

# Análisis morfológico e inmunocitoquímico en la nefrotoxicidad por ciclosporina mediante citología aspirativa del injerto en el trasplante renal

J. M. González-Posada, M. C. García Castro\*, A. Torres, M. Losada, V. Lorenzo, D. Hernández, M. Ravina\*, E. Salido\* y B. Maceira

Servicio de Nefrología y\* Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Canarias. Tenerife.

## RESUMEN

Se estudiaron mediante citología aspirativa del injerto (CAI) 34 episodios de aumento de la creatinina plasmática en 23 pacientes con trasplante renal y en tratamiento con ciclosporina. En todos los casos se llegó a un diagnóstico final de nefrotoxicidad por ciclosporina (Tox Cs A) ( $n = 16$ ) o rechazo agudo (RA) ( $n = 18$ ) por otros métodos, incluida biopsia del injerto. Otros 18 pacientes con función renal normal y estable se utilizaron como controles.

Se estudió en las CAI, mediante análisis morfológico, el porcentaje de blastos, el incremento corregido (IC) y el índice tubular (IT), y con anticuerpos monoclonales la relación T8/T4 y la expresión del HLA-DR en las células tubulares del injerto. También se analizó la relación T8/T4 en sangre periférica.

Los casos Tox Cs A se diferenciaron de los RA por presentar datos significativamente inferiores de inmunoactivación tanto en el estudio morfológico (porcentaje de blastos e IC:  $0,2 \pm 0,4$  vs  $1,2 \pm 1,1$ ,  $p < 0,01$ , y  $1,2 \pm 0,7$  vs  $3,8 \pm 1,7$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) como en el inmunocitoquímico (relación T8/T4 y expresión del DR en células tubulares:  $1,1 \pm 0,4$  vs  $2,1 \pm 1,1$ ,  $p < 0,01$ , y  $2/16$  vs  $12/18$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). En el grupo de Tox por Cs A tan sólo tres pacientes presentaron algún dato de inmunoactivación; los tres presentaron blastos, dos de ellos expresaron el DR y uno presentó una relación T8/T4 mayor de 1,5; ninguno tuvo un IC  $> 3$ . Los dos con expresión del DR sufrieron un rechazo dos semanas después de reducir la dosis de Cs A. En el otro grupo, 14 pacientes con RA presentaron un IC  $> 3$ , 13 presentaban blastos, 12 una relación T8/T4  $> 1,5$  y 12 expresaron el DR. Todos los casos presentaron algún dato de inmunoactivación y sólo dos presentaron menos de dos datos.

El IT y la relación T8/T4 en sangre periférica no mostró diferencias significativas entre los dos grupos.

Concluimos que el estudio morfológico e inmunocitoquímico de las muestras obtenidas por CAI puede ser una importante ayuda diagnóstica para diferenciar la nefrotoxicidad por Cs A y el rechazo agudo.

**Palabras clave:** *Trasplante renal. Nefrotoxicidad por ciclosporina. Rechazo agudo. Citología aspirativa. Inmunocitoquímica.*

## MORPHOLOGIC AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY IN THE CYCLOSPORIN NEPHROTOXICITY BY ASPIRATION CYTOLOGY OF THE GRAFT IN RENAL TRANSPLANTATION

### SUMMARY

We have performed 34 transplant aspiration cytologies (TAC) in 23 renal allograft recipients under cyclosporin therapy, who suffered an increase in plasma creatinine levels. A final diagnosis of cyclosporin A toxicity (Cs A Tox) ( $n = 16$ ) or acute rejection (AR) ( $n = 18$ ) was reached by other methods including core biopsy.

We have analyzed the presence of blast cells, the corrected increment (CI), and the tubular index (TI) in the morphologic study of the aspirates, and the T8/T4 ratio and HLA-DR expression on tubular cells by using monoclonal antibodies. The T8/T4 ratio in peripheral blood was also determined.

The Cs A Tox group showed a lower immunologic activity in the aspirates than the AR group. In the morphologic study a significantly lower % of blast cells and CI was seen ( $0.2 \pm 0.4$  vs  $1.2 \pm 1.6$ ;  $p < 0.01$  and  $1.2 \pm 0.7$  vs  $3.8 \pm 1.7$ ;  $p < 0.001$  respectively). In the immunocytochemical analysis a significantly lower T8/T4 ratio and frequency of DR expression on tubular cell was found ( $1.1 \pm 0.4$  vs  $2.1 \pm 1.1$ ;  $p < 0.01$  and  $2/16$  vs  $12/18$ ;  $p < 0.05$  respectively). Only 3 cases in the Cs A Tox group showed signs of immunologic activity; they showed blast cells in the aspirates, and in two of them the tubular cells expressed DR antigens. One of them showed a T8/T4 ratio  $> 1.5$ , but none of them showed a CI above 3. The two cases with DR expressions underwent acute rejection 2 weeks after tapering cyclosporin dose. On the other hand, 14 cases of the AR group showed a CI higher than 3, 13 had blast cells in the aspirates, 12 had a T8/T4 ratio  $> 1.5$ , and 12 expressed the DR. None of them showed less than two sign of immunologic activation. The TI and the T8/T4 ratio in peripheral blood showed no differences between the groups.

We conclude that morphologic and immunocytological analysis of the allograft aspirates allows the differential diagnosis between cyclosporin A toxicity and acute rejection.

**Key words:** Renal transplantation. Cyclosporin A toxicity. Acute rejection. Transplant aspiration cytology. Immunocytochemistry.

### Introducción

El diagnóstico diferencial entre nefrotoxicidad por ciclosporina (Cs A) y rechazo agudo representa un serio problema en el trasplante renal. Los signos clínicos y los métodos no invasivos son poco específicos, mientras que la biopsia del injerto, además de los riesgos que conlleva, no siempre permite un diagnóstico adecuado de nefrotoxicidad<sup>1-3</sup>. Si bien unos niveles altos de Cs A en sangre son sugerentes de nefrotoxicidad y unos niveles bajos favorecen el diagnóstico de rechazo<sup>4,5</sup>, la susceptibilidad individual del paciente es variable, pudiendo además coexistir niveles altos con un episodio de rechazo<sup>6</sup>. La citología aspirativa del injerto (CAI) es un método no traumático para obtener muestras del injerto, cuyo estudio morfológico e inmunocitoquímico puede ofrecer un diagnóstico adecuado<sup>7-9</sup>.

En el presente trabajo hemos estudiado los cambios morfológicos e inmunocitoquímicos de 34 muestras obtenidas mediante CAI en 23 pacientes con trasplante re-

nal de cadáver que sufrieron un incremento de las cifras de creatinina plasmática, con la intención de conocer su utilidad en el diagnóstico diferencial entre nefrotoxicidad por ciclosporina y rechazo agudo.

### Material y métodos

**Pacientes:** Hemos estudiado retrospectivamente 34 citologías aspirativas del injerto en 23 pacientes con trasplante renal del cadáver, que presentaron un incremento de la creatinina plasmática de más de un 30 % sobre el valor previo. En todos los casos se llegó a un diagnóstico final por otros métodos convencionales independientes del resultado de la CAI. En 18 casos el diagnóstico fue de rechazo agudo, comprobado mediante biopsia percutánea del injerto. En 16 casos se diagnosticó de nefrotoxicidad por Cs A tras normalización de la creatinina plasmática al reducir la dosis de Cs A<sup>10</sup>. Cuatro casos de nefrotoxicidad por Cs A presentaban biopsia del

injerto normal y uno de ellos los datos morfológicos característicos de vasculopatía por Cs A<sup>11</sup>. En ninguno de los pacientes con toxicidad por Cs A se incrementó la inmunosupresión basal. Un grupo de 18 pacientes con función renal normal (creatinina plasmática <1,5 mg/dl), a los que se les realizó una CAI en el momento del alta y que no sufrieron ninguna alteración de la función del injerto en las dos semanas posteriores, sirvieron como grupo control.

Todos los pacientes habían recibido un trasplante renal de cadáver con prueba cruzada negativa. El tratamiento inmunosupresor de inducción consistió en globulina antilinfocítica (GAL), 10 mg/kg/día; prednisona, 20 mg/día, y azatioprina, 25 mg/día. Al quinto día, o más tarde si el paciente estaba en oligoanuria —pero nunca más de catorce días—, la GAL se suspendía, asociándose Cs A a dosis de 8 mg/kg/día. La Cs A se reducía a 6 mg/kg/día a la semana, incrementándose la dosis de azatioprina a 50-75 mg/día<sup>12</sup>. Posteriormente la dosis de Cs A se ajustó según los niveles en sangre. Todos recibían Cs A desde al menos una semana antes de realizar la CAI.

En la tabla I se representan la edad, sexo, tiempo post-trasplante en que se realizó la CAI, dosis y niveles de Cs A y otros datos clínicos de interés de los tres grupos. Es importante destacar que el grupo considerado como control presentaba unas dosis más altas de Cs A y consecuentemente unos niveles más altos de dicha droga al realizarse las CAI más precozmente que los otros dos grupos (en el momento del alta).

**Citología aspirativa del injerto:** Las CAI se realizaron siguiendo la técnica de Hayry y Von Willebrand<sup>7,9</sup>. Tras localizar por palpación el injerto, se esteriliza la zona y sin anestesia local se punciona el injerto en dos zonas diferentes mediante una aguja espinal de 25-G. Posteriormente la aguja se conecta a una jeringa de 20 cc con 3 de medio de cultivo celular (HAM, con heparina y albúmina humana), la cual está colocada sobre una pistola de aspiración (Cameco, Inc., Suecia). Tras breves segundos de aspiración se consiguen 10-20 µl de material, el cual es colocado en dos tubos estériles. Simultáneamente se extrae una muestra de sangre periférica en el mismo medio de cultivo para valorar la posible contamina-

ción hemática en la punción del injerto<sup>7,9</sup>. Se separan dos portas para estudio morfológico y 6-10 para estudio inmunocitoquímico en una centrífuga.

**Estudio morfológico:** Las dos muestras separadas para este fin se tiñeron de forma convencional con May-Grunwald-Giemsa. En ellas se analizó la naturaleza de las células inflamatorias que infiltran el injerto, así como los cambios morfológicos en las células tubularers. Se valoraron los siguientes parámetros: 1) El incremento corregido (IC), que es el incremento de células inflamatorias obtenidas del injerto frente a la muestra de sangre tomada simultáneamente multiplicado por un factor de corrección para cada tipo de células (linfocitos, blastos, macrófagos, etc.)<sup>7,8</sup>. 2) El porcentaje de blastos por cada 100 células inflamatorias de la CAI. 3) El índice tubular (IT) graduado de I a IV según las alteraciones de las células tubulares (I = normal, II = edema, III = edema y vacuolización, IV = necrosis). En la vacuolización se consideró si las vacuolas eran grandes o pequeñas e isométricas<sup>7,9</sup>. En todos los casos se apreciaron más de siete células tubulares por cada 100 células inflamatorias, criterio imprescindible para considerar las muestras válidas<sup>7,9</sup> (figs. 1 y 2).

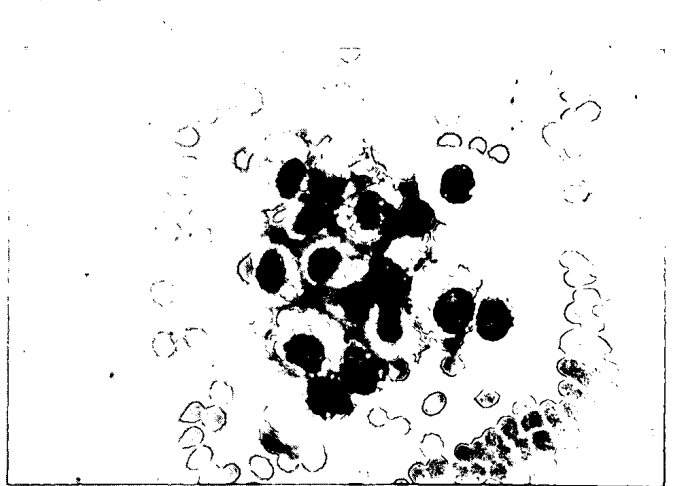


Fig. 1.—Acúmulo de células tubulares del injerto de una CAI representativa, mostrando la microvacuolización isométrica característica de la nefrotoxicidad por ciclosporina. (Tinción de May-Grunwald-Giemsa.)

**Tabla I.** Datos clínicos de los tres grupos estudiados

	Edad	Sexo V/H	Tiempo postx.	Dosis Cs A mg/kg/día	Niveles Cs A *	Retx.	H <sub>3</sub>
Tox Cs A (n = 16)	32 ± 8	12/4	94 ± 114	6,3 ± 2,2	547 ± 290	6/16	1/16
RA (n = 18)	36 ± 11	11/7	114 ± 112	4,9 ± 2,2	295 ± 190	3/18	1/18
Control (n = 18)	35 ± 12	12/6	21 ± 7	8,1 ± 1	817 ± 217	2/18	2/18

Tox Cs A: Nefrotoxicidad por Cs A. RA: Rechazo agudo. Retx: Retrasplantes. H<sub>3</sub>: Ac. linfocitotóxicos contra >75% d del panel. \*Mediante TDX (µg/ml).

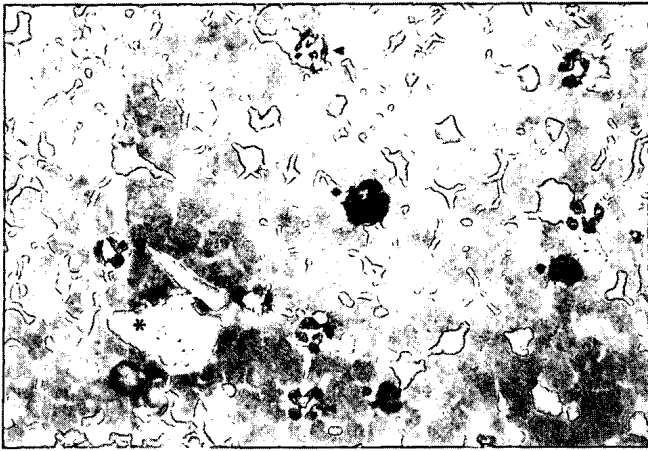


Fig. 2.—Células inflamatorias en una CAI representativa de un paciente con rechazo agudo. (\*) blasto. (●) linfocitos. (■) polimorfonucleares. (\*) Célula endotelial. (Tinción de May-Grunwald-Giemsa.)

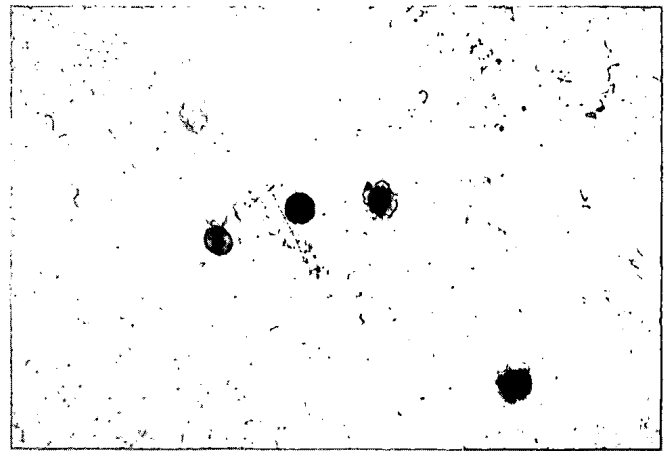


Fig. 3.—Linfocitos CD8 (+) de una CAI representativa mostrando un anillo citoplasmático inmunoteñido. (Estudio inmunocitoquímico, técnica fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina antiCD8. Sobretinción con hematoxilina de Harris.)

**Estudio inmunocitoquímico:** Los citocentrifugados se fijaron en acetona o paraformaldehído durante diez o cinco minutos, respectivamente. Después se lavaron con PBS a pH 7,4 y se incubaron durante la noche con anticuerpos monoclonales de ratón contra los antígenos de superficie CD4, CD8 y DR (Dako KT4, OKT8 y HLA-DR), diluido a 1:20, 1:100 y 1:50, respectivamente. Tras lavar con PBS las muestras se incubaron nuevamente con una inmunoglobulina de conejo antirratón por una hora, y posteriormente, tras nuevo lavado con el complejo fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina (Dako APAAP kit system), otra hora. Tras lavar con buffer tris-salino, las preparaciones son incubadas en una solución sustrato para la fosfatasa alcalina, que contiene naftol MX y Fast Red como cromógeno, durante veinte minutos. Posteriormente las muestras se sobretñieron con hematoxilina de Harris durante quince minutos.

El conteo de células marcadas con el anticuerpo monoclonal fue realizado sin conocer el diagnóstico final del paciente. Se contó el porcentaje de células inmunoteñidas (fig. 3) en un mínimo de 100 linfocitos, valorándose el cociente T8/T4. La expresión del DR en las células tubulares fue considerada positiva cuando dichas células se tiñeron con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR (fig. 4).

Igualmente se valoró la relación T8/T4 en sangre periférica y su correlación con las muestras de la CAI.

### Criterios y grados de inmunoadactivación

En el estudio morfológico, la diferencia numérica de cada tipo de células obtenidas del injerto menos las obtenidas en sangre periférica indica la concentración de estas células que infiltran el trasplante. Pero no sólo es importante la cantidad de células, sino el tipo de las mismas. La relevancia de cada tipo de células como signo

de inmunoadactivación ha sido empíricamente determinada por el grupo de Finlandia<sup>13,14</sup>. En estudios preliminares de nuestro grupo, un IC superior a 3, y la presencia de blastos en los aspirados, fue siempre indicativo de rechazo<sup>15</sup>.

Por otro lado, en el estudio con anticuerpos monoclonales, la expresión del DR en las células tubulares del injerto (que normalmente no lo expresan) y una prevalencia de los linfocitos T que expresan el fenotipo CD8 sobre los que expresan el fenotipo CD4 se ha observado en los aspirados y biopsias de pacientes con rechazo agudo<sup>16,17</sup>. Una relación T8/T4 superior a 1,5 ha tenido un valor predictivo positivo del 91 % para el diagnóstico de rechazo en nuestra experiencia previa<sup>18</sup>.

En base a lo anterior hemos considerado cuatro grados de inmunoadactivación (I-IV), según los pacientes presentaran uno, dos, tres o cuatro criterios de inmunoadti-

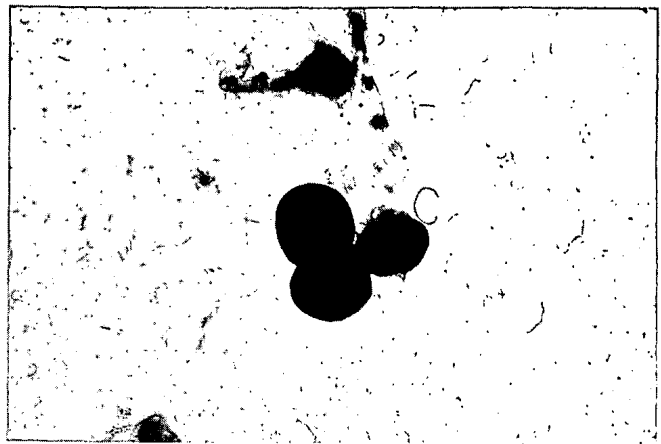


Fig. 4.—Inmunotinción positiva antiHLA-DR en tres células tubulares de una CAI representativa en un paciente con rechazo agudo. (Estudio inmunocitoquímico, técnica fosfatasa alcalina antifosfatasa alcalina antiHLA-DR. Sobretinción con hematoxilina de Harris.)

vacación (presencia de blastos,  $IC > 3$ ,  $T8/T4 > 1,5$  o expresión del DR en las células tubulares del injerto).

**Método estadístico:** Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA + prueba de Scheffé) para la comparación de medias y el test exacto de Fisher.

## Resultados

**Estudio morfológico:** Los casos en que se llegó a un diagnóstico final de nefrotoxicidad presentaron un incremento corregido (IC) significativamente inferior a aquellos con rechazo agudo. Ningún caso con nefrotoxicidad presentó un IC superior a 2,5; en el otro extremo, todos los casos de rechazo agudo, a excepción de cuatro, presentaron un IC superior a 3. El porcentaje de blastos fue también significativamente inferior en el grupo de nefrotoxicidad. En 13 de los 18 casos de rechazo agudo (72 %) se apreció en la CAI la presencia de blastos, mientras que sólo tres de los 16 casos de nefrotoxicidad (19 %) presentaron dichas células en los aspirados. Los pacientes del grupo control presentaron tanto en el porcentaje de blastos como en el IC datos similares a los pacientes con nefrotoxicidad por Cs A (tabla II).

Al valorar el índice tubular, éste presentó valores altos tanto en los pacientes con nefrotoxicidad por Cs A como en los pacientes con rechazo. La presencia de la vacuolización isométrica (fig. 1) fue más frecuente en los pacientes con nefrotoxicidad por Cs A (nueve casos) que en aquellos con rechazo agudo (tres casos). Los pacientes de grupo control presentaron un IT significativamente inferior a los otros dos grupos. Tan sólo un paciente del grupo control presentó vacuolización isométrica en las células tubulares.

**Estudio inmunocitoquímico:** Los casos de nefrotoxicidad por Cs A mostraron en las muestras de las CAI un porcentaje de linfocitos que expresaron el fenotipo CD8, similar al porcentaje de aquellos que expresaron el CD4, por lo que la relación T8/T4 fue cercana a la unidad. Por otro lado, los pacientes con rechazo agudo presentaron un incremento de los linfocitos T8 sobre los T4, por lo que la relación T8/T4 fue significativamente superior al

grupo anterior. Tan sólo un caso del grupo de toxicidad por Cs A (6 %) presentó una relación T8/T4 superior a 1,5, frente a 12 casos de los pacientes con rechazo agudo (66 %) (tabla III). El grupo control de pacientes presentó una relación T8/T4 inferior a la unidad al prevalecer en las CAI el porcentaje de T4 sobre los linfocitos T8. Ningún caso de este grupo presentó una relación T8/T4 superior a 1,5.

La expresión del DR en las células tubulares del injerto fue positiva en dos casos del grupo de nefrotoxicidad frente a 12 del grupo de rechazo agudo. Curiosamente los dos casos con nefrotoxicidad por Cs A y expresión DR sufrieron un rechazo agudo dos semanas después de la reducción de la dosis de Cs A. Ningún paciente del grupo control expresó el DR en las células tubulares del injerto (tabla III).

La relación T8/T4 en sangre periférica no mostró diferencias significativas entre los tres grupos (tabla III). La correlación T8/T4 entre las muestras de la CAI y la sangre periférica no fue estadísticamente significativa.

## Grados de inmunoadactivación

En el grupo de nefrotoxicidad, un paciente presentó una inmunoadactivación de grado III, otro un grado II y un

**Tabla III.** Resultados del estudio inmunocitoquímico en los aspirados de los tres grupos estudiados

	T8/T4	DR(+)	T8/T4 <1,5	T8/T4 sp
Tox Cs A (n = 16)	1,1 ± 0,4*	2/16**	1/16**	1 ± 0,4
RA (n = 18)	2,1 ± 1,1	12/18	12/18	1,1 ± 0,3
Control (n = 18)	0,3 ± 0,4*	0/18***	0/18***	1 ± 0,2

Tox Cs A: Nefrotoxicidad por Cs A. RA: Rechazo agudo. T8/T4 sp: Relación T8/T4 en sangre periférica. ANOVA \* p < 0,01 vs RA. Fisher test \*\* p < 0,05 vs RA. \*\*\* p < 0,01 vs RA.

**Tabla II.** Resultados del estudio morfológico de los aspirados en los diferentes grupos

	% blastos	IC	IT	Blast.	IC > 3	Microvac.
Tox Cs A (n = 16)	0,2 ± 0,4*	1,2 ± 0,7**	3 ± 0,9	3/16 #	0/16 ##	9/16
RA (n = 18)	1,2 ± 1,6	3,8 ± 1,7	2,8 ± 1	13/18	14/18	3/18
Control (n = 18)	0,1 ± 0,4	1,8 ± 1	1,6 ± 0,4	1/18	0/18	1/18

Resultados del estudio morfológico de los aspirados en los diferentes grupos. ToxCsa=nefrotoxicidad por Cs A. RA=Rechazo agudo. IC=Incremento corregido. IT=Índice tubular. Blast=Presencia de blastos en los aspirados.

T: test \* p < 0,01; \*\* p < 0,001 vs RA.

Fisher test # p < 0,05; ## p < 0,001 vs RA.

**Tabla IV.** Grados de inmunoactivación en los diferentes grupos

	IV	III	II	I	0
Tox Cs A (n = 16)	0	1	1	1	13
RA (n = 18)	6	4	6	2	0
Control (n = 18)	0	0	0	1	17

Tox Cs A: Nefrototoxicidad por Cs A. RA: Rechazo agudo.

tercero un grado I. Los otros 13 casos no presentaron ningún dato de inmunoactivación (tabla IV). Los dos casos con grados II y III presentaban vacuolización isométrica en las células tubulares y sufrieron un rechazo al reducir la dosis de Cs A; el tercer caso presentaba un blasto % en el aspirado.

En el grupo de rechazo agudo, seis casos presentaban un grado IV de inmunoactivación, cuatro un grado III, seis un grado II y dos un grado I. Estos dos últimos expresaban el DR en las células tubulares del injerto.

En el grupo control tan sólo un caso presentó un grado I de inmunoactivación al presentar un blasto % en el aspirado.

## Discusión

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias claras entre aquellos casos de deterioro de la función del injerto por nefrototoxicidad por Cs A y aquellos otros con rechazo agudo, tanto en el estudio morfológico como en el inmunocitoquímico de las muestras tomadas por CAI.

Al analizar los tres grupos estudiados, en los que se llegó a un diagnóstico final por otros métodos, incluido biopsia del injerto, varios patrones morfológicos e inmunocitoquímicos pueden describirse.

En primer lugar están los pacientes del grupo control, que mostraron mínimas alteraciones en la morfología de las células tubulares, por lo que el índice tubular fue frecuentemente de I o II. Junto a esto no presentaron datos de inmunoactivación, con ausencia de blastos en los aspirados (a excepción de un caso) y un incremento corregido (IC) bajo, así como una relación T8/T4 cercana a la unidad y ausencia de expresión del DR en las células tubulares del injerto. Bien es cierto que al ser este grupo al que más precozmente se le realizó la CAI, la ausencia de microvacuolización en las células tubulares del injerto pudo deberse a un menor tiempo de tratamiento con Cs A, a pesar de una dosis más elevada de la misma (tabla I). Sin embargo, en cuatro casos con vacuolización

isométrica del grupo de nefrototoxicidad, la CAI fue realizada en las tres primeras semanas postrasplante (datos no mostrados en la tabla), lo que indica que la vacuolización isométrica es un fenómeno relativamente precoz en casos de nefrototoxicidad.

En segundo lugar están los casos diagnosticados de nefrototoxicidad por Cs A, en los que la creatinina plasmática se normalizó tras reducir la dosis de dicho fármaco. En ellos el IT fue elevado, apreciándose microvacuolización en nueve casos. Varios estudios realizados para diagnosticar la toxicidad por Cs A en los aspirados del injerto han mostrado como cambios morfológicos en las células tubulares el edema, incremento de la basofilia y vacuolización isométrica del citoplasma<sup>7, 19</sup>; estos hallazgos, en ausencia de datos de inmunoactivación como un aumento de incremento corregido (IC) y la presencia de blastos, son bastante característicos de nefrototoxicidad por Cs A<sup>7-9, 19</sup>. En el presente trabajo, la vacuolización isométrica, aunque se apreció más frecuentemente en este grupo, sólo apareció en un 56 % de los casos, presentando el resto otras lesiones no características de nefrototoxicidad, como la presencia de grandes vacuolas o necrosis total de la célula. Por ello creemos que la presencia de un índice tubular (IT) elevado, aun en ausencia de la microvacuolización característica, y sin datos de inmunoactivación, puede ser una indicación para reducir la dosis de Cs A en caso de deterioro de la función del injerto.

Un pequeño número de casos de este grupo de nefrototoxicidad presentó algunos datos de inmunoactivación, como es la expresión del DR en las células tubulares de injerto (dos casos), la presencia de blastos en los aspirados (tres casos) o una relación T8/T4 > 1,5 (un caso). Los dos casos que expresaron el DR sufrieron un rechazo agudo dos semanas después de reducir la dosis de Cs A. La expresión del DR en las células tubulares del injerto fue considerada por primera vez como un marcador de la presencia y severidad del rechazo por Hall y cols.<sup>20</sup>; posteriormente otros autores han encontrado una mayor frecuencia de rechazos en aquellos pacientes que igualmente lo expresaban<sup>21, 22</sup>. Aunque son muy pocos casos para sacar conclusiones, podemos interpretar que los dos pacientes del presente trabajo presentaban un rechazo silente que estaba enmascarado por los niveles altos de Cs A y que sólo se expresó clínicamente al reducir la inmunosupresión con Cs A.

El tercer grupo de pacientes está formado por aquellos que fueron diagnosticados de rechazo agudo mediante biopsia del injerto. En ellos el IT fue claramente patológico y similar a los casos de nefrototoxicidad, aunque existía con menos frecuencia microvacuolización. En este grupo, la lesión de las células tubulares que produjo unos IT elevados es debida a la isquemia y lesión propia del rechazo<sup>7, 8</sup>. Pero lo que lo diferenció claramente del grupo de nefrototoxicidad fue la existencia de signos claros de inmunoactivación, presentando este grupo valores significativamente superiores del porcentaje de

blastos, incremento corregido, relación T8/T4 y una mayor frecuencia de expresión del DR en las células tubulares del injerto (tablas II y III). Un IC elevado, junto con una respuesta blástica en los aspirados en el estudio morfológico de las citologías aspirativas, ha sido considerado como sugerente de rechazo por varios autores<sup>7-9, 19</sup>. Por otro lado, la expresión del DR y un predominio de los linfocitos que expresan el fenotipo CD8 sobre los que expresan el CD4 y su relación con el rechazo ha sido ya comentada<sup>16, 17, 20-22</sup>. Bien es cierto que algunos autores han encontrado en el estudio inmunocitoquímico de biopsias renales de pacientes con rechazo un predominio de los linfocitos que expresan el fenotipo CD4 sobre los que expresan el CD8<sup>23, 24</sup>, lo que difiere de nuestros resultados. Bishop y cols.<sup>23</sup> encontraron una distribución más difusa de los linfocitos CD8(+), observando una localización focal de los linfocitos CD4(+) en los episodios de rechazo. Al obtener la CAI células que infiltran diferentes áreas del injerto, se puede argumentar que los linfocitos distribuidos más difusamente son los aspirados preferentemente. Por otro lado, la descripción reciente de Raftery y cols.<sup>25</sup> podría ayudar a explicar los diferentes resultados descritos. Dichos autores han encontrado tres patrones inmunocitoquímicos de rechazo diferentes: uno con predominio de linfocitos, otro con equilibrio entre linfocitos y macrófagos y un tercero con predominio de macrófagos. La distribución de los linfocitos CD8(+) y CD4(+) en los tres patrones varió considerablemente. En el primero existió un predominio de CD8(+), en el segundo fueron los linfocitos CD4(+) los más abundantes y en el tercero existió muy escaso número de linfocitos de ambos fenotipos. Desgraciadamente, en el presente trabajo no utilizamos anticuerpos monoclonales específicos para los macrófagos, por lo que no podemos confirmar dicho hallazgo.

Los dos casos que presentaron como único dato de inactivación la expresión del DR en las células tubulares del injerto representan un problema diagnóstico, ya que ello también se produjo en dos casos de nefrotoxicidad. La ausencia de expresión de dichos antígenos en el grupo control y la relación con el rechazo ya comentada obliga a considerar este grupo de pacientes como «de riesgo», por lo que en estos casos estaría justificado un seguimiento diario con citologías aspirativas o la realización de una biopsia percutánea.

En el grupo de pacientes con rechazo agudo habría que comentar los dos casos que presentaron microvacuolización isométrica de las células tubulares características de nefrotoxicidad, pero con otros datos claros de rechazo. Esta asociación no es infrecuente; en algunos casos el límite terapéutico entre una adecuada inmunosupresión y la nefrotoxicidad por Cs A es muy pequeño, siendo necesaria una modificación de la inmunosupresión. Von Willebrand y Hayry, en un grupo de pacientes con estas características en las citologías aspirativas, redujeron la dosis de Cs A conjuntamente con la asociación de bolus de metilprednisolona, con lo que desapa-

recieron tanto la microvacuolización como los signos de inactivación<sup>6</sup>.

El estudio de la relación T8/T4 en sangre periférica no sirvió para diferenciar los tres grupos, por lo que lo consideramos una prueba de escaso valor para el diagnóstico diferencial de nefrotoxicidad.

En resumen, el estudio morfológico e inmunocitoquímico de los aspirados del injerto es un método inocuo que permite una buena diferenciación de los pacientes con nefrotoxicidad por Cs A mediante la demostración de alteraciones en las células tubulares sin datos de inactivación y el rechazo agudo.

## Bibliografía

1. Klintmalm G, Rgtrand A, Ringden O, Wassermann J, Collste H, Lundgren G, Wilczec H y Groth CG: Graft biopsy for the differentiation between nephrotoxicity and rejection in Cyclosporin A treated renal transplant recipients. *Transplant Proc*, 15:493-496, 1983.
2. Sibley RK, Rynasiwicz J, Ferguson MR, Ryd D, Sutherland DER, Immons RL y Najarian JS: Morphology of cyclosporine nephrotoxicity and acute rejection in patients immunosuppressed with cyclosporine and prednisone. *Surgery*, 94:225-234, 1983.
3. Bergstrand A y cols.: Renal histopathology in kidney transplant recipients immunosuppressed with cyclosporin A: results of an international workshop. *Clin Nephrol*, 24:107-119, 1985.
4. Holt DW, Marsden JT, Johnston A, Bewick M y Taube DH: Blood cyclosporin concentrations and renal allograft dysfunction. *Br Med J*, 293:1057-1059, 1986.
5. Irshick E, Tilg H, Niederwieser D, Gasti G, Huber Ch y Margreiter R: Cyclosporine blood levels to correlate with clinical complications. *Lancet*, ii:692-693, 1984.
6. Von Willebrand E y Hayry P: Cyclosporin A deposits in renal allograft. *Lancet*, ii:189-192, 1983.
7. Hayry P y Von Willebrand E: Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts. *Ann Clin Res*, 13:288-306, 1981.
8. Von Willebrand E y Hayry P: Fine needle aspiration cytology of the transplanted kidney. In Morris PJ (ed.). *Kidney transplantation: principles and practice*. Third edition. WB Saunders Co. Philadelphia, 491-510, 1988.
9. Helderman JH, Hernández J, Sagalowsky A, Dawidson I, Glennie J, Womble D, Toto RD, Drinker K y Hull AR: Confirmation of the utility of fine needle aspiration biopsy of the renal allograft. *Kidney Int*, 34:376-381, 1988.
10. Kupin WL, Venkat KK, Norris C, Florence-Green D, Dienst S, Oh HK, Feldkamp C y Levin NW: Effective long-term immunosuppression maintained by low cyclosporin levels in primary cadaveric renal transplant recipients. *Transplantation*, 43:214-224, 1987.
11. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F y Hiel G: Cyclosporine nephropathy. En Tisher CC y Brenner BM (eds.). *Renal pathology with clinical and functional correlations*. JB Lippincott Co. Philadelphia, 1555-1586, 1989.
12. Losada M, González-Posada JM, Torres A, Hernández D, García J, Lorenzo V y Maceira B: Terapéutica cuádruple en el trasplante renal de cadáver: un régimen alternativo en pacientes con necrosis aguda. *Nefrología*, 7(S1):105-109, 1988.
13. Von Willebrand E, Soots A y Hayry P: In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection: I. Characterization of host cellular infiltrate in rejecting allograft parenchyma. *Cell Immunol*, 46:309-326, 1979.
14. Von Willebrand E y Hayry P: Composition and in vitro cytotoxicity of cellular infiltrates in rejecting human allograft. *Cell Immunol*, 41:358-372, 1978.

15. González-Posada JM, García MC, Losada M, Torres A, Ravina M, Lorenzo V, Hernández D, Getino MA y Maceira B: Valor de la biopsia aspirativa con aguja fina en el diagnóstico de rechazo en el trasplante renal. XX Reunión Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Valladolid. *Nefrología*, 8 (S2):81, 1988.
16. Taube D, Welsh K, Hobby P y Williams DG: Human allograft and peripheral blood T lymphocyte subpopulations during the onset and treatment of rejection. *Clin Nephrol*, 22:127-132, 1984.
17. Hammer C, Land W, Stadler J, Oller C y Brendel W: Lymphocyte subclasses in rejecting kidney graft detected by monoclonal antibodies. *Transplant Proc*, 15:356-360, 1983.
18. González-Posada JM, García Castro MC, Losada M, Lorenzo V, Torres A, Hernández D, Maceira B y Salido E: Monoclonal analysis of Fine-needle Aspiration Biopsy in kidney allograft. *Nephrol Dial Transplant*, 1990. (En prensa.)
19. Sobh MA, Oustafa FE y Ghoneim MA: Fine needle aspiration biopsy: a reproducibility study and a correlation with the tru-cut biopsy in the evaluation of renal allotransplant. *Nephrol Dial Transplant*, 2:562-567, 1987.
20. Hall BM, Duggin CG, Phillips J, Bishop GA, Horvath JS y Tiller DJ: Increased expression of HLA-DR antigens on renal tubular cells in renal transplants: relevance to rejection response. *Lancet*, ii:247-251, 1984.
21. Henny FC, Weening JJ, Ludwin WM, Oljans PJ, Nke HJ, Van Es LA y Paul LC: Expression of HLA-DR antigens on peripheral blood T lymphocytes and renal graft tubular epithelial cells in association with graft rejection. *Transplantation*, 42:479-483, 1986.
22. Fuggle SV, McWhinnie DL, Chapman JR, Taylor HM y Morris PJ: Sequential analysis of HLA-class II antigen expression in human renal allograft. *Transplantation*, 42:144-150, 1986.
23. Bishop GA, Haal BM, Duggin CG, Horvath JS, Sheil AGR y Tiller DJ: Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Int*, 29:708-717, 1986.
24. Seron D, Alexopoulos E, Raftery MJ, Hartley RB y Cameron JS: Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation*, 47:811-816, 1989.
25. Raftery MJ, Seron D, Koffman G, Artley B, Janossy G y Cameron JS: The relevance of induced class II HLA antigens and macrophage infiltration in early renal allograft biopsies. *Transplantation*, 48:238-243, 1989.