

Trastornos de la regulación inmune de la IgA en pacientes con nefropatía IgA y en familiares sanos

J. EGIDO, R. BLASCO, J. SANCHO y L. HERNANDO.

Servicio de Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

RESUMEN

Recientemente hemos descrito la existencia de niveles elevados de IgA polimérica, parcialmente como inmunocomplejos, en el suero y riñones de pacientes con nefropatía IgA. Puesto que estos pacientes tienen a menudo hematuria macroscópica después de una infección del tracto respiratorio superior, nuestra hipótesis de trabajo fue que los linfocitos circulantes provenientes de las secreciones externas producirían en estos pacientes altas cantidades de IgA polimérica después de una estimulación viral. Además hemos pretendido estudiar las anomalías celulares que pudieran explicar los altos niveles de IgA sérica encontrados en estos pacientes. Asimismo, se han estudiado siete familias con un total de veintiséis miembros, para conocer si algún trastorno de la inmunorregulación pudiera transmitirse genéticamente. Nuestros resultados muestran que los linfocitos de pacientes con IgA producen, después de la estimulación policlonal *in vitro*, cantidades de IgA significativamente más alta que el grupo control (560 ± 97 ng/ml. vs 231 ± 57 ; $p < 0,0025$). No hubo diferencias en la síntesis de IgG o IgM. La cantidad de IgA polimérica sintetizada por los linfocitos de pacientes fue también significativamente más alta que en los controles, así como los linfocitos productores de esa inmunoglobulina al terminar los 7 días de cultivo. Todos los pacientes presentaron un aumento de los linfocitos T cooperadores en relación al grupo control con porcentajes normales de los supresores. Seis de diecisiete pacientes mostraron, sin embargo, un trastorno profundo de la actividad de las células T supresoras específicas para IgA. Ninguna anomalía se observó en los T supresores para la IgG o para la IgM. Varios miembros de las familias estudiadas presentaron un aumento de los linfocitos productores de IgA polimérica y aumento de las células T cooperadoras, con algunos trastornos de inmunorregulación. Estos datos, junto con los estudios realizados en pacientes en poblaciones aisladas de linfocitos T y B, apoyan la existencia de un trastorno primario de la actividad de las células cooperadoras como factor importante en la nefropatía IgA. El aumento de la producción de IgA polimérica *in vitro* en estos pacientes sugiere que una situación similar podría ocurrir *in vivo* después de un estímulo viral u otro. En conjunto, las anomalías de inmunorregulación observadas en pacientes y algunos familiares podrían contribuir a la patogenia de la nefropatía IgA.

Palabras clave: Nefropatía IgA. Inmunorregulación de la IgA. Familiares sanos. IgA polimérica.

IMMUNE REGULATION DERANGEMENTS OF IgA IN PATIENTS WITH IgA NEPHROPATHES AND IN HEALTHY RELATIVES

SUMMARY

Recently we have demonstrated the existence of elevated levels of polymeric IgA, partially as immunocomplexes, in the sera and kidneys of patients with IgA nephropathy. Taking into account that these patients have often upper respiratory tract infections, our working hypothesis was that peripheral blood lymphocytes from secretory tissues could produce a large amount of polymeric IgA after viral stimulus. Furthermore we have tried to study the cellular abnormalities that could explain the high serum levels of IgA found often in these patients. In the same way,

Recibido: 14-I-1983.

Forma definitiva: 15-IX-1983.

Aceptado: 19-IX-1982.

Este trabajo fue galardonado con el Premio Julián y Gonzalo Urgoiti a la investigación médica, otorgado por el Colegio Oficial de Médicos de Madrid. 1982.

we have studied seven families (twenty six relatives) to know whether an immunological derangement could be determined genetically. Our results show that the peripheral blood lymphocytes produce, after polyclonal stimulation, significant higher amounts of IgA than the control group (560 ± 97 ng/ml vs 231 ± 57 % $p < 0.0025$); however there were no differences in the synthesis of IgG or IgM. the amount of polymeric IgA produced by patients' lymphocytes was also significantly higher than the control group. All patients studied presented an increased number of helper T lymphocytes with normal percentages of suppressor T lymphocytes, as expressed by monoclonal antibodies (OK series). However 6 out of 17 patients showed a markedly diminution in the activity of specific T suppressor cells for IgA. Several relatives presented an increase in the number of polymeric IgA-producing lymphocytes, as well as an increase in the percentages of helper T lymphocytes, and subtle abnormalities in the immune regulation. These data, together with those obtained from isolated T and B cells, are in favor of the existence of a primary disturbance of the helper T cells activity in IgA nephropathy. The increased production of polymeric IgA by lymphocytes in vitro also suggest that a similar situation could occur in vivo after a viral or other stimuli. In the whole, the immune regulation derangements observed in patients and in some patients' relatives could contribute to the pathogenesis of this nephropathy.

Key words: IgA nephropathy. Immunoregulation of IgA. Healthy relatives. Polymer IgA.

INTRODUCCION

La glomerulonefritis mesangial IgA (enfermedad de Berger o nefropatía IgA) se caracteriza por la presencia a nivel del mesangio glomerular de IgA y frecuentemente C₃ y/o otras inmunoglobulinas con un patrón granular^{1, 2}. Aunque otras enfermedades, como la nefropatía de Schönlein-Henoch o de la cirrosis alcohólica hepática y del lupus eritematoso diseminado, pueden presentar un cuadro similar a la inmunofluorescencia, los síntomas generales que acompañan a estas entidades suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico diferencial. De todas formas con las dos primeras suele tener algún mecanismo patogénico en común, tal como hemos descrito en otra parte³.

Aunque la nefropatía IgA fue inicialmente descrita en Francia, posteriores comunicaciones han demostrado su distribución universal; sin embargo, su incidencia varía de unos países a otros. Así en Francia representa el 20-25 % de las glomerulonefritis primitivas^{4, 5}, mientras que en USA entre 2-5 %⁶⁻⁸. En nuestro país la frecuencia viene a ser similar a la de otros países mediterráneos⁹. Probablemente la diferencia en la política de realización de biopsias renales en un paciente con proteinuria y/o hematuria mínima, junto con el empleo de antisueros con distinta especificidad deban ser considerados entre los factores que podrían explicar esas diferencias.

Aunque la patogenia de esta enfermedad no está clara, la alta frecuencia de niveles séricos de IgA elevados^{4, 9-11}, así como la recidiva de esta nefropatía en los riñones trasplantados¹², dio lugar a que la atención se dirigiera hacia esa proteína. La posibilidad de una IgA anómala fue sugerida inicialmente por LAGRUE¹³ y BERGER¹²; sin embargo, fue nuestro grupo el primero en publicar in extenso las características bioquímicas de la

IgA en esta nefropatía^{14, 15}. La mayoría de los pacientes mostraron un aumento de la IgA polimérica. Posteriormente hemos demostrado que la IgA polimérica está presente a nivel del mesangio glomerular y que los niveles de IgA polimérica sérica disminuyen o se normalizan después del tratamiento con difenilhidantoína, medicamento que selectivamente deprime la síntesis de IgA^{16, 17}. Asimismo hemos observado la presencia de inmunocomplejos específicos de IgA e IgG en porcentajes variables en estos enfermos (alrededor del 30-55 %) según la técnica^{18, 19}. Estos y otros aspectos patogénicos han sido revisados recientemente en otra publicación²⁰.

El papel de la inmunidad celular en la nefropatía IgA ha recibido poca atención hasta el momento. De hecho, ni siquiera fue mencionado en las dos últimas revisiones de la literatura sobre el tema^{21, 22}. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta frecuencia de IgA sérica elevada en el suero de estos pacientes, tales anomalías no deberían sorprender. NOMOTO y cols.²³ observaron que el número de linfocitos portadores de IgA estaba notablemente aumentado en sangre periférica en estos pacientes. Sin embargo, este hallazgo no fue confirmado por otros autores utilizando un F(ab')₂ específico anti-IgA²⁴.

En el presente trabajo pretendemos mostrar las anomalías celulares encontradas en estos pacientes, así como en algunos familiares cercanos, lo que iría a favor de cierta predisposición genética en esta enfermedad. Teniendo en cuenta que en el modelo experimental murino de IgA la presencia de inmunocomplejos conteniendo IgA polimérica fue un requisito para la aparición de nefritis²⁵, nuestro abordaje inicial fue establecer la fuente de los niveles de IgA polimérica que estaban altos en estos pacientes. Posteriormente estudiamos las alternaciones de inmunorregulación en esta nefropatía.

MATERIAL Y METODOS

Estudiamos 25 pacientes con nefropatía IgA diagnosticados por biopsia renal. El criterio diagnóstico se basó en la presencia de IgA en el mesangio glomerular asociado o no a otras inmunoglobulinas y complemento, en ausencia de evidencia clínica o bioquímica de enfermedad hepática, síndrome de Schönlein-Henoch, lupus eritematoso diseminado u otras enfermedades sistémicas. Estudiantes de medicina y miembros de plantilla con edades y sexos comparables a los pacientes se utilizaron como controles. Ninguno de los pacientes ni controles habían tomado ningún medicamento 48 horas antes del examen. Se estudiaron además 26 familiares.

Preparación de los linfocitos y cultivos

Los linfocitos circulantes se obtuvieron de sangre heparinizada (20 U/ml.) de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), siguiendo el método de BÖYUM²⁶. Las preparaciones eran viables en 90-95 % mediante la exclusión del azul tripán. Los linfocitos se lavaron dos veces con solución de Hank y una vez con medio RPMI-1640. En el último lavado no se detectaron inmunoglobulinas. Las células, a una concentración de 2×10^6 linfocitos/ml. en medio RPMI-1640 suplementados con suero de ternera fetal descomplementado al 10 %, glutamina 2 mM., estreptomycin 50 µg/ml. y penicilina 100 U/ml. se incubaron en presencia o ausencia de 10 µg/ml. del mitógeno Pokeweed (PWM) a 37° C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en tubos de cultivos de plástico de 13 x 10 mm. (Falcon Plastic Oxnard, Ca, USA). La cantidad de PWM empleada produjo máximas respuestas en experimentos previos. Al final de los 7 días de cultivo los tubos se centrifugaron a 400 g. durante 10 minutos y las células se emplearon para estudiar los receptores citoplásmicos para el componente secretorio (SC) como se describe más abajo. La cantidad de IgA, IgG e IgM secretada en los sobrenadantes se determinó por un radioinmunoensayo previamente descrito¹⁵. Este RIA permite medir inmunoglobulinas en un rango de 10 a 300 ng/ml. Los sobrenadantes fueron utilizados además para estudiar los pesos moleculares de la IgA sistematizada tal como se describe más abajo.

Aislamiento y purificación del componente secretorio (CS) y del anticuerpo anti-CS

El componente secretorio (CS) fue aislado de calostro humano mediante una cromatografía de afinidad con una IgM unida a la sefarosa²⁷. La pureza del CS se determinó mediante inmunoelectroforesis e inmunodifusión radial doble con suero polivalente antisuero humano normal (Behring diagnostic) y anticalostro. El CS obtenido en estas condiciones contenía trazas de lactoferrina pero no IgA.

La pureza y especificidad del suero anti-CS (Dakopatts, Dinamarca) se comprobó por inmunoelectroforesis e inmunodifusión doble. Este antisuero sólo reaccionó con el CS pero no con otras inmunoglobulinas ni cadenas ligeras. A pesar de ello fue purificado pasándolo a través de una columna de Sefarosa 4B (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suecia) conjugada a IgA, IgG y cadenas ligeras humanas.

Examen de los linfocitos secretores de IgA polimérica

La medida de la afinidad del CS por la IgA polimérica en las células y en los sobrenadantes de los cultivos se basó en los métodos de BRANDTZAEG²⁸ y CRAGO²⁹ parcialmente modificados^{13, 30}.

Los linfocitos extraídos del cultivo después de 7 días de incubación en presencia de PWM, se lavaron con solución Hank dos veces y se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640. Las células se llevaron a una concentración final de 2×10^6 cél/100 µl. de medio de cultivo.

La presencia de CS en el citoplasma celular se detectó con un anticuerpo comercial anti-CS, marcado con rodamina (Atlantic Antibodies Scarborough MA, USA), tal como se ha publicado previamente³¹.

La detección de la clase de inmunoglobulina receptora del CS se realizó mediante un anticuerpo que contenía los fragmentos F(ab')₂ de los anticuerpos anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM, respectivamente, marcados con fluoresceína (Cappel).

Tamaños moleculares de IgA producida in vitro

Los tamaños moleculares de IgA producida in vitro se analizaron según el método de КУТТЕН³². Los sobrenadantes aislados del cultivo celular, después de 7 días de incubación con PWM y cuantificados por RIA, se dializaron durante 18 horas en solución salina 0,15 M, pH 7,3. Dos ml. del dializado se cromatografiaron en una columna K-16/40 (Pharmacia Fine Chemicals), de Ultrogel ACA-22 (LKB), equilibrada en el mismo tampón. La columna se calibró previamente. Los marcadores utilizados fueron: azul dextrano (mayor de 2×10^6), ferritina (450.000), aldolasa (150.000) y BSA (68.000).

Para evitar la presencia de agregados de IgA, que pudieran proporcionar falsos porcentajes de distribución, 2 ml. del sobrenadante se dializaron durante 18 horas, frente a tampón acético, acetato 0,1 M a pH 4,1. Se cromatografiaron en la columna de ACA 22, previamente recalibrada y reequilibrada en dicho tampón.

Por último para determinar la presencia de verdaderos polímeros de IgA, alícuotas de algunos de los sobrenadantes iniciales se dializaron frente a tampón Tris-CLH 0,2 M, pH 8,6, EDTA 20 mM. Dos ml. del dializado se incubaron durante una hora a 37° C con 20 µl. de una solución 10 mM. de ditriotritiol y 15 minutos a 4° C con 20 µl. de iodoacetamida 21 mM., en ausencia de luz. La muestra se aplicó en una columna de ACA 22, previamente calibrada y equilibrada en el mismo tampón.

En todos los casos, la presencia de IgA se ensayó por RIA en las fracciones eluidas.

Caracterización bioquímica de los tamaños moleculares en cultivo: afinidad por el componente secretorio

Un mg. de CS libre y purificado se marcó con un mCi de ¹²⁵I, según el método de McCONNAHEY y DIXON³³, eliminando el ¹²⁵I libre por filtración en Sephadex G-25. La afinidad por el CS se realizó tal como hemos comentado más arriba.

Las fracciones eluidas de la columna de ACA 22, comprendidas en un rango de pesos moleculares entre 650.000 y 250.000 para las formas poliméricas y 250.000 y 100.000 para las formas monoméricas, se incubaron durante hora y media a temperatura ambiente, con CS-¹²⁵I, a una relación molar de 1/7,5. Los controles se establecieron incubando el CS-¹²⁵I con IgA e IgM monoméricas y poliméricas, en las mismas condiciones. Las muestras incubadas se aplicaron en una columna de Ultrogel ACA 22, determinándose el tanto por ciento de unión, en función de la distribución de radiactividad, en las fracciones eluidas.

Subpoblaciones de linfocitos T definidos por anticuerpos monoclonales

Las subpoblaciones de células T se identificaron en las células mononucleares, obtenidas como se describe más arriba, usan-

do anticuerpos monoclonales específicos denominados OKT3, OKT4 y OKT8 (Ortho Pharmaceuticals, Raritan NJ, USA), producidos por hibridomas en ratón³³. Estudios funcionales in vitro han demostrado que las células OKT4 + y las células OKT8 + representan respectivamente las subpoblaciones de linfocitos T cooperadoras y supresoras/citotóxicas³⁵. La inmunofluorescencia indirecta se realizó siguiendo las instrucciones dadas por los fabricantes y tal como hemos publicado anteriormente³⁶. Se contaron aproximadamente 200 células por campo por dos observadores independientes. Los resultados se expresaron como el porcentaje de cada subpoblación de células T con respecto al total del número de células mononucleares contadas. Algunas muestras de células mononucleares se estudiaron por triplicado con una variación de recuento menor del 3 %.

Ensayo de células supresoras

La generación de células supresoras se realizó por incubación con Con A (grado IV, Sigma Chemical, Co., St. Louis Mo, USA), en dos diferentes ensayos. En el primero de ellos³⁷, los linfocitos de pacientes y controles a una concentración de 2×10^6 células/ml. de RPMI 1640 se incubaron en placas convencionales con dosis de Con A que oscilaron de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Todos los mitógenos se añadieron al comienzo del cultivo. El cálculo del porcentaje de la supresión de inmunoglobulinas inducidas por el mitógeno PWM se realizó como ha sido publicado previamente³⁷. En el segundo ensayo³⁸, las células de pacientes y de controles se estimularon con 25 μg de Con A (o sin Con A como control); después de 48 horas de incubación las células se lavaron tres veces en RPMI 1640 conteniendo 0,3 M alfa-metil-D-piranosido (Sigma Corp., St. Louis, Mo, USA) para asegurarse de la completa eliminación del mitógeno de las células. Células activadas con Con A, o células controles (sin estimular), de pacientes o sujetos normales a una concentración de 1×10^6 células se co-cultivaron con 1×10^5 células obtenidas de pacientes o controles en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$. de PWM durante 7 días más.

Ambos ensayos tienen como objeto el observar el efecto de células supresoras activadas por la Con A sobre la secreción de inmunoglobulinas inducidas por el mitógeno PWM.

Aislamiento de linfocitos T y B, y co-cultivos

Las células formadoras de rosetas espontáneas con hematíes de carnero (células T) se separaron de las no formadoras de rosetas mediante un gradiente de densidad³⁹. Brevemente, sobre 3 ml. de Lymphoprep se depositaron cuidadosamente la suspensión de rosetas; después de la centrifugación de la interfase se recogió la población rica de linfocitos B. Del fondo se obtuvieron los linfocitos T, previo tratamiento durante 15 minutos, con una solución de CINH_4 0,83 ml. con el fin de lisar los hematíes. Ambas poblaciones se lavaron por separado dos veces por la solución de Hank. Posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo enriquecido y se procedió al recuento celular. La viabilidad se comprobó por la expulsión del azul tripán siendo de 95 %. La riqueza de esas poblaciones se determinó por rosetas espontáneas e inmunoglobulinas de superficie. El porcentaje de rosetas, en el caso de la suspensión de células T, fue superior al 95 % y en el caso de la suspensión de células B, menor del 2 %.

Para realizar los co-cultivos de linfocitos B y T, 2×10^5 células B de individuos controles, se incubaron con 2×10^5 células T de controles y pacientes en presencia de 2 μl . de PWM durante 7 días, en las condiciones habituales de cultivo. Paralelamente 2×10^5 de células B de pacientes se incubaron con la misma cantidad de células T de pacientes o controles en

idénticas condiciones. Los sobrenadantes se guardaron para estudiar inmunoglobulinas.

RESULTADOS

Estudio de la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos de sangre periférica

Puesto que los pacientes con nefropatía IgA tienen frecuentemente aumentos séricos de la IgA, decidimos estudiar la producción de inmunoglobulinas in vitro. En ausencia de PWM no hubo diferencias significativas entre los pacientes y los controles (Fig. 1). Por el contrario, después de la estimulación policlonal con PWM la producción de IgA en los pacientes ($560 \pm 97 \text{ ng/ml}$.) fue significativamente más alta que en los controles (231 ± 57) ($p < 0,0025$). No hubo diferencia entre la síntesis de IgM e IgG entre los controles y los pacientes.

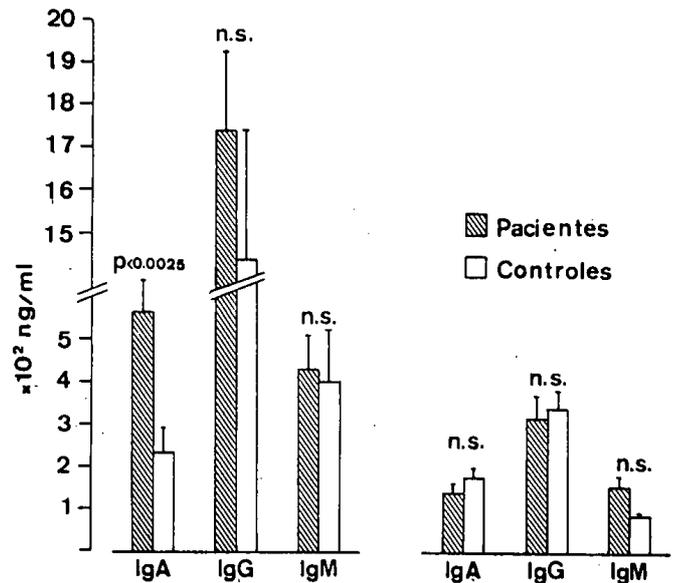


Fig. 1.—Producción de inmunoglobulinas por los linfocitos de sangre periférica después de 7 días de cultivo en pacientes y controles. A la izquierda, linfocitos estimulados con el mitógeno policlonal Pokeweed (PWM); a la derecha, linfocitos no estimulados.

Unión citoplasmática del componente secretorio (CS)

El estudio de los linfocitos formadores de IgA polimérica se basó en la fijación al CS. Para ello el estudio se realizó al cabo de los 7 días de cultivo, tanto en pacientes como controles. En ese momento los receptores para el CS se detectaron en el citoplasma del 20 % de los linfocitos estimulados. El porcentaje de células formadoras de inmunoglobulinas fue alrededor del 40 % al final del cultivo. Cuando se determinó la clase de inmunoglobulina por las células que fijaban el CS se encontró que aunque la mayoría de ellas contenían IgA, también las células formadoras de IgM e IgG unían el CS tanto en

pacientes como en controles. Sin embargo, la relación unión CS/IgA fue significativamente mayor en los pacientes que en los controles (69 ± 21 media \pm DS versus 44 ± 27 respectivamente). No hubo diferencias entre las células con las relaciones CS/IgM o CS/IgG (Fig. 2).

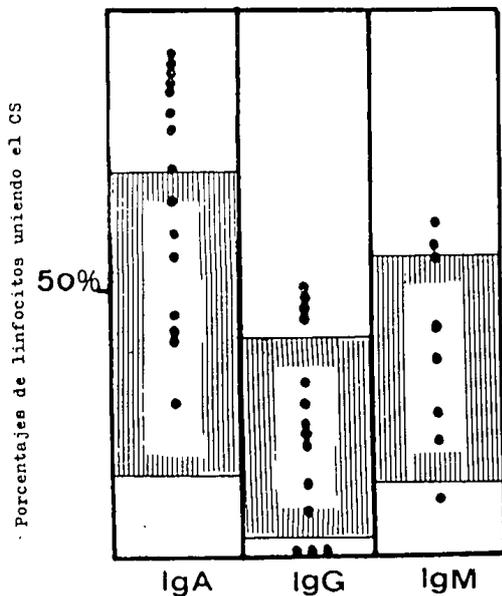


Fig. 2.—Porcentajes de linfocitos de pacientes con nefropatía IgA y controles estimulados con PWM uniendo simultáneamente componente secretorio (CS) e inmunoglobulinas. El área rayada representa la media \pm 1 DS de los valores controles.

Características bioquímicas de la IgA producida por los linfocitos de sangre periférica estimulados con PWM

Los sobrenadantes al término de los 7 días de cultivo de linfocitos estimulados con PWM fueron agrupados y fraccionados en columnas de Ultrogel ACA 22. Una elución bifásica se obtuvo para la IgA de los sobrenadantes, tanto en pacientes como en controles. En ambos grupos la proporción de IgA eluida en la zona correspondiente a la IgA de alto peso molecular era elevada. Sin embargo, el porcentaje de IgA con alto peso molecular era significativamente mayor en pacientes que en controles (Figs. 3 y 4). Por el contrario, la IgA monomérica por los linfocitos de los controles era mayor que en los pacientes. Se obtuvo una pequeña cantidad de IgA (alrededor de 10 %) en el volumen de exclusión, que podrían corresponder a agregados de IgA inespecíficos durante el proceso técnico⁴⁰.

Para determinar si la IgA de alto peso molecular sintetizada era verdaderamente IgA polimérica o si se podía tratar de agregados formados en el proceso de manipulación se hicieron dos grupos de experiencias: los sobrenadantes congelados a -20° C y descongelados una sola vez se dializaron frente a un buffer de acetato sódico 0,1 M, pH 4,1, y se cromatografiaron en una columna de ultragel ACA 22, equilibrada y recalibrada con el mismo tampón. Como puede verse en la figura 3 no hubo cam-

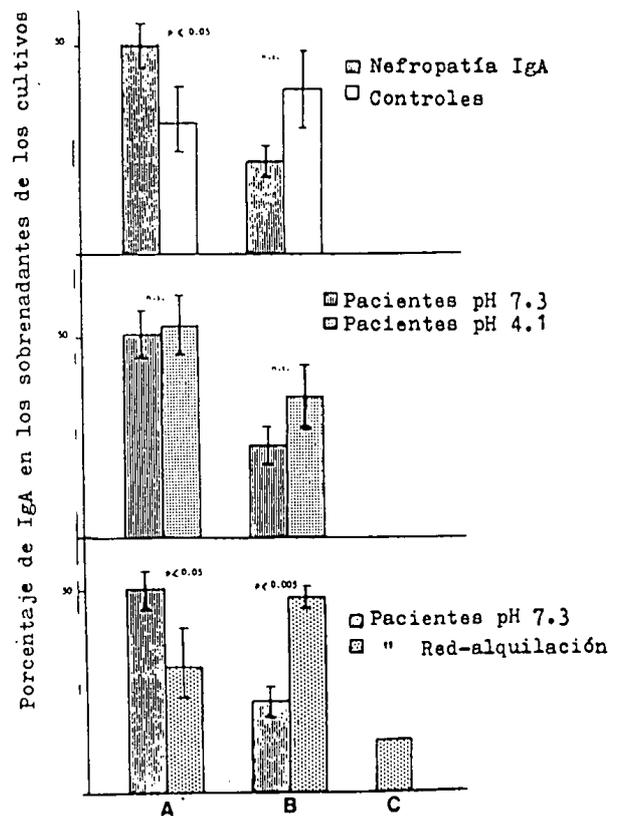


Fig. 3.—Porcentajes de IgA sintetizada por linfocitos periféricos estimulados con PWM después de filtración en columnas de Ultrogel ACA 22. A: IgA de los sobrenadantes comprendida entre 600.000 y 250.000 daltons. B: IgA de los sobrenadantes comprendida entre 250.000 y 150.000 daltons. La parte superior muestra que los porcentajes de la IgA con alto peso molecular producida por los linfocitos de pacientes fueron significativamente más altos que los controles normales. La parte media muestra que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de la IgA de los sobrenadantes de los pacientes antes y después del tratamiento a pH ácido, lo que está de acuerdo con la estructura covalente de la IgA polimérica. La parte inferior muestra que después de la reducción y alquilación de los sobrenadantes de los pacientes hubo una disminución de las formas de IgA con alto peso molecular (A); un aumento en la IgA monomérica (B), y la aparición de fragmentos de menor peso molecular (C).

bios significativos en los porcentajes de distribución de la IgA comprendida entre 600.000 y 250.000 daltons, lo que está de acuerdo con la estructura covalente de la IgA polimérica. Finalmente, los sobrenadantes de pacientes y controles se redujeron y alquilaron antes de cromatografiarlos. Como se esperaba, hubo una disminución en los porcentajes de formas de alto peso molecular y un aumento en la zona de la IgA monomérica y componentes de bajo peso molecular (Figs. 3 y 4).

Para un estudio más completo de la naturaleza polimérica de la IgA producida in vitro se ensayó la afinidad por el CS siguiendo el método de BRANDTZAEG²⁸ parcialmente modificado¹³. Para eliminar la IgM que podría interferir con el ensayo, dada su capacidad de unión al CS, las fracciones a ensayar se incubaron con un inmunoabsorbente de sepharosa 4B a la que se había unido una anti-IgM en exceso de anticuerpo. La IgA de cada uno de los tres picos obtenidos por filtración en la columna de Ultrogel (Fig. 4) se incubaron con ¹²⁵I CS. Los complejos formados se separaron del ¹²⁵I CS libre por ultracentrifuga-

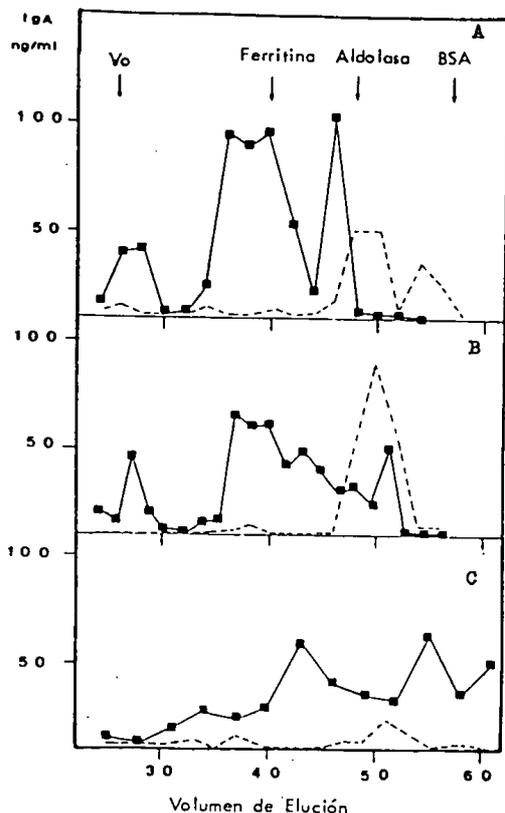


Fig. 4.—Perfil de elución representativo de un paciente y un control (IgA) producida por los linfocitos circulantes estimulados con PWM. La sección A (parte superior) representa el fraccionamiento en columna de Ultrogel ACA 22, del sobrenadante de los cultivos al cabo de 7 días eluido con PBS pH 7,4 y estudiado para la IgA por radioinmunoensayo (paciente (■—■) y control (---)). Sección B (parte media) muestra alícuotas de los mismos sobrenadantes previamente dializados contra buffer acetato sódico C1M, pH 4,1 y luego eluido de la columna con el mismo tampón. Sección C muestra otras alícuotas reducidas y alquiladas; posteriormente fraccionadas y estudiadas para IgA. Las flechas indican los perfiles de elución del azul dextrano (Vo), ferritina (peso molecular = 440.000), aldolasa (peso molecular 158.000) y BSA —albúmina sérica bovina— (peso molecular 68.000) que fueron utilizados como marcadores.

ción en un gradiente de densidad de 5-40 % de sacarosa midiéndose las c.p.m. en cada fracción³¹. Sólo la IgA comprendida en la fracción polimérica (2.º pico, figura 4) fue capaz de unir un 40 % de ¹²⁵I CS, porcentaje similar al encontrado para la IgA polimérica purificada del suero de estos pacientes¹³ y la IgA polimérica de mielomas de IgA²⁹.

Estos resultados sugieren que la IgA de alto peso molecular, encontrada en los sobrenadantes de los cultivos

de linfocitos al cabo de 7 días y en presencia de PWM, era realmente IgA polimérica, y que los pacientes con nefropatía IgA producen significativamente cantidades mayores de esa inmunoglobulina que los sujetos control.

Subpoblación de células T definidas por anticuerpos monoclonales

Los porcentajes de células OKT3 +, OKT4 + y OKT8 + encontradas en nuestra población control (tabla I) están en rangos similares a los encontrados por otros autores. No hubo diferencia en los porcentajes de células OKT3 + entre los pacientes y los controles. Sin embargo, el balance entre las células OKT4 + y OKT8 + estuvo significativamente elevado en pacientes con nefropatía IgA; asimismo el porcentaje de células T cooperadoras (OKT4 +) fue significativamente más alto que en los controles. Por el contrario, el porcentaje de células T supresoras (OKT8 +) fue similar al de los controles. Dos pacientes presentaron simultáneamente un aumento en los porcentajes de OKT4 + y OKT8 + con una relación normal OKT4 + y OKT8 +. Otros dos pacientes, examinados en dos ocasiones diferentes, mostraron porcentajes elevados persistentemente de células T cooperadoras (OKT4 +).

Generación de células supresoras por la Con A (Figs. 5, 6 y 7)

De los diferentes ensayos para generar células T supresoras por la Con A, escogimos inicialmente la de MILLER y col.³⁷ por razones de simplicidad. La media por porcentaje de la supresión de la síntesis de IgA por los linfocitos estimulados por PWM en presencia de 25 µg/ml. de Con A fue en los pacientes con nefropatía de IgA de 16,2 ± 6,2 (ESM) significativamente reducido en relación a la media de los sujetos controles (38,7 ± 2,6) (Fig. 5). Sin embargo, la variabilidad en los pacientes fue amplia y así 6 de los 17 pacientes estudiados presentaron valores normales por debajo del rango del grupo control (2 desviaciones standard), mientras otros 5 pacientes

TABLA I

VALORES PORCENTUALES MEDIOS DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA DETERMINADOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES

	N.º	Células OKT3+ %	Células OKT4+ %	Células OKT8+ %	OKT4+/OKT8+ %
Controles	11	53,32 ± 1,72 *	33,37 ± 1,18	22,83 ± 0,92	1,47 ± 0,0
Pacientes	23	58,99 ± 3,11	45,46 ± 1,47	26,23 ± 2,28	1,79 ± 0,05
		NS	0,00025 **	NS	0,0005
Familiares	26	56,18 ± 1,12	39,54 ± 1,10	26,14 ± 0,96	1,54 ± 0,05
		NS	0,00125 **	NS	NS

* Media ± ESM.

** Test de chi-cuadrado.

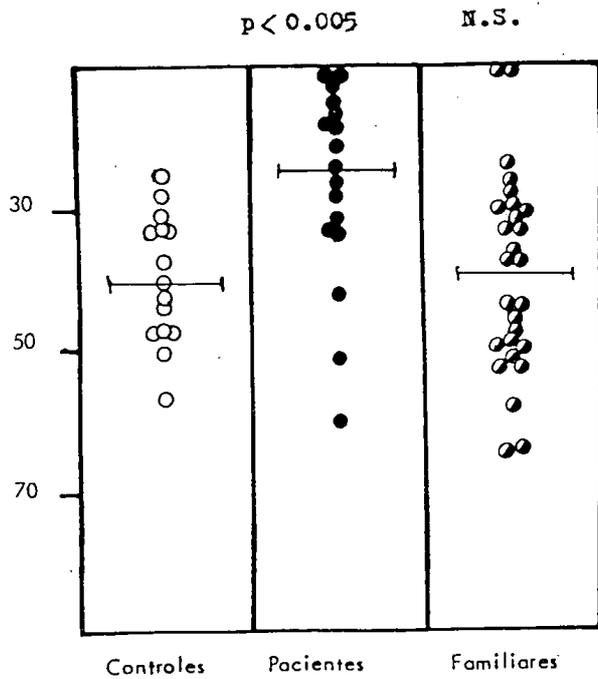


Fig. 5.—Porcentaje de supresión inducido por la concanavalina A sobre la síntesis de IgA por los linfocitos circulantes estimulados con el mitógeno Pokeweed (PWM). Cada símbolo representa un sujeto (ver métodos). Test chi-cuadrado.

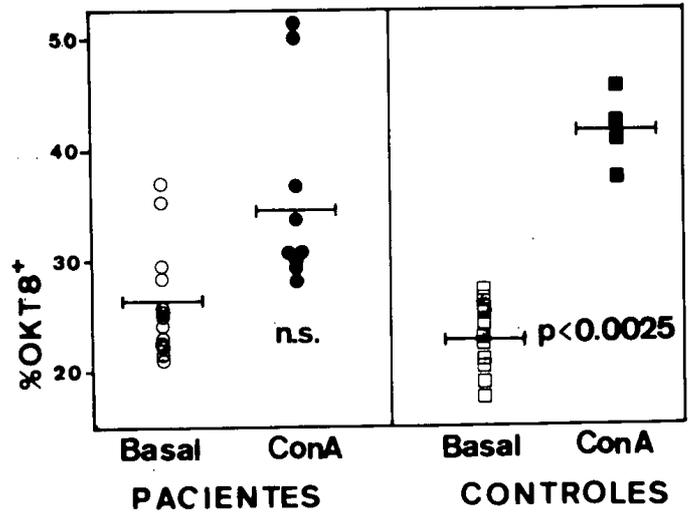


Fig. 7.—Porcentaje de células supresoras (células OKT8⁺) medidas por anticuerpos monoclonales antes y después de la estimulación mitogénica en cultivos de 7 días. Test chi-cuadrado.

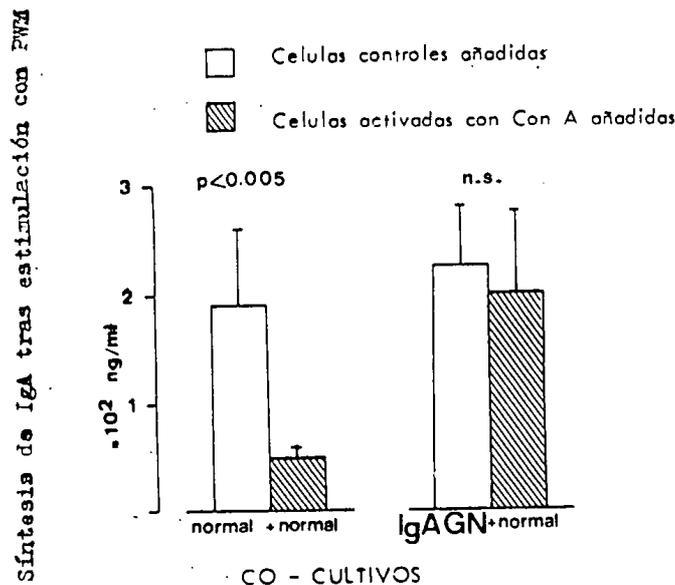


Fig. 6.—Efecto de co-cultivar células activadas con A de sujetos normales y pacientes de nefropatía IgA con linfocitos de sangre periférica alogénicos normales, sobre la síntesis de IgA inducida por PWM. Las células fueron dejadas en cultivo sin estimular durante 2 días (células controles) o estimuladas con 25 µg/ml. de Con A. Dos días después las células fueron repetidamente lavadas para eliminar toda la Con A y añadidas a linfocitos alogénicos frescos (1:1) en presencia de PWM. Siete días más tarde la secreción de inmunoglobulinas fue determinada. Los datos representan la media ± ESM de IgA de cuatro experiencias separadas. T de Student.

presentaron sólo una supresión moderada de la IgA. No hubo diferencias en los porcentajes de la supresión de la síntesis de IgG e IgM (datos no mostrados).

Para determinar si los linfocitos de los pacientes con nefropatía IgA eran capaces de expresar funciones de células supresoras sobre los linfocitos normales, des-

pués de la activación con la Con A, realizamos experimentos de co-cultivo. Los linfocitos normales estimulados con Con A (de sujetos controles) suprimieron notablemente la secreción de IgA de linfocitos alogénicos normales inducida por el PWM ($p < 0,005$) (Fig. 6). Por el contrario, los linfocitos de cuatro pacientes estimulados con Con A fueron incapaces de suprimir la síntesis de IgA de linfocitos alogénicos normales. De nuevo no se observó ninguna anomalía en la supresión de la síntesis de IgG e IgM.

Para observar los cambios en las subpoblaciones de células T durante la generación de células supresoras por la Con A, los pacientes fueron fenotipados con anticuerpos monoclonales, antes y después, del cultivo. Como se muestra en la figura 7 en el grupo control, hubo un aumento significativo en los porcentajes de las células OKT8⁺ al final del cultivo, mientras que en los pacientes el aumento fue marcadamente menos importante. Estos datos están de acuerdo con los estudios funcionales mostrados en las figuras 5 y 6.

Estudio de la función cooperadora de las células T

Con objeto de determinar si los trastornos de regulación observados eran consecuencia de un fallo en la activación de las células T o bien de la incapacidad de las células B para ser reguladas, se realizó un co-cultivo de linfocitos aislados B y T de pacientes y controles. La función de células T cooperadoras se estudió in vitro utilizando el mitógeno Pokeweed (PWM) co-cultivando células T y B. Como se observa en la figura 8, las células T de 12 pacientes eran significativamente más eficientes que las células T de 12 controles en la función cooperadora específica para la IgA sobre células B alogénicas de controles ($p < 0,025$). Resultados similares se obtuvieron cuando células T de pacientes y controles se co-

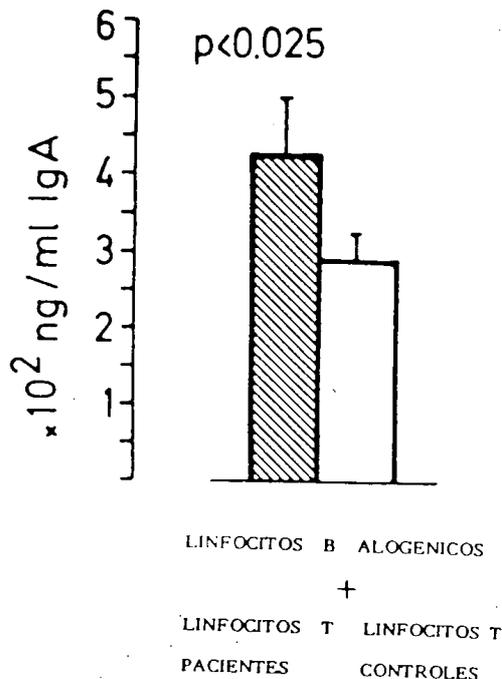


Fig. 8.—Síntesis de IgA en co-cultivos estimulados con POKEWEEED (PWM) de células T de pacientes con nefropatía IgA \square y linfocitos T de sujetos normales \square con linfocitos B alogénicos de controles (relación 1:1). Media \pm desviación standard. T de Student.

cultivaron con células B alogénicas de pacientes. Por tanto de acuerdo a este experimento los pacientes con nefropatía IgA presentan un aumento de la actividad de las células T cooperadoras específicas para la IgA en relación a las células T normales. Esto apoya la hipótesis de un trastorno primario de la actividad de las células cooperadoras como factor importante del desarrollo de la nefropatía IgA.

Estudios inmunológicos de familiares de pacientes con nefropatía IgA

Teniendo en cuenta que se han descrito casos familiares de nefropatía mesangial IgA y que algunos grupos han encontrado prevalencia de determinados antígenos del sistema HLA, fundamentalmente el BW35, decidimos conocer si algunas de las alteraciones inmunológicas encontradas en estos pacientes pudieran también aparecer en familiares de esos enfermos. Con ese motivo estudiamos 7 familias con un total de 26 miembros realizando los mismos estudios citados en métodos. En la figura 9 se observa la producción de IgA en controles, pacientes y familiares. Aunque no existió diferencia significativa entre estos últimos y los primeros la media fue superior, existiendo varios sujetos con cifras claramente superiores a la media más dos desviaciones standard de los controles.

En la tabla I se observan los porcentajes medios de las distintas subpoblaciones de linfocitos T. La media de células OKT3 + (T totales) fue superior a los controles pero no significativos. La media de los OKT4 + (T cooperado-

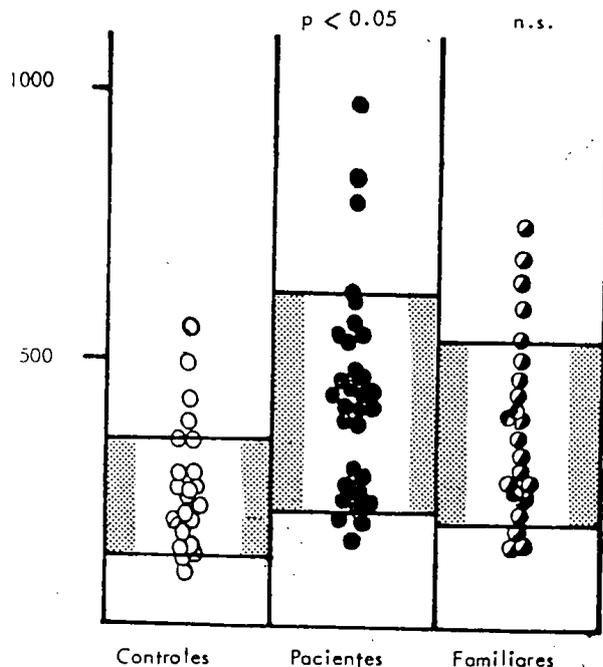


Fig. 9.—Producción de IgA en controles, pacientes y familiares por los linfocitos periféricos en presencia de PWM. La significación de pacientes y familiares se expresa en relación a los controles.

res) fue de $39,54 \pm 1,1$ significativamente superior a los controles $33,37 \pm 1,18$ ($p < 0,00125$) aunque algo inferior a los pacientes. No hubo diferencias significativas entre las células OKT8 + (T supresores) y la relación OKT4 +/OKT8 + entre familiares y controles.

En la figura 10 se observa el porcentaje de fijación del CS por los linfocitos al final del cultivo en presencia de PWM. La media del número de linfocitos formadores de IgA polimérica fue en los familiares claramente significati-

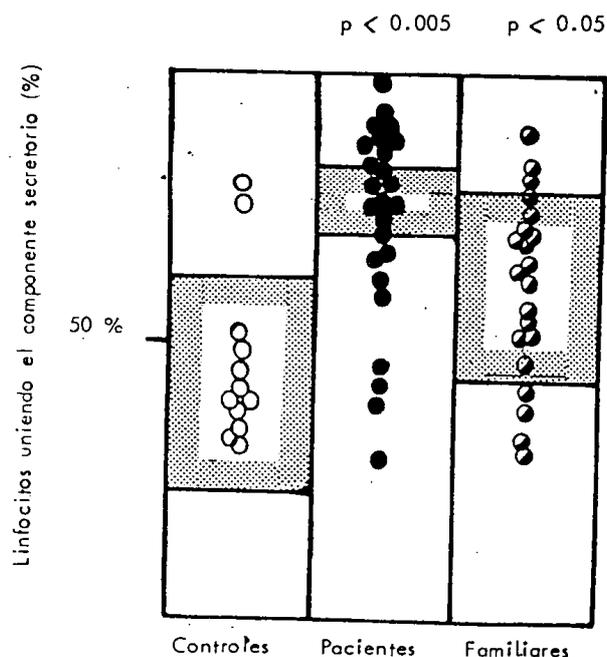


Fig. 10.—Porcentaje de linfocitos produciendo IgA polimérica al final del cultivo y en presencia de PWM. La producción de IgA polimérica se extrapola de la fijación al componente secretorio. Rectángulos en punteado igual media más 1 DS. La significación está calculada en relación a los controles.

va respecto a los controles. En la figura 5 se observa el porcentaje de supresión sobre la síntesis de IgA tras la estimulación con PWM y en presencia del 25 µg. de Con A/ml.

Más importante que el estudio en conjunto es el análisis individual de los datos. Así 11 de 26 familiares estudiados tenían un aumento de los T cooperadores OKT4 (por encima de la media de los controles más dos desviaciones standard). Asimismo, 8 de los 26 familiares tenían aumento de los T supresores (OKT8). Esto junto con la existencia de niveles persistentemente elevados de OKT4 en pacientes habla a favor de un trastorno primario de los linfocitos T cooperadores. La existencia de 8 familiares con aumento de los linfocitos T supresores versus 2 de 23 de los pacientes podría sugerir un intento compensador de los linfocitos supresores para evitar la excesiva producción de IgA con un ulterior agotamiento en el comienzo o en ciertas fases de la enfermedad.

Es interesante reseñar que en las 7 familias estudiadas siempre había uno de los padres que presentaban algunas de las alteraciones inmunológicas anteriormente comentadas. Del mismo modo no es infrecuente encontrar uno o más hermanos con alguna anomalía. Aunque no ha formado parte de este trabajo, es interesante hacer notar que ninguno de los parientes estudiados presentaban inmunocomplejos de IgA por dos técnicas distintas (células de Raji y /o inhibición de la reacción de una IgA con un suero IgM anti-IgA), ni tampoco de IgG. Determinar qué facilita la aparición de la nefritis es uno de grandes retos que plantea esta nefropatía.

DISCUSION

Los datos presentados en este trabajo demuestran: 1.º que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con nefropatía IgA estimulados con un mitógeno policlonal después de 7 días de cultivo producen cantidades de IgA, pero no IgG o IgM, significativamente más altas que los controles. 2.º la IgA producida por esos linfocitos presenta características bioquímicas de verdadera IgA polimérica. 3.º una relativa prevalencia de la población de células T cooperadoras sobre las células T supresoras. 4.º una disminución de la actividad de los linfocitos T supresores específicos para IgA y, por último, 5.º que alguna de estas anomalías se encuentran también en parientes sanos de estos enfermos lo que habla a favor de una cierta transmisión genética de esta enfermedad.

La naturaleza y el origen de la IgA depositada en el mesangio glomerular en pacientes con nefropatía IgA no había sido completamente dilucidada. Teniendo en cuenta que la hematuria macroscópica sigue a menudo a una infección del tracto respiratorio superior parecía probable que la fuente de esa IgA fueran las secreciones externas. Sin embargo, estudios previos no lograron demostrar la presencia de IgA secretoria a nivel renal^{41, 42}, aunque otros ocasionalmente la encontraron⁷. Dos trabajos re-

cientes han mostrado datos contradictorios sobre ese tema. Para unos la IgA depositada era fundamentalmente IgA₂⁴³, mientras que para otros era IgA₁⁴⁴. Nosotros, basados en la fijación específica del componente secretorio a las inmunoglobulinas conteniendo cadena J (IgA polimérica e IgM), mostramos que la IgA glomerular era polimérica en la mayoría de los pacientes^{15, 45}. Esta técnica había sido ya utilizada con éxito para estudiar células epiteliales intestinales y linfocitos B^{46, 47}. Nuestro hallazgo ha sido confirmado recientemente por otros autores siguiendo este mismo método⁴⁸.

Puesto que menos del 10 % de las células plasmáticas formadoras de IgA en la médula ósea son capaces de unir el CS⁴⁹, mientras que alrededor del 50 % de las células plasmáticas IgA en la mucosa intestinal y de los linfocitos periféricos estimulados por PWM lo unen^{30, 50}, se podría aceptar que los altos niveles de IgA polimérica, y la IgA polimérica localizada en el mesangio glomerular de esos pacientes, estén originados por los linfocitos con capacidad migratoria provenientes de las secreciones externas.

El aumento de la IgA polimérica en el suero de los pacientes con enfermedad de Berger, en relación a los controles sanos¹³, no puede ser a priori exclusivamente explicado por la alta producción de IgA polimérica por los linfocitos estimulados policlionalmente. Los bajos niveles de IgA polimérica encontrados en los sujetos normales se piensa que son debidos a su rápido y efectivo aclaramiento por el hígado, probablemente a través de los receptores para el CS de los hepatocitos⁵¹. Teóricamente, un defecto en el aclaramiento de la IgA por el hígado, como probablemente tienen los pacientes con cirrosis hepática alcohólica, en los que nosotros hemos observado niveles elevados de IgA polimérica³¹, podría contribuir a explicar los hallazgos en el suero de pacientes con enfermedad de Berger. De hecho, una retención de esa IgA se ha observado en ratas con ligadura de conductos biliares⁵² o con daño hepático⁵³. En un modelo de cirrosis crónica, desarrollado en nuestro laboratorio, el aclaramiento de los agregados de IgA inyectados fue significativamente más lento que en los ratones normales (observaciones no publicadas). Recientemente en otra enfermedad ligada a la IgA, como la dermatitis herpetiforme, en la cual casi constantemente existen depósitos de IgA en la piel, se ha demostrado una disminución de la función de los receptores para el Fc⁵⁴.

De acuerdo con nuestros hallazgos, es posible que los linfocitos originados de las secreciones externas produzcan una mayor cantidad de IgA polimérica tras una infección viral, tal como ocurre con los linfocitos in vitro estimulados policlionalmente. Esa IgA, formando parte de inmunocomplejos, podría teóricamente saturar los receptores para el CS (y probablemente Fc) de los hepatocitos permaneciendo más tiempo en la circulación y por tanto con mayor facilidad para depositarse en el glomérulo. En este contexto, recientemente se ha demostrado que, al menos en las ratas, los inmunocomplejos circulantes

conteniendo IgA polimérica son eliminados específicamente a través del hígado; y que los agregados de IgA son peor manejados por el sistema mononuclear fagocítico que los de IgG⁵⁵.

El papel inmunopatogénico de la IgA polimérica en la nefropatía IgA humana no está claro. En un modelo de nefropatía IgA experimental recientemente descrito, la presencia de inmunocomplejos conteniendo IgA polimérica fue crítica para el depósito de los inmunocomplejos y la inducción de lesiones histológicas de nefritis. Los inmunocomplejos formados in vitro o in vivo con IgA monomérica no provocaron nefritis²⁵. La presencia de inmunocomplejos conteniendo IgA polimérica en el suero y riñones de pacientes con enfermedad de Berger^{3,13}, síndrome de Schönlein-Henoch y cirrosis hepática alcohólica con depósitos de IgA a nivel renal^{31,45} sugiere que ése podría ser el caso también en el hombre. Además, una cierta mejoría clínica e histológica se ha observado coincidentalmente con la disminución de los niveles séricos de IgA polimérica en algunos pacientes con enfermedad de Berger tratados con difenilhidantoína^{15,16}.

La observación de un aumento de la IgA por la estimulación policlonal de linfocitos en pacientes con nefropatía IgA parece específica para esa inmunoglobulina puesto que no hubo cambios en la producción de IgG e IgM. Puesto que la respuesta in vitro de los linfocitos de sangre periférica al PWM requiere la participación activa de los linfocitos T cooperadores^{56,57}, esta respuesta aumentada podría representar a priori una anomalía de la función de los linfocitos B o de los linfocitos T cooperadores.

Los pacientes con nefropatía IgA, estudiados con anticuerpos monoclonales anticélulas T, presentan en sangre periférica unos porcentajes normales de linfocitos T totales con una prevalencia relativa de la población T cooperadora sobre la T supresora. La actividad funcional de las células T supresoras inducidas por la conavanalina A se encontró específicamente reducida para la IgA, pero no para la IgG e IgM en los dos ensayos de células supresoras empleadas en este trabajo. Estos hallazgos están de acuerdo con los de SAKAI y cols.⁵⁸ La aparente contradicción entre una población supresora normal expresada por marcadores y los estudios funcionales mostrando una disminución específica para la IgA de las células T supresoras podría ser explicado presumiblemente por los pocos clones de células T supresoras que intervendrían en la regulación de la IgA.

Los altos niveles de células OKT4⁺ (linfocitos cooperadores) constantemente encontrados en todos los pacientes con nefropatía IgA, el aumento de la actividad T cooperadora para la síntesis de la IgA, junto con el hallazgo no infrecuente de pacientes con una actividad T supresora normal para la IgA, sugiere que la afectación de las células cooperadoras podría ser la alteración primaria y las anomalías de los supresores de IgA su consecuencia. Es posible que los inmunocomplejos de IgA recientemente demostrados en el suero de estos pacientes¹⁷ podrían

servir, tal como hacen los inmunocomplejos de IgG⁵⁹, para modular las células supresoras.

Considerando la elevada producción de IgA por los linfocitos después de su estimulación policlonal in vitro, tal como hemos demostrado en estos pacientes, y el aumento de los linfocitos portadores de IgA en estos pacientes²³, no podemos descartar la existencia de anomalías de los linfocitos B intrínsecamente.

Teniendo en cuenta la existencia de nefropatías IgA de carácter familiar y la asociación ocasional de esta nefritis con determinados antígenos del sistema HLA⁹, el estudio de los parientes cercanos de estos pacientes constituía un grupo interesante para seguir la aparición cronológica de las anomalías inmunológicas, tal como ocurre en los pacientes lúpicos³⁷. De hecho en algunos de esos familiares otros autores habían encontrado un aumento de los linfocitos periféricos portadores de IgA, y de un factor antinuclear que reacciona en frío. En este sentido las 7 familias estudiadas por nosotros aportan datos muy interesantes. La existencia de un cierto desbalance en los linfocitos T con una prevalencia de los linfocitos T cooperadores, junto con un aumento en la producción de IgA polimérica in vitro, hallado en algunos familiares sanos de estos pacientes, está a favor de que junto a los genes del sistema HLA, o independientemente de ellos, otros genes controlando la respuesta inmune, independientemente del antígeno, son necesarios para la aparición de la enfermedad.

En resumen, se concluye que los linfocitos de sangre periférica de pacientes con nefropatía IgA estimulados policlonalmente in vitro producen específicamente una gran cantidad de IgA polimérica, sugiriendo que una situación similar podría ocurrir in vitro después de un estímulo viral u otro. Nuestros resultados están a favor de una anomalía en la función de los linfocitos T cooperadores específicos de la IgA seguida de una pérdida secundaria de la actividad supresora. Estas anomalías en la inmunorregulación podrían contribuir a la patogenia de la nefropatía IgA.

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a una ayuda del FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias). La doctora Blasco es becaria de la Fundación Jiménez Díaz. El doctor Sancho es becario del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

BIBLIOGRAFIA

1. BERGER, J., y HINGLAIS, N.: «Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG». *J. Urol. Nephrol.*, 74: 694, 1968.
2. BERGER, J.: «IgA glomerular deposits in renal disease». *Transplant. Proc.*, 1: 939, 1969.
3. EGIDO, J.; SANCHO, J.; MAMPASO, F.; LOPEZ TRASCASA, M.; SANCHEZ CRESPO, M.; BLASCO, R., y FERNANDO, L.: «A possible common pathogenesis of the mesangial IgA glomerulonephritis in patients with Berger's disease and Schönlein-Henoch syndrome». *Proc. Eur. Dial. Transplant. Ass.*, 17: 660, 1980.
4. DROZ, zd.: «Natural history of primary glomerulonephritis with mesangial deposits of IgA». *Contrib. Nephrol.*, 2: 150, 1976.
5. BERGER, J.; YANEVA, H., y CROSNIER, J.: «La glomerulonephrite à dépôts mesangiaux d'IgA: une cause fréquente d'insuffisance rénale terminale». *Nouv. Presse Méd.*, 9: 219, 1980.
6. HYMAN, L. R.; WAGNILD, J. P.; BEIRNE, G. J., y BURKHOLDER,

- P. M.: «Inmunoglobulin A distribution in glomerular disease. Analysis of immunofluorescence localization and pathogenic significance». *Kidney Int.*, 3: 397, 1973.
7. McCOY, R. D.; ABRAMOWSKY, C. R., y TISHER, C. C.: «IgA nephropathy». *Am. J. Pathol.*, 76: 123, 1974.
 8. ZIMMERMAN, S. W., y BURKHOLDER, P. M.: «Immunoglobulin A nephropathy». *Arch. Intern. Med.*, 135: 1217, 1975.
 9. EGIDO, J.; RIVERA, F.; SANCHO, J.; MORENO, M.; KREISLER, M., y HERNANDO, L.: «Estudio del sistema HLA y factores de riesgo para la insuficiencia renal en la glomerulonefritis mesangial IgA». *Nefrología*, 1: 21, 1981.
 10. CLARKSON, A. R.; SEYMOUR, A. E.; WOODROFFE, A. J.; MCKENZIE, P. E.; CHAN, Y. L., y WOOTON, A. M.: «Controlled trial of phenytoin therapy in IgA nephropathy». *Clin. Nephrol.*, 12: 215, 1980.
 11. CORDONNIER, D.; VIALTEL, P.; CHENAIS, F.; GROSLAMBERT, P.; BORAGNET, M. C., y MARTIN, H.: «Augmentation du taux des IgA sériques dans les glomerulonephrites avec dépôts d'IgA dans le mesangium». *Nouv. Presse Med.*, 35: 2264, 1974.
 12. BERGER, J.; YANEVA, H.; NABARRA, B., y BARBANEL, C.: «Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation». *Kidney Int.*, 7: 232, 1975.
 13. LAGRUE, G.; HIRBERG, G.; FOURNIE, M., y INTRATOR, L.: «Glomerulonephritis à dépôts d'IgA. Étude des IgA sériques». *J. Urol. Nephrol.*, 80: 385, 1974.
 14. LOPEZ TRASCASA, M.; EGIDO, J.; SANCHO, J., y HERNANDO, L.: «Evidence of high polymeric IgA in serum of patients with Berger's disease and its modification with phenytoin treatment». *Proc. Eur. Dial. Transplant. Asso.*, 16: 513, 1979.
 15. LOPEZ TRASCASA, M.; EGIDO, J.; SANCHO, J., y HERNANDO, L.: «IgA glomerulonephritis (Berger's disease): evidence of high serum levels of polymeric IgA». *Clin. Exp. Immunol.*, 42: 247, 1980.
 16. EGIDO, J.; SANCHO, J.; LOPEZ TRASCASA, M.; SANCHEZ CRESPO, M.; RIVERA, F.; ALVAREZ, V.; BARAT, A., y HERNANDO, L.: «New therapeutic approach to IgA mesangial glomerulonephritis (Berger's disease)». In: *Advances in Nephrology*. Pavone-Macaluso (ed.). New York, Plenum Press, pp. 195-206, 1981.
 17. EGIDO, J.; SANCHEZ CRESPO, M.; SANCHO, J., y HERNANDO, L.: «Phenytoin in the treatment of IgA mesangial glomerulonephritis. Berger's disease». *Clin. Nephrol.*, 15: 164, 1981.
 18. EGIDO, J.; SANCHO, J.; RIVERA, F., y FERNANDO, L.: «Role of IgA and IgG immune complexes in IgA nephropathy». *Nephron*. (en prensa).
 19. EGIDO, J.; SANCHO, J.; LORENTE, F., y FONTAN, G.: «Inhibition of neutrophil migration by serum IgA from patients with IgA nephropathy». *Clin. Exp. Immunol.*, 49: 709, 1982.
 20. EGIDO, J.; SANCHO, J.; BLASCO, R., y FERNANDO, L.: «Immunopathogenic aspects of IgA nephropathy». In: *Advances in Nephrology*, vol. 12 (Hamburger, Crosnier, Grünfeld, Maxwell, eds.). Year Book, Chicago, 103-107, 1983.
 21. LOWANCE, D. C.; MULLINS, J. D., y McPAHUL, J. J.: «IgA-associated glomerulonephritis». *Int. Rev. Pathol.*, 17: 143, 1977.
 22. McPAHUL, J. J.: «IgA associated glomerulonephritis». *Ann. Rev. Med.*, 28: 37, 1977.
 23. NOMOTO, Y.; SAKAI, H., y ARIMORI, S.: «Increase of IgA-bearing lymphocytes in peripheral blood from patients with IgA nephropathy». *Amer. J. Clin. Pathol.*, 71: 158, 1979.
 24. ALNO-NAKHAL, M.; SAINT ANDRE, J. P.; HOUSSIN, A., y HUREZ, D.: «Augmentation u non du nombre de lymphocytes B porteurs d'IgA dans la maladie de Berger». *Nouv. Presse Med.*, 10: 2583, 1981.
 25. RIFAI, A.; SMALL, P. A.; PERRY, J.; TEAGUE, C., y AYOUB, E. M.: «Experimental IgA nephropathy». *J. Exp. Med.*, 150: 1161, 1979.
 26. BÖYUM, A.: «A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1 g gravity field». *Scand. J. Clin. Invest. (Suppl.)*, 21: 51, 1968.
 27. UNDERDOWN, B. J.; DE ROSE, J.; KOCZEKAN, K.; SOCKEN, D., y WEICKER, J.: «Isolation of human secretory component by affinity chromatography on IgM-Sepharose». *Immunochemistry*, 14: 111, 1977.
 28. BRANDTZAEG, P.: «Characteristics of SC-IgA complexes formed in vitro». *Adv. Exp. Med. Biol.*, 45: 87, 1974.
 29. CRAGO, S. J., y MESTECKY, J.: «Secretory component: Interactions with intracellular and surface immunoglobulins of human lymphoid cells». *J. Immunol.*, 122: 906, 1979.
 30. SANCHO, J.; EGIDO, J.; SANCHEZ CRESPO, M., y BLASCO, R.: «Detection of monomeric and polymeric IgA containing immune complexes in serum and kidney from patients with alcoholic liver disease». *Clin. Exp. Immunol.*, 47: 327, 1982.
 31. EGIDO, J.; BLASCO, R.; SANCHO, J.; LOZANO, L., y SANCHEZ CRESPO, M.: «Increase rates of polymeric IgA synthesis by circulating lymphoid cells in IgA mesangial glomerulonephritis». *Clin. Exp. Immunol.*, 47: 309-316, 1982.
 32. KUTTEH, W. H.; KOOPMAN, W. J.; CONLEY, M. E.; EGAN, M. L., y MESTECKY, J.: «Production of predominantly polymeric IgA by human peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with mitogens». *J. Exp. Med.*, 152: 1424, 1980.
 33. McCOUNAHEY, P. J., y DIXON, F. J.: «A method of trace iodination of proteins for immunological studies». *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 29: 185, 1976.
 34. REINHERZ, E. L.; KUNG, P. C.; GOLDSTEIN, G., y SCHLOSSMAN, S. F.: «Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody». *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 4062, 1979.
 35. REINHERZ, E. L.; KUNG, P. C.; GOLDSTEIN, G., y SCHLOSSMAN, S. F.: «A monoclonal antibody reactive with the human cutotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantisera termed TH2». *J. Immunol.*, 124: 1301, 1980.
 36. EGIDO, J.; BLASCO, R.; SANCHO, J., y LOZANO, L.: «T cell disfunctions in IgA nephropathy. Specific abnormalities in the regulation of IgA synthesis». *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 26: 201-213, 1983.
 37. MILLER, K. B., y SCHWARTZ, R. S.: «Familial abnormalities of suppressor cell function in systemic lupus erythematosus». *N. Engl. J. Med.*, 301: 803, 1979.
 38. FAUCI, A. S.; STEINBERG, A. D.; HAYNES, B. F., y WHALEN, G.: «Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus». *J. Immunol.*, 121: 1473, 1978.
 39. BENTWICK, F.; DOUGLAS, S. D.; KUTELSKY, E. S., y KUNKIEL, H. G.: «Sheep red cell binding to human lymphocytes treated with neuramidase: Enhancement of T cell binding and identification of a subpopulation of B cells». *J. Exp. Med.*, 137: 1532, 1973.
 40. BENVENISTE, J., y BRUNEAU, C.: «Detection and characterization of circulating immune complexes by ultracentrifugation. I. Technical aspects». *J. Immunol. Methods*, 26: 99, 1979.
 41. DOBRIN, R. S.; KNUDSON, F. B., y MICHAEL, A. F.: «The secretory immune system and renal disease». *Clin. Exp. Immunol.*, 21: 318, 1975.
 42. WHITWORTH, J. A.; LEIBOWITZ, S.; KENNEDY, M. C.; CAMERON, J. S., y CHANTLER, C.: «IgA and glomerular disease». *Clin. Nephrol.*, 5: 33, 1979.
 43. ANDRE, C.; BERTHOUX, F. C.; ANDRE, F.; GILLON, J.; GENIN, C., y SABATIER, J. CH.: «Prevalence of IgA₂ deposits in IgA nephropathies: a clue to their pathogenesis». *M. Engl. J. Med.*, 303: 1343, 1980.
 44. CONLEY, M. E.; COOPER, M. D., y MICHAEL, A. F.: «Selective deposition of immunoglobulin A₁ in immunoglobulin A nephropathy. Anaphylactoid purpura nephritis and systemic lupus erythematosus». *J. Clin. Invest.*, 66: 1432, 1980.
 45. EGIDO, J.; LOPEZ TRASCASA, M.; MAMPASO, F.; SANCHO, J., y HERNANDO, L.: «Polymeric IgA glomerulonephritis. 4th International Congress of Immunology». Abs. 18-5-09. Paris, 1980.
 46. BRANDTZAEG, P.: «Studies on J chain and binding site for secretory component in circulating human B cells. II. The cytoplasm». *Clin. Exp. Immunol.*, 25: 59, 1976.
 47. BRANDTZAEG, P.: «Polymeric IgA is complexed with secretory component (SC) on the surface human intestinal epithelial cells». *Scand. J. Immunol.*, 8: 39, 1978.
 48. BENE, M. C.; FAURE, G., y DUHEILLE, J.: «Demonstration of the polymeric character of IgA deposits in tissue sections from patients with IgA nephropathies or anaphylactoid purpura. IV International Congress of Immunology. Abst. 18-5-06. Paris, 1980.
 49. HIJMAN, V.; SCHUIT, H. R. E., y HULSING-HESSELIN, K. E.: «An immunofluorescent study on intracellular immunoglobulins in human bone marrow cells». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 177: 290, 1971.
 50. BRANDTZAEG, P.: «Two types of IgA immunocytes in man». *Nature*, 243: 142, 1973.
 51. ORLANS, E.; PEPPARD, J.; FRY, J. F.; HINTON, R. H., y MULLOCK, B. M.: «Secretory component as the receptor for IgA on rat hepatocytes». *J. Exp. Med.*, 150: 1577, 1979.
 52. ORLANS, E.; PEPPARD, J.; REYNOLDS, J., y HALL, J. G.: «Rapid active transport of IgA from blood to bile in rats». *J. Exp. Med.*, 147: 588, 1978.
 53. KAARTINEN, M.: «Liver damage in mice and rats causes tenfold increase of blood immunoglobulin A». *Scand. J. Immunol.*, 7: 519, 1978.
 54. LAWLEY, T. J.: «Reticuloendothelial system function, p. 863. In Katz, S. I., moderator. Dermatitis herpetiforme: the skin and the gut. *Ann. Intern. Med.*, 93: 857, 1980.
 55. EGIDO, J.; SANCHO, J., y RIVERA, F.: «Handling of soluble IgA aggregates by the mononuclear phagocytic system. A comparison with IgG aggregates». *Immunology*, 46: 1, 1982.
 56. KEIGHTLEY, R. C.; COOPER, M. D., y LWTON, A. R.: «The T cell dependence of B cell differentiation induced by Pokeweed mitogen». *J. Immunol.*, 117: 1538, 1976.
 57. SAXON, A.; STEREMS, R. H., y ASHMAN, R. F.: «Regulation of immunoglobulin production in human peripheral blood leukocytes T cellular interactions». *J. Immunol.*, 118: 1872, 1977.
 58. SAKAI, H.; NOMOTOM, Y.; ARIMORI, S.; KOMORI, K.; INOUE, H., y TSUJI, K.: «Increase of IgA bearing peripheral blood lymphocytes in families of patients with IgA nephropathy». *Am. J. Clin. Pathol.*, 78: 452, 1979.
 59. MORETTA, L.; MINGARI, M. C.; MORETTA, A., y COOPER, M. D.: «Human T lymphocyte subpopulations. Studies of the mechanism by which T cells bearing Fc receptors for IgG suppress T-dependent B cell differentiation induced by Pokeweed mitogen». *J. Immunol.*, 122: 984, 1979.