70% para células K 562 (Fig.34 ).

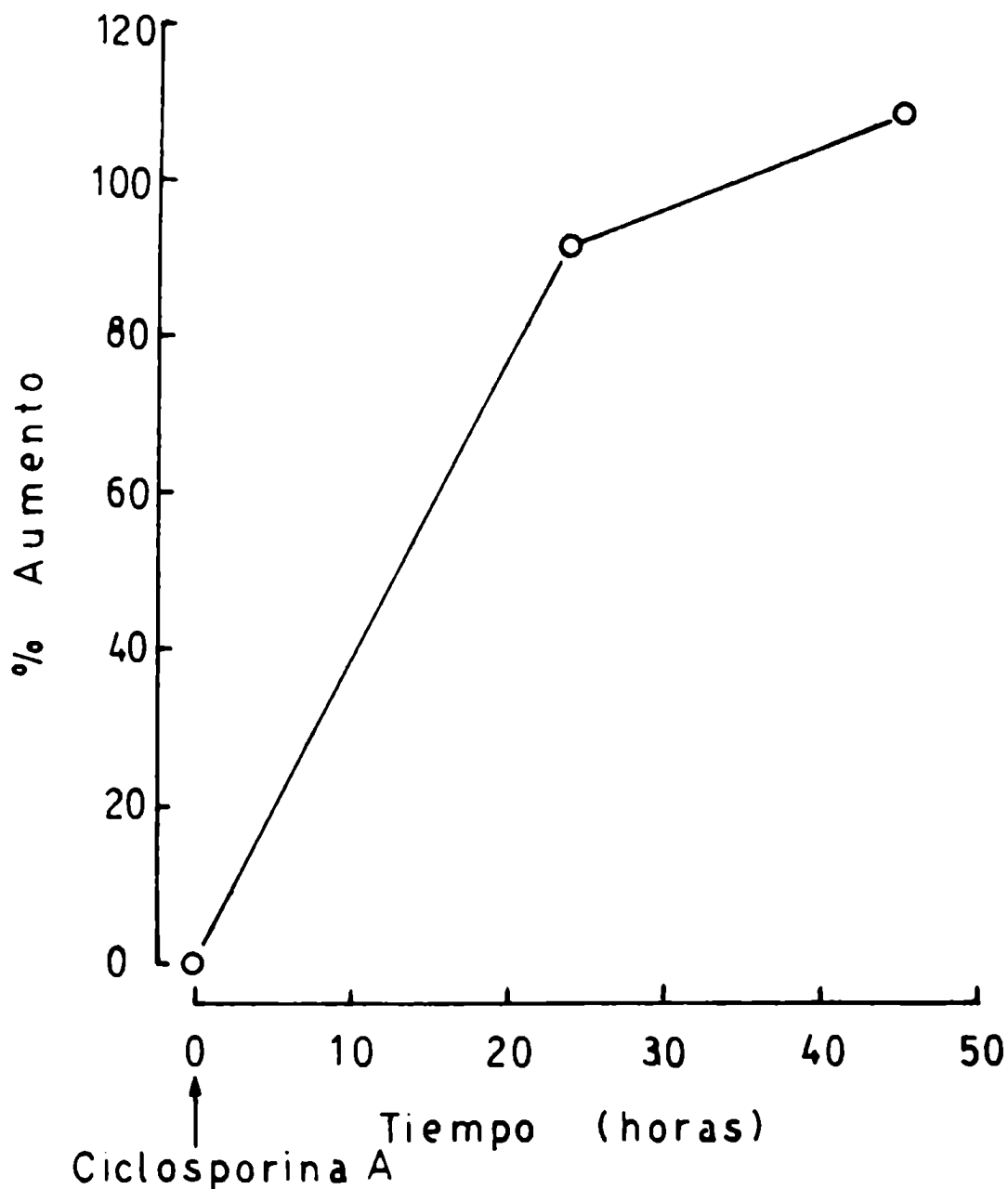
No se han identificado los compuestos liberados al medio a los cuales se asocia la marca. Si se tratara de compuestos de bajo peso molecular, su eliminación podría ser el resultado de un aumento de la permeabilidad de las células y no necesariamente el de lisis de las mismas. mas.

### Marcaciones con <sup>51</sup>Cr y <sup>111</sup>In

Estas marcaciones no resultaron satisfactorias. La marcación con <sup>51</sup>Cr, dió diferentes resultados, dependiendo de si la droga se encontra ba presente durante la marcación o no, esto indicaría interferencia de la Ciclosporina A con el procedimiento de marcación. Cuando se marca con <sup>111</sup>In, gran cantidad de la marca queda asociada a la superficie de las células, aparte de la que se incorpora. Esta tarde bastante tiempo en ser liberada, pudiendo enmascarar los resultados, si se usan células marcadas de esta forma para los ensayos de citotoxicidad.

Figura 32

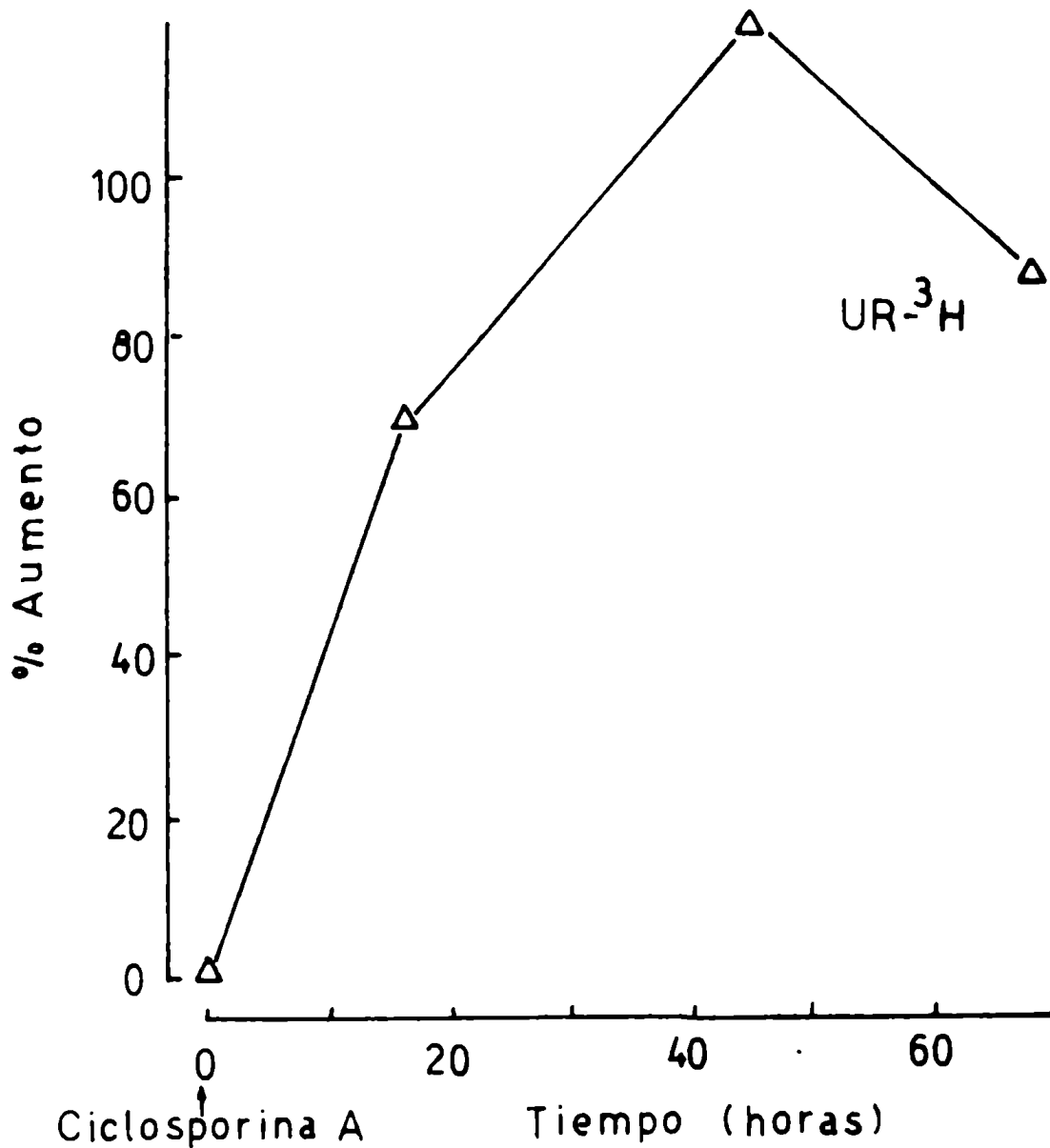
Marca de  $UR-^3H$  liberada al medio por linfocitos estimulados



Se cultivaron linfocitos en presencia de PHA durante 48 horas, se marcaron con  $UR-^3H$  y procesaron como se indica en materiales y métodos. Se agregó Ciclosporina A a algunas alícuotas de la suspensión de linfocitos marcados. A la 24 y 48 horas después de haber agregado la droga se midió la radiactividad de los sobrenadantes obtenidos después de centrifugar los cultivos. Se graficó el % de aumento con respecto a controles que no recibieron Ciclosporina A.

Figura 33

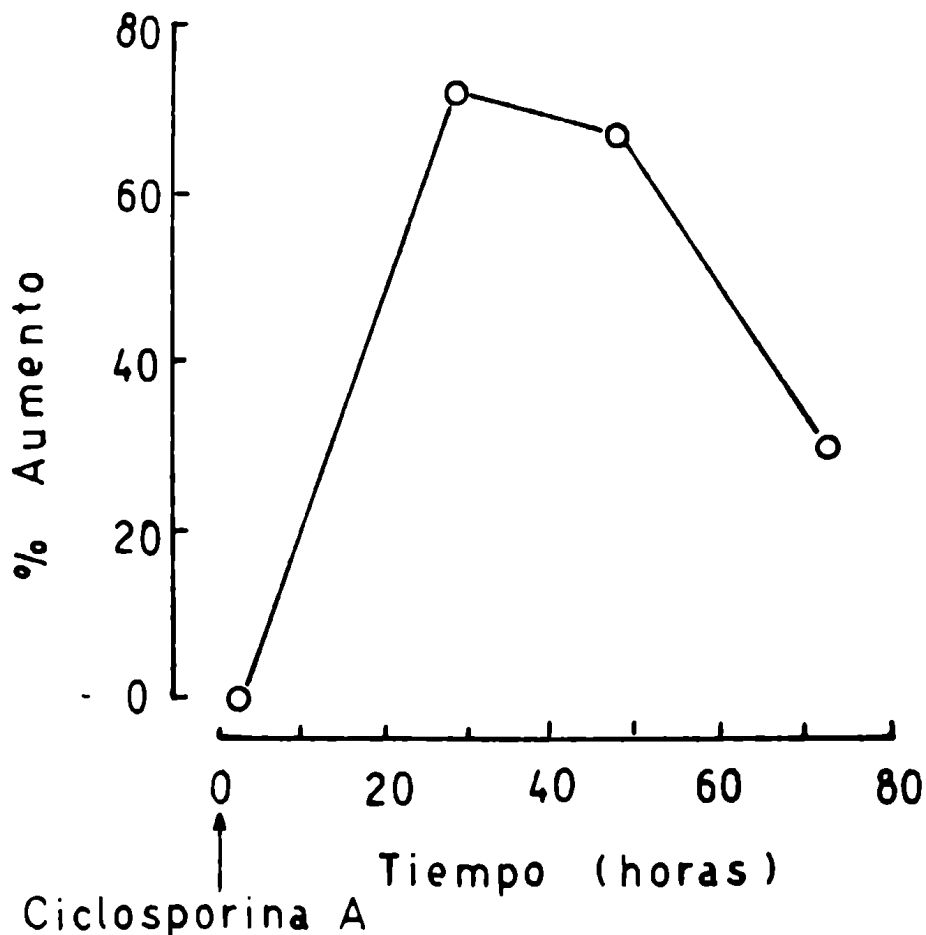
Marca de UR-<sup>3</sup>H eliminada al medio por células CIA-4



La marcación y procesamiento de las células se realizó según lo descrito en materiales y métodos. Se midió la marca liberada al medio de cultivo a distintos tiempos después del agregado de Ciclosporina A. Se calculó en cada caso el aumento con respecto a controles sin tratar con la droga.

Figura 34

Marca de UR-<sup>3</sup>H eliminada al medio por células K-562



Se marcaron y procesaron las células según lo descrito en materiales y métodos. Se agregó Ciclosporina A a algunas alícuotas del cultivo marcado y se midió la liberación de radiactividad al medio de cultivo a distintos tiempos después del agregado de la droga. Se calculó el aumento con respecto a controles sin tratar con la droga.

### Observaciones al microscopio electrónico

Se cultivaron linfocitos en presencia de PHA durante 24 horas, se dividió el cultivo en 2 partes y a una se agregó Ciclosporina A. Se dejó cultivando por 48 horas más y se observaron las células con el microscopio electrónico. La mayoría de las células del cultivo control, tienen el aspecto de linfocitos estimulados normales (Foto N°1). Puede observarse el núcleo, mitocondrias y cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

Las fotografías obtenidas de células crecidas en presencia de Ciclosporina A muestran los cambios morfológicos que acompañan a la muerte celular. En la foto N°2 se observan cambios en el citoplasma y organelas, puede verse vacuolación y el núcleo y las mitocondrias muestran signos de desintegración. La foto N°3 muestra un estadio post mortem, donde la célula aparece vacuolada y vacía.

Foto N°1

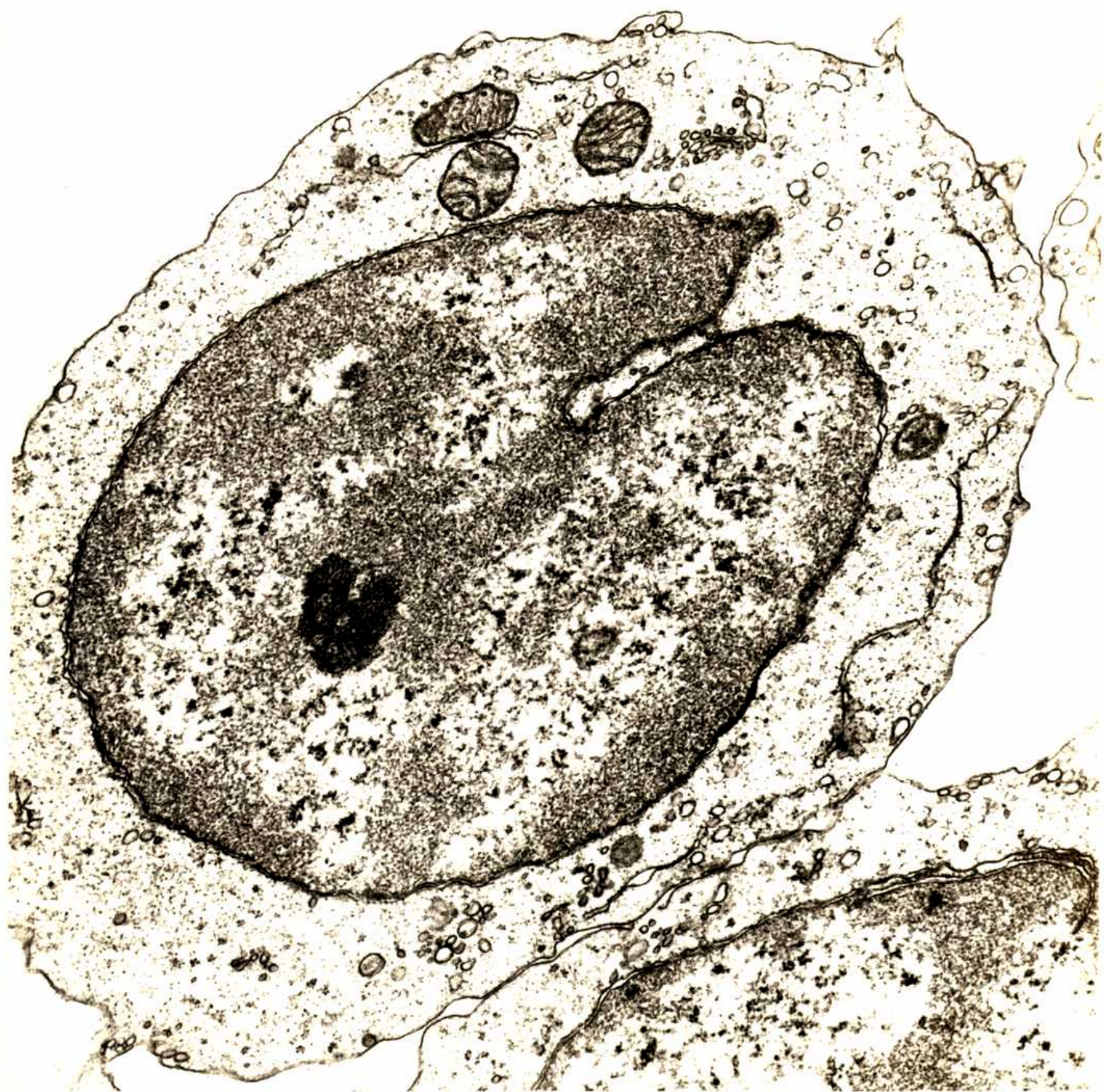


Foto N°2

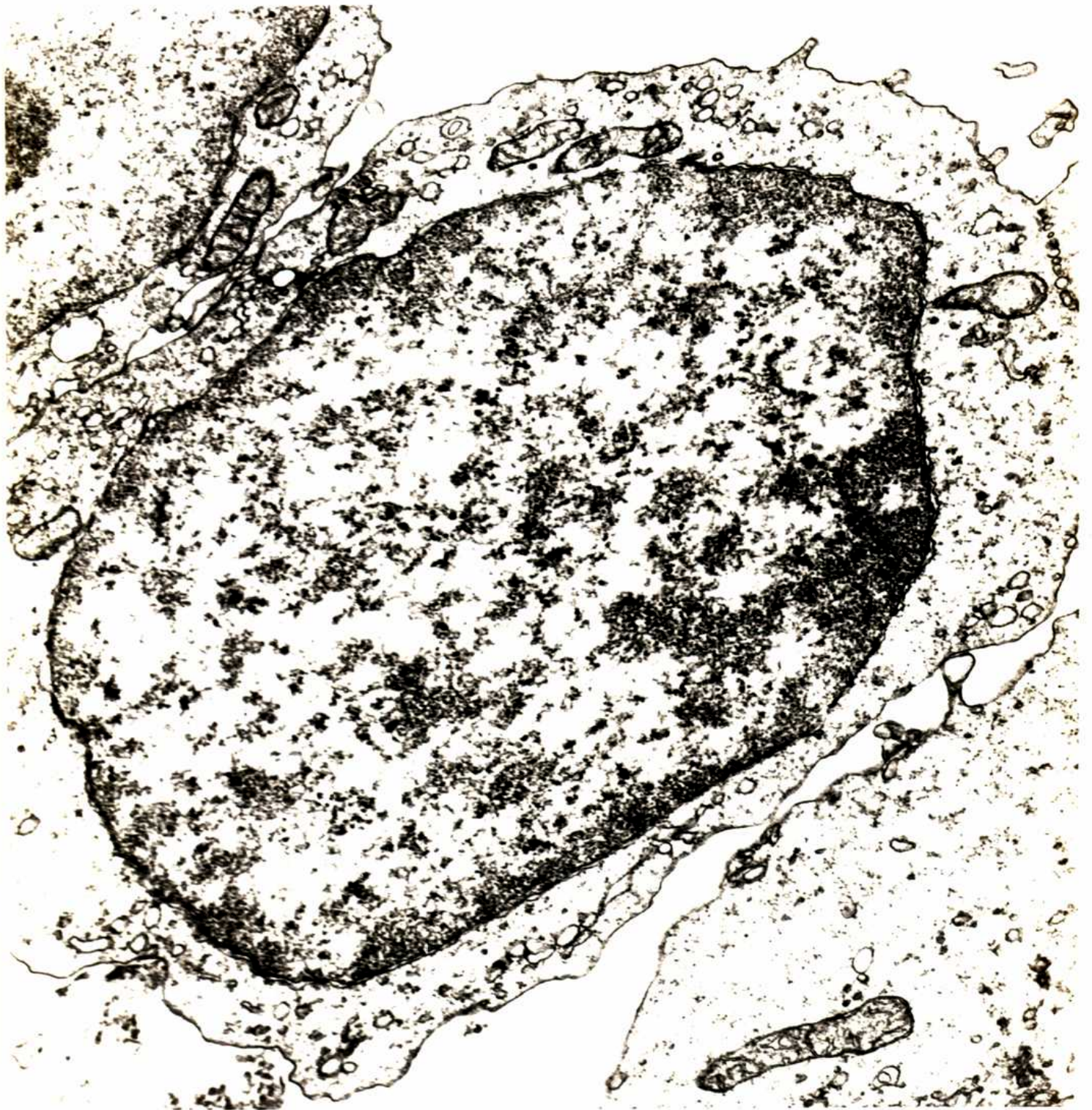
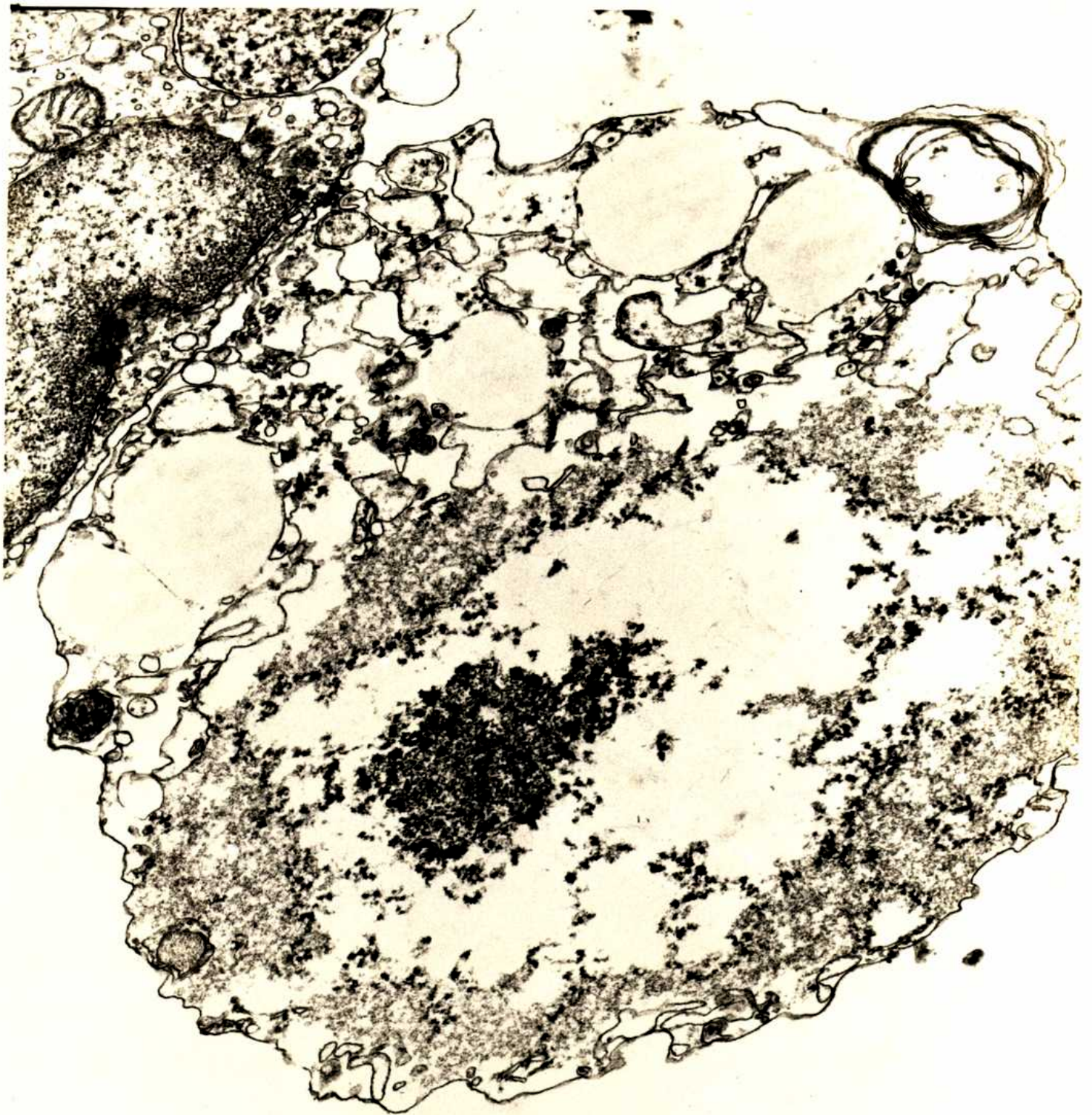




Foto N°3



### Efecto de Ciclosporina A sobre células en cultivo

Debido al hecho de que in vivo, la droga tiene muy bajo efecto mielotóxico, se decidió medir su efecto sobre distintas líneas celulares.

Se encontró que a concentraciones suficientes para inhibir completamente la incorporación de precursores radiactivos en linfocitos estimulados por PHA, no se observaba ningún efecto en las líneas celulares ensayadas. Cultivando algunas líneas con cantidades de Ciclosporina A bastante mayores y durante por lo menos 24 horas se puede obtener alguna inhibición.

La incorporación total de UR y TdR (Tabla 7) muestra que de las 4 líneas celulares humanas diferentes, solo la línea linfoblástica de origen B es sensible a Ciclosporina A, se observa una inhibición del 30% de la incorporación de UR-<sup>3</sup>H después de 24 horas en presencia de Ciclosporina A en concentración de 2 ug/ml. En linfocitos se obtiene una inhibición de 50-80% con 1 ug/ml. Además, puede observarse efecto a las 4 horas después del agregado de la droga. En la misma línea linfoblástica, la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H se inhibe 55% después de 48 horas en presencia de 2 ug/ml de la droga. La curva de dosis-respuesta (Fig. 35) muestra un aumento de la inhibición de la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA 5%, dependiente de la concentración de Ciclosporina A presente en el cultivo.

Se ensayó también el efecto sobre 3 líneas celulares de ratón: L, BALB/3T3 y NB41A3. Para las dos primeras, no se detectó ninguna inhibición a las concentraciones de Ciclosporina A usadas. La tercera resultó ser sensible a la droga, aunque su sensibilidad es bastante menor que la de los linfocitos (Tabla 8).

Tabla 7

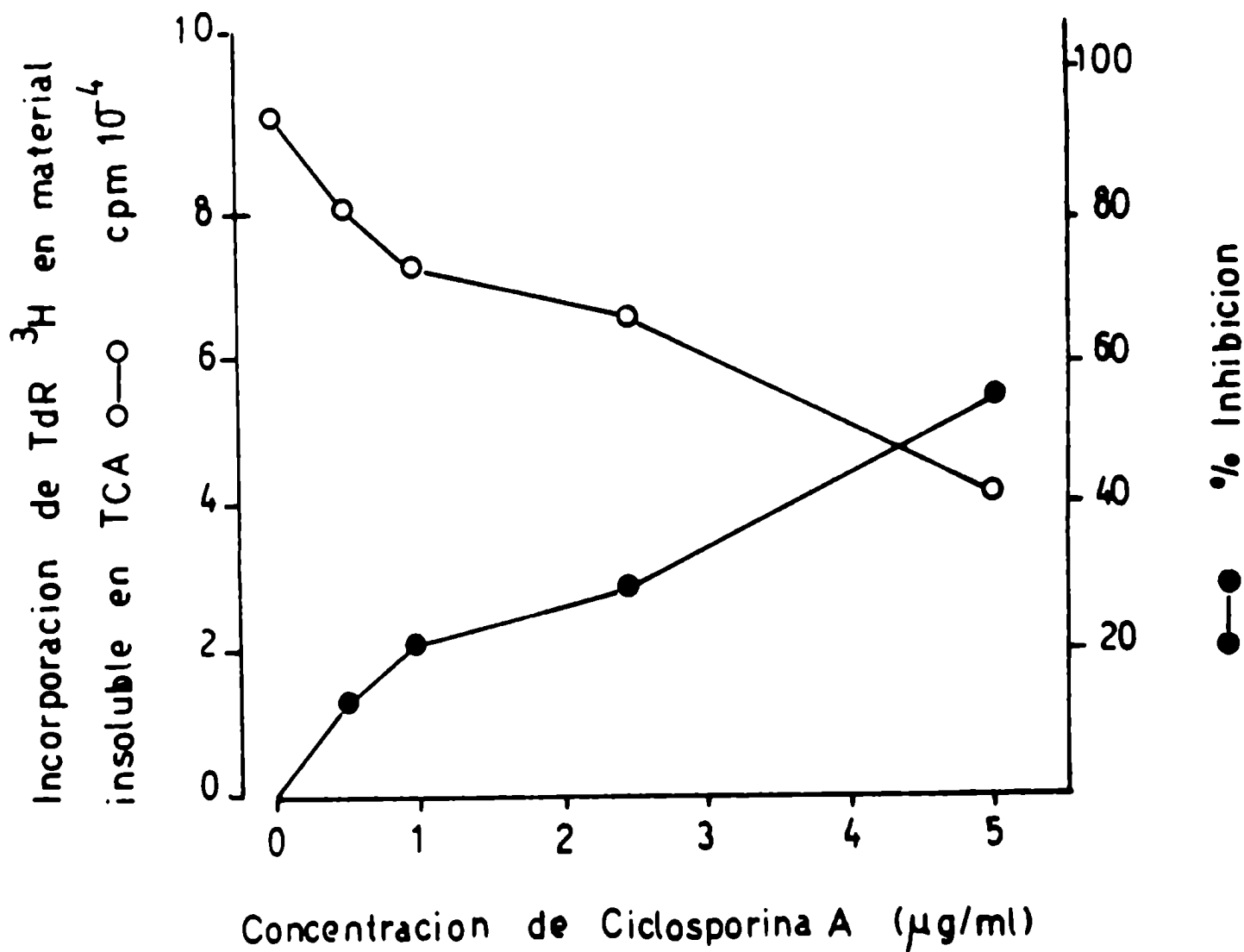
## Efecto de Ciclosporina A sobre líneas celulares humanas

Línea celular	Tiempo después de la adición de Ciclosporina A (horas)	Captación total de UR- <sup>3</sup> H			Captación total de TdR- <sup>3</sup> H		
		Concentración de Ciclosporina A					
		0	1	2	0	1	2
		cpm.10 <sup>-3</sup>					
K-562	24	15,0	-	16,3	22,1	-	24,5
	48	29,1	-	28,2	36,3	-	32,2
CLA-4	24	5,3	5,4	3,7	13,6	11,2	11,0
	48	-	-	-	28,0	24,9	12,1
MRC-5	21	55,5	50,5	49,5	57,8	57,6	57,0
	44	81,5	74,5	71,9	145,2	150,2	160,0

Las células se cultivaron por 24 horas a una densidad inicial de aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  cél./ml en ausencia de la droga. Luego del agregado de Ciclosporina A, el medio con o in la droga fue cambiado diariamente. Los pulsos, de 3 horas, se hicieron antes de que las células llegaran a confluencia

Figura 35

Inhibición de la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H por Ciclosporina A en células linfoblastoides



Se cultivaron células CLA-4 en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal, se agregaron distintas cantidades de Ciclosporina A a distintas alícuotas del cultivo y luego de 26 horas se midió la incorporación de TdR-<sup>3</sup>H a material insoluble en TCA 5%. (Pulsos de 2 horas).

Tabla 3

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de TdR por líneas celulares de ratón

Línea celular	Concentración de Ciclosporina A (ug/ml)			
	0	1	2	4
	$\text{cpm} \cdot 10^{-3}$			
L	121,6	108,5	105,5	101,6
BALB/3T3	123,8	113,4	112,4	-
NB41A3	169,5	151,3	122,4	93,0

Las células se plaquearon 24 horas antes del agregado de Ciclosporina A. La droga estuvo presente durante 48 horas en los cultivos de células L y 3T3, y 24 horas en el de NB41A3. Al final de estos períodos se midió la captación total (pulsos de 3 horas). El medio se cambió diariamente, con o sin la adición de la droga.

Aparentemente, las células linfoblastoides son mucho más sensibles a la droga que otros tipos de células, esto hizo pensar en la posibilidad de que la droga fuese activa en la destrucción de algunos tipos de leucemias. Se ensayó primero el efecto de Ciclosporina A sobre células leucémicas aisladas de pacientes y luego sobre una línea de células proveniente de una leucemia linfoblástica aguda.

Utilizando células aisladas de pacientes, se encontró que el efecto no fue muy marcado sobre las provenientes de leucemia prolinfocítica (Tabla 9), en cambio sobre células provenientes de leucemia linfoblástica aguda, el efecto fue mucho mayor, aunque las concentraciones de Ciclosporina A necesarias para obtener un elevado porcentaje de inhibición fueron mayores que los necesarios para conseguir la misma inhibición en linfocitos (Tabla 10).

Utilizando la línea CCRF-HSB-2, aislada de un paciente con leucemia linfoblástica aguda, se obtuvieron resultados similares (Tabla 11).

La diferencia de especificidad de la droga puede derivar de su mecanismo de acción y su relación con alguna diferencia de la regulación del crecimiento entre células.

#### Importancia del camino metabólico de recuperación de purinas en el efecto de Ciclosporina A

El uso de 2 líneas celulares, CHO y CHO(HGPRT<sup>-</sup>) permitió aclarar un poco el problema de la diferencia de sensibilidad de los distintos tipos de células.

Se usaron 2 medios de cultivo diferentes: F-12 que incluye en su formulación hipoxantina y guanina y MEM $\alpha$ , que contiene todos los nucleósidos y deoxinucleósidos. Este último permite el crecimiento en condiciones óptimas de la mutante carente de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa.

Las células CHO(HGPRT<sup>-</sup>), dependen básicamente del camino "de novo" para la síntesis de nucleótidos, a menos que puedan obtener nucleósidos del medio de cultivo, mientras que las CHO originales pueden utilizar las bases púricas a través de transferasas específicas.

Si se usa medio F-12, se observa que la mutante, que sólo está uti-

Tabla 9

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR-<sup>3</sup>H por células leucémicas. Leucemia prolinfocítica

Ciclosporina A (ug/ml)	Captación total de UR- <sup>3</sup> H (cpm)	% Inhibición
0	3900	0
2	3500	10
4	3640	7
6	3340	14
8	3200	18
10	2600	33

Se aislaron linfocitos de pacientes con leucemia prolinfocítica, como se describe en materiales y métodos. Se los cultivó en medio RPMI 1640 con suero fetal al 10% durante 7 horas, en presencia y ausencia de Ciclosporina A en las concentraciones indicadas. Al cabo de ese tiempo se determinó la captación total de UR-<sup>3</sup>H.

Tabla 10

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR-<sup>3</sup>H por células leucémicas. Leucemia linfoblástica aguda

Ciclosporina A (ug/ml)	Captación total de UR- <sup>3</sup> H (cpm)	% Inhibición
0	13.400	0
2	11.200	16
4	8.100	40
0	4.700	0
5	1.900	60
10	200	96

Se cultivaron linfocitos aislados de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y se cultivaron 24 horas en presencia de Ciclosporina A después de lo cual se hicieron pulsos de UR-<sup>3</sup>H (1 uci/ml) durante 6 y 3 horas respectivamente, y se midió la incorporación total.



Tabla 11

Efecto de Ciclosporina A sobre la captación de UR-<sup>3</sup>H por células leucémicas. Línea CCRF-HSB-2

Ciclosporina A (ug/ml)	Captación total de UR- <sup>3</sup> H (cpm)	% Inhibición
0	15.080	0
1,5	11.779	22
3,0	9.085	40
6,0	6.866	55
12,0	1.021	93
24,0	634	97

Se cultivaron las células durante 20 horas en presencia de Ciclosporina A en las cantidades indicadas, al cabo de dicho tiempo se midió la incorporación total de UR-<sup>3</sup>H (1 uci/ml), luego de un pulso de 3 horas.

lizando la síntesis "de novo", es más sensible a Ciclosporina A que las células normales. En cambio, si se cultivan en MEM , donde ambas pueden usar ambos caminos metabólicos para la síntesis de nucleótidos, el de recuperación de purinas y la síntesis "de novo", el grado de inhibición es el mismo para las dos líneas (Fig. 36).

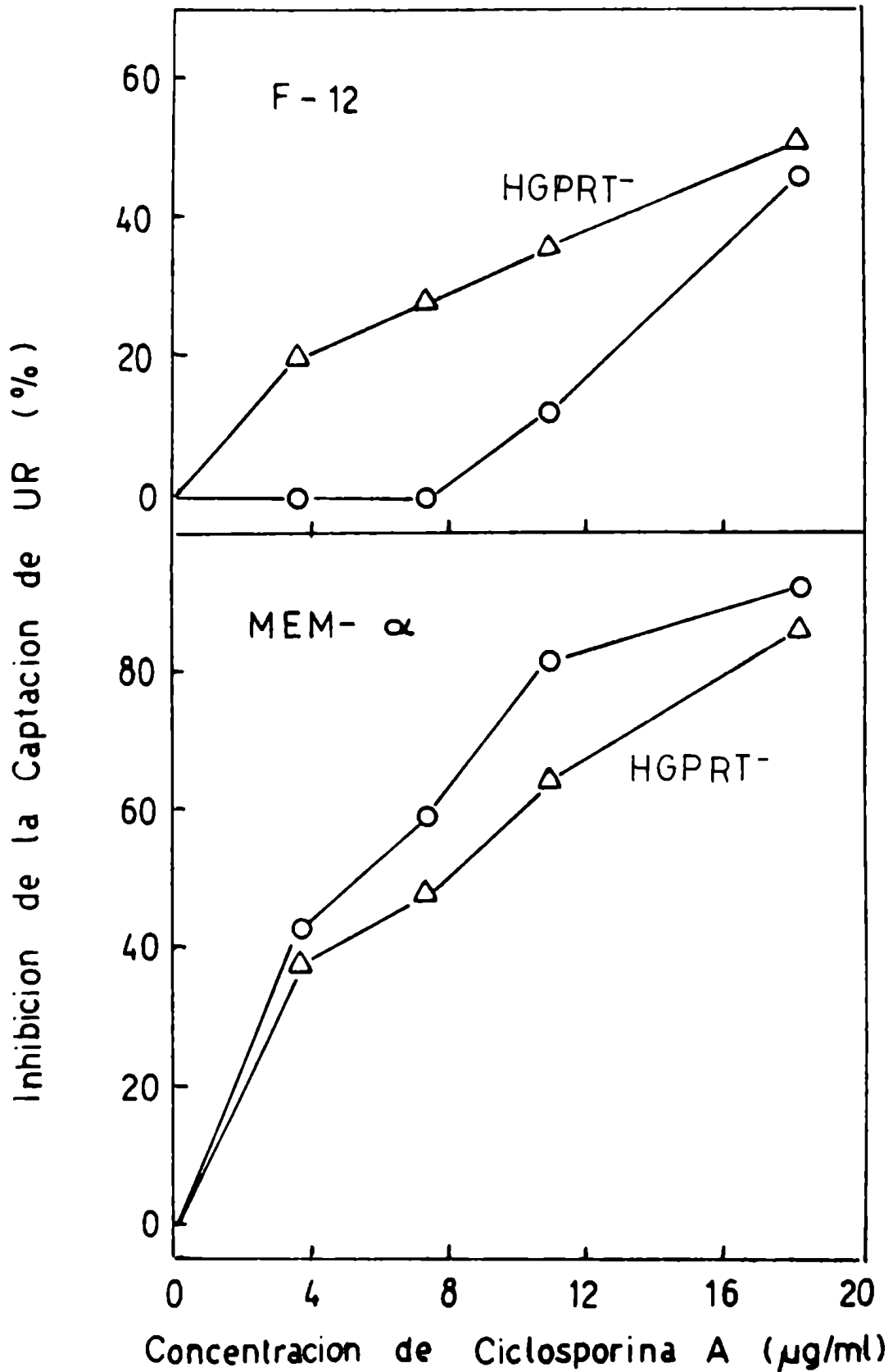
Figura 36. Se determinó la captación total de  $UR-^3H$  por células CHO y CHO(HGPRT<sup>-</sup>) en presencia o no de Ciclosporina A (10 ug/ml). La droga se agregó 40 horas antes de efectuar la determinación.

Las células se cultivaron en cajas de Petri de 5 cm de diámetro, con una densidad inicial de 30.000/cm<sup>2</sup>. Al final del tratamiento con la droga se agregaron 2 uci de  $UR-^3H$  a cada placa y se determinó la incorporación total después de 2 horas.

Los resultados se expresan como % de inhibición por la droga en función de su concentración.

Figura 36

Influencia del camino metabólico de recuperación de purina en el efecto de Ciclosporina A



## DISCUSION

### Efectos Inmunitarios

Los estudios realizados hasta el momento, indican que la Ciclosporina A deprime la respuesta inmune mediada por células y la respuesta inmune humoral dependiente de timo. Sin embargo, en el caso de la formación de Abs contra lipopolisacárido in vivo, función que no depende del timo, así como la estimulación de células de bazo de ratón in vitro por lipopolisacárido, no se encontró inhibición por Ciclosporina A.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que la droga inhibe la respuesta a estimulación antigénica y mitogénica dependiente de células T, pero no la respuesta de células B independiente de timo. No obstante ello, las observaciones realizadas en linfocitos humanos, sugiere que la Ciclosporina A actúa tanto sobre linfocitos T como B, y sobre líneas linfoides en cultivo. Esto se muestra por la inhibición, dependiente de la concentración de Ciclosporina A en el medio de cultivo, a la respuesta proliferativa luego del agregado de PHA, Con A, células alogeneicas y PWM. Las tres primeras permiten medir la respuesta de células T y el PWM da idea de la respuesta de células B.

La efectividad de la droga en cultivo, muestra que su efecto es directo, no requiriendo ulterior activación metabólica en el organismo.

Luego del agregado de Ciclosporina A a linfocitos estimulados, la síntesis de DNA es fuertemente inhibida y el número de blastos se reduce significativamente. Por otro lado, la Ciclosporina A tiene baja toxicidad para linfocitos no estimulados, ya que el cultivo de este tipo de células durante 2 días en presencia de la droga, no impide que éstas tengan una buena respuesta a estimulación mitogénica. El hecho de que Borel Y Weisinger no encontraran reversibilidad del efecto de Ciclosporina A, pudo deberse a que el lavado de las células no fue eficiente, ya que la droga requiere varias horas para su eliminación. También puede ocurrir que las células de ratón sean más sensibles a la droga que los linfocitos humanos (74).

Si esto puede extrapolarse a condiciones in vivo, sería razonable

concluir que la droga afectaría preferencialmente a clones de linfocitos en proliferación. En el caso de una estimulación por un Ag específico, cuando se suministra Ciclosporina A al organismo habrá inmunosupresión selectiva del clon involucrado en la respuesta, quedando intactos los otros clones que responden a otro tipo de Ags.

#### Efecto citotóxico y sobre la proliferación celular

El efecto tóxico directo de la Ciclosporina A sobre linfocitos estimulados, hecho que se evidencia por la disminución del número de blastos en cultivo, fué comprobado marcando las células con compuestos radiactivos. Cuando se marcan cultivos de linfocitos o células CLA-4 con UR-<sup>3</sup>H, luego del ensayo de toxicidad las células muertas liberan la marca al medio de cultivo. En presencia de Ciclosporina A, la eliminación de la marca es mucho mayor que en ausencia de la misma.

Cuando se marca con TdR-<sup>3</sup>H, se obtiene distinta reacción según se trabaje con linfocitos o células CLA-4. Las células CLA-4 que mueren luego de la adición de la droga, liberan la marca al medio de cultivo, encontrándose una considerable diferencia con respecto a la liberación de la marca en cultivos sin tratar. En el caso de linfocitos, la marca queda asociada a células muertas que son fácilmente separables a través de un gradiente de Ficoll. Aquí se encontró que, en presencia de la droga, la marca asociada a células muertas aumenta considerablemente. Por microscopía electrónica, técnica con la cual es muy simple diferenciar células vivas y muertas, se comprobó que en cultivos de linfocitos tratados con la droga por 48 horas, la mayoría de las células están muertas.

Cuando se trabaja con células K-562, tanto el conteo de células viables como los resultados de los experimentos de marcación, no varían apreciablemente en presencia de la droga, lo que indica que estas células aparentemente son menos sensibles a la droga, ya que son afectadas después de mayor tiempo de exposición y en menor proporción.

Es importante insistir en que la droga muestra cierta especificidad para células linfoides. Esto se comprobó utilizando otras células en cultivo. Se encontró que, además de la línea linfoblástica CLA-4 y linfocitos, las células de pacientes con leucemia linfoblástica aguda

son muy sensibles a Ciclosporina A, variando sin embargo, la concentración necesaria para producir efecto inhibitorio, de un tipo de célula a otro. Por el contrario, la droga tiene muy poco efecto sobre células con marcadores mieloides o fibroblastos humanos o de ratón, con excepción de neuroblastoma. La sensibilidad de las líneas celulares utilizadas es muy variable, y en todos los casos las cantidades de droga necesarias para lograr cierta inhibición de la captación de nucleósidos son mucho mayores que en las progenies linfoides.

#### Efecto sobre la captación y metabolismo de precursores

El primer efecto notable observado a nivel bioquímico fué la inhibición de la captación de UR que comienza poco después del agregado de la droga. Esto es seguido por la inhibición de la captación de TdR que comienza alrededor de 10 horas más tarde y luego la de leucina que comienza 25 horas más tarde que la anterior. No se puede establecer, sin embargo, si estos efectos son primarios y explican la inhibición de la transformación de linfocitos, o secundarios a otro efecto de la droga todavía no identificado.

Hay evidencias que relacionan cambios en el transporte de UR con el comienzo de la proliferación, p. ej., la adición de suero fresco a fibroblastos confluentes, producen un rápido aumento de la captación de UR, seguido de división celular. Cunningham y Pardee (73) obtuvieron evidencias de que la estimulación del transporte de nucleótidos refleja cambios en las velocidades de síntesis de RNA de novo y de DNA.

Lingwood y Thomas (74) señalaron la existencia de un cambio rápido en el transporte de nucleósidos después de exponer a las células de linfoma de ratón a inhibidores del crecimiento celular. Sin embargo, obtuvieron diferentes curvas para citostasis e inhibición de la captación de nucleósidos, hecho que indicaría que no necesariamente existe una relación causa-efecto entre ambos fenómenos.

En el presente trabajo se observó que la captación de los 4 ribonucleósidos está inhibida. Para UR, AR y CR la  $V_M$  de captación no varía, pero sí la  $K_{ap}$ . Esto indicaría que lo que está afectada es la funcionalidad de los sitios de captación y no su número. Lo opuesto ocurre con la captación de GR; en este caso es evidente una disminución

de la  $V_M$ .

La variación de  $K_{ap}$  para la captación de UR con la concentración de Ciclosporina A excluye la posibilidad de un efecto todo o nada y sugiere que los sitios de captación son más o menos efectivos de acuerdo a la concentración de Ciclosporina A presente, sin ser anulados irreversiblemente.

Por otra parte, la síntesis de RNA y DNA se ven afectadas bastante más tarde que la captación de precursores, aparentemente, este efecto se debe a fenómenos secundarios.

El hecho de que no se encontrara efecto de la droga in vitro sobre las actividades de quinasa de timidina, PRPP-sintetasa y quinasa de uridina puede deberse al hecho de que no fue posible disolver la droga adecuadamente. Por este motivo se estudió la actividad fosforilante de nucleótidos y nucleósidos en extractos de células tratadas y sin tratar con la droga. Se hicieron estos estudios, para averiguar si existe una relación o no entre captación y utilización de los nucleósidos. Se encontró un efecto inhibitorio de la droga dependiente de la concentración de la misma. Las actividades de quinasas disminuyeron después de que las células permanecieron en cultivo durante 5-6 horas en presencia de la droga. Esto hace improbable que los cambios observados sean debidos a una represión de las enzimas o a la inducción de alguna enzima degradativa del tipo de las fosfatasas. De todas maneras, como las reacciones se llevaron a cabo en presencia de concentraciones altas de ATP, tal implicancia de hidrolasas puede eliminarse. Se puede concluir que es bastante probable que la droga actúe sobre alguna sustancia o proceso involucrado en la fosforilación de ribonucleósidos.

Por otro lado, la menor inhibición de la fosforilación en células CLA-4 comparada con linfocitos concuerda con la menor inhibición de la captación de UR previamente observada. La comparación de la fosforilación en linfocitos con la de células K-562, indica una falta de inhibición en K-562 que coincide con la menor sensibilidad de estas células a la droga.

La posible implicancia de las reacciones de fosforilación en los efectos de la Ciclosporina A también es sugerida por experimentos llevados a cabo con mutantes en las que el camino metabólico de recuperación de purinas está alterado. El trabajo realizado en dichas células

permitió aclarar un poco porqué algunas líneas celulares se afectan más que otras por la droga.

En general, tales mutantes resultaron ser más sensibles a la droga que las células normales cuando se las cultivó en medio carente de nucleósidos. Tal hecho podría deberse a que estas células obtienen sus nucleótidos únicamente a través de síntesis de novo, mientras que las células normales los obtienen a través de ambos caminos: "de novo" y de recuperación. Esto podría determinar una contracción del pool de nucleósidos en las mutantes, y por consecuencia una mayor sensibilidad a la inhibición de la fosforilación por la droga. Por otra parte, en medios adicionados con nucleósidos, el comportamiento de las células mutantes en presencia de la droga, respecto de las normales es muy similar. O sea que la diferente sensibilidad de las distintas células a la droga, sería debida a diferencias metabólicas entre ellas.

Por las características mencionadas, la Ciclosporina A parece una droga adecuada para reemplazar a los actuales regímenes de quimioterapia usados en transplantes, que involucran muchos riesgos e incomodidades, ya que esta droga podría eliminar a los clones de linfocitos que responden a estimulación por Ags extraños, sin afectar los restantes.

También podría resultar útil en la terapia de ciertas leucemias de origen linfoideo. Actualmente se están desarrollando las pruebas clínicas adecuadas para considerar su aplicación.

Pleoni

R. G. Alliman



BIBLIOGRAFIA

- 1- Moore M.A.S., Owen J.J.T., (1967) J. Exp. Med. 126, 715
- 2- Owen J.J.T., Ritter M.A., (1969) J. Exp. Med. 129, 431
- 3- Owen J.J.T., Raff M.C., (1970) J. Exp. Med. 132, 1216
- 4- Stutman O., Good R.A., (1971) Transplant. Proc. 3, 923
- 5- Ford C.E., (1966) Thymus: Exp. Clin. Stud. Cib. Found. Symp. 1965 p.131
- 6- Cooper M.D., Lawton A.R., (1973) Contemp. Top. Immunobiol. 1, 49
- 7- Weissman I.L., (1975) Transplant. Rev. 24, 159
- 8- Cooper M.D., Cain W.A., Van Alten P.J., Good R.A., (1969) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 35, 242
- 9- Nelson D.S. (editor) Immunobiology of the Macrophage. New York: Academic (1976)
- 10- Pierce C.W., Kapp J.A., en Immunobiology of the Macrophage (D.S. Nelson ed.) New York: Academic (1976)
- 11- Rosenthal A.S., Shevch F.M., Contemp. Top. Immunobiol. 116, 1482 (1976)
- 12- Unanue E.R., (1972) Adv. Immunol. 15, 95
- 13- Katz D.H., Benacerraf B., (1972) Adv. Immunol. 15, 1
- 14- Gershon R.K., Kondo K., (1970) Immunology 18, 723
- 15- Gershon R.K., Kondo K., (1971) Immunology 21, 903
- 16- Cerottini J.C., Brunner K.T. (1974) Adv. Immunol. 18, 67
- 17- Engers H.D., Mac Donald H.R. (1976) Contemp. Top. Immunobiol. 5, 145
- 18- Bach F.H., Voynow N.K. (1966) Science 153, 545
- 19- Kosakura S., Lowenstein L., (1965) en Histocompatibility Testing 1965 (D.B.Amos, J.J.Van Rood eds.) p. 203. Munksgaard, Copenhagen
- 20- Häyry P., Defendi V., (1970) Science 168, 133
- 21- Hodes R.J., Svedmyr E.A.J. (1970) Transplantation 9, 470
- 22- Solliday S., Bach F.H., (1970) Science 170, 1046
- 23- Benacerraf B., (1968) Cancer Tes. 28, 1392
- 24- Benacerraf B., Green I., (1969) Annu. Rev. Med. 20, 141
- 25- Crowle A.J., (1975) Adv. Immunol. 20, 197
- 26- David J.R., David R.A., (1972) Prog. Allergy 16, 300
- 27- Gell P.G.H., Benacerraf B., (1961) Adv. Immunol. 1, 319
- 28- Claman H.N., Chaperon E.A., Triplett R.F., (1966) Proc. Soc. Exp.

- Biol. Mod. 122, 1167
- 29- Miller J.F.A.P., Mitchell G.F., (1967) Nature (London) 216, 659
- 30- Miller J.F.A.P., Mitchell G.F., (1968) J. Exp. Med. 128, 821
- 31- Mitchell G.F., Miller J.F.A.P., (1968) J. Exp. Med. 128, 801
- 32- Mitchell G.F., Miller J.F.A.P., (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 296
- 33- Nossal G.J.V., Cunningham A., Mitchell G.F., Miller J.F.A.P., (1968) J. Exp. Med. 128, 839
- 34- Humphrey J.H., Parrot D.M.V., East J., (1964) Immunol. 7, 419
- 35- Baker P.J., Reed N.D., Stashak P.W., Amsbaugh D.F., Prescott B., (1973) J. Exp. Med. 137, 1431
- 36- Braley-Mullen H., (1975) J. Immunol. 115, 1194
- 37- Braley-Mullen H., Sharp G.C., (1974) Cell. Immunol. 12, 49
- 38- Davis A.J.S., Carter R.L., Leuchars E., Wallis V., Dietrich F.M., (1970) Immunology 19, 945
- 39- Howard J.G., Christie G.H., Countenay B.M., Leuchars E.M., Davies A.J.S., (1971) Cell. Immunol. 2, 614
- 40- Maning J.K., Reed N.D., Iutila J.W., (1972) J. Immunol. 108, 1470
- 41- War G.W., Ghaffar A., James K., (1975) Cell. Immunol. 17, 366
- 42- Feldmann M., Basten A., (1971) J. Exp. Med. 134, 103
- 43- Feldmann M., Nossal G.J.V., (1973) Transplant. Rev. 13, 3
- 44- Langman R.E., Armstrong W.D., Diener E., (1974) J. Immunol. 113, 251
- 45- Parish M., Hayward J., (1974) Proc. Royal Soc. London 187, 47
- 46- Shevach E.M., Paul W.E., Green I., (1972) J. Exp. Med. 136, 1207
- 47- Brunner K.T., Cerottini J.C., (1971) en Immunology, p. 385. Academic Press. New York
- 48- David Katz en Lymphocyte Differentiation, Recognition, and Regulation (1977) Academic Press p. 627-630
- 49- Claman H.N., (1972) N. England J. Med. 287, 388
- 50- Kidson C., Nature (London) 213, 779 (1967)
- 51- Makinodan T., Santos G.W., Quinn R.P., (1970) Pharmacol. Rev. 22, 189
- 52- Elion G.B., Hitchings G.H., (1975) en Antineoplastic and Immunosuppressive Agents part II (A.C.Sartorelli, D.G.Johns eds.) p. 404 Springer-Verlag. Berlin
- 53- Makinodan T., Santos G.W., Quinn R.P., (1970) Pharmacol. Rev. 22, 189
- 54- Turk J.L., Poulter L.W., (1972) Clin. Exp. Immunol. 10, 285

- 55- Mc Kearn T.J., (1974) *Science* 183, 94
- 56- Rügger A., Khun M., Lichti H., Huguenin R., Quiquerez C., von Wartburg A., (1976) *Helvetica Chimica Acta* 59, 1075
- 57- Borel J.F., Feurer C., Gubler H.V., Stähelin H., (1976) *Agents and Actions* 6, 468
- 58- Borel J.F., (1976) *Immunology* 31, 631
- 59- Borel J.F., Feurer C., Magnee H., Stähelin H., (1977) *Immunology* 22, 1017
- 60- Allison A.C., García R.C., Green C., Leoni P., 61th Int. Conv. Immunology
- 61- Calne R.Y., White D.J.G., Rolles K., Smith D.P., Herbertson M.B., (1978) *The Lancet* 1183
- 62- Green C.J., Allison A.C., (1978) *The Lancet* 1182
- 63- Tutshka P.J., Beschorner W.E., Allison A.C., Buns W.H., Santos G.W., (1979) *Nature (London)* 280, 148
- 64- Böyum A., (1968) *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 21, supplement 97, 31
- 65- Krenitsky T.A., Papaioannou R., Ellion G.B., (1969) *Journal of Biological Chemistry* 244, 1263
- 66- García R.C., Leoni P., Allison A.C., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1977) 77, 1067
- 68- Bhuyan B.K., (1970) *Cancer Research* 30, 2017
- 69- Lucas A., *Science* (1967) 156, 1237
- 70- Randerath K., Randerath E. en *Methods in Enzimology*, vol. XII, part A p. 323
- 71- Segal A.W., Thakur M.L., Arnot R.N., (1976) *The Lancet* 13, 1056
- 72- Cunningham D.D., Pardee A.B., (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 1049
- 73- Lingwood C.A., Thomas D.B., (1974) *Journal of cell Biology* 61, 359
- 74- Borel J.F., Wiesinger D., (1977) en *Regulatory Mechanisms in lymphocyte activation. Proceedings of the 11th Leukocyte Culture Conference. New York. Academic press* p. 716