

La activación de las células tubulares renales disminuye la respuesta autoinmune en la nefritis lúpica experimental

C. Díaz-Gallo y V. Rubin Kelley

Laboratory of Immunogenetics and Transplantation. Brigham and Women's Hospital. Harvard Medical School. Boston, MA (USA).

Introducción

La activación (expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II y moléculas de adhesión ICAM-1) de las células del parénquima renal es un hallazgo precoz en la nefritis autoinmune, pero se desconoce si es causa o consecuencia de la agresión inmunológica. Estudios recientes han demostrado que si bien la activación de las células del sistema mononuclear fagocítico es necesaria para inducir proliferación linfocitaria, la activación de células epiteliales produce tolerancia.

Con el propósito de investigar la importancia de la activación de las células epiteliales renales en la respuesta autoinmune se utilizaron clones de linfocitos T y de células tubulares obtenidos del intersticio renal del ratón MRL/lpr, afecto de nefritis lúpica. Estudios previos han demostrado que estos linfocitos T infiltrantes renales eran autorreactivos y nefroespecíficos. Las células tubulares fueron activadas mediante estimulación con interferón-gamma (IFN- γ). Los resultados mostraron que las células tubulares activadas disminuían la proliferación de los clones linfocitarios. Esta disminución no era producida por factores secretados por las células tubulares ni debida a muerte celular. En conclusión, la activación de células tubulares renales mediante IFN- γ produce *in vitro* una inhibición de la autorreactividad linfocitaria. Alteraciones de este mecanismo contrarregulador podrían ser la causa de la progresión de la lesión autoinmune renal.

Material y métodos

Animales

Ratones MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL/lpr) se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Correspondencia: Dra. Cristina Díaz-Gallo.
Servei de Nefrologia.
Hospital de Bellvitge.
C/ Feixa Llarga, s/n.
L'Hospitalet de Llobregat.
08907 Barcelona (España).

Reactivos y anticuerpos monoclonales

Los reactivos fueron suministrados por las compañías o investigadores siguientes: medios de cultivo (Gibco, NY, USA); suero bovino fetal (Hyclone, UT, USA); ^3H -timidina (N. E. Nuclear, MA, USA); hibridoma 10-2.16 (anti-clase II, I-Ak) (American Type Culture Collection, MD, USA).

Citometría de flujo

Las células a analizar se incubaron durante 30 minutos a 4° C con 5 μg de anticuerpo monoclonal. Posteriormente, las células se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia y analizadas en un citómetro de flujo.

Clonaje linfocitario

Cortex renales de ratones MRL/lpr fueron decapsulados y el cortex fragmentado y tamizado a través de gradillas de diámetro decreciente (250, 150, 75 y 38 μm). La suspensión resultante se centrifugó en un gradiente de Ficoll-Hypaque durante 15 minutos a 2.000 rpm. Los linfocitos T se recuperaron de la interfase y se mantuvieron en cultivo en RPMI-1640 con 10 % de suero bovino fetal, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina, 10 μM HEPES, 1 μM piruvato sódico, 10^{-5} M 2-mercaptoetanol, 1 % de aminoácidos esenciales y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IL-2. Después de 15 días en cultivo, la línea celular fue clonada por dilución a 1 célula/pocillo en pocillos de 200 μl de volumen, usando como nutrientes células singeneicas esplénicas y tubulares, irradiadas previamente con 3.000 rads. El fenotipo de los clones obtenidos era TCR α/β^+ , CD3+, CD4-, CD8-, B220+, característico de la subpoblación de linfocitos T «doble negativos» que se acumulan en el ratón MRL/lpr.

Clonaje de células tubulares renales

Cortex renales de ratones MRL/lpr fueron decapsulados, fragmentados y se incubaron en una solución de colagenasa tipo II (2 mg/ml) durante 90 minutos a 37° C. Posteriormente, los fragmentos se tamizaron a través de gradillas de diámetro decreciente (250, 150, 75 y 38 μm).

El producto obtenido se cultivó en placas de 100 mm en un medio K-1 (1:1 DMEM y Ham's F12, conteniendo 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml transferrina, 1 ng/ml prostaglandina E1, 5×10^{-11} M triiodotironina, 10^{-8} M selenio, 5×10^{-8} M hidrocortisona, 25 ng/ml factor de crecimiento epitelial). Las células se clonaron en pocillos de 200 μ l de volumen, a densidad 1 célula/pocillo. Los clones resultantes se caracterizaron de la forma habitual descrita¹.

Proliferación linfocitaria

Los linfocitos T se cultivaron en 200 μ l de medio de cultivo \pm células tubulares irradiadas con 3.000 rads. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las células se cultivaron durante tres días, añadiéndose al cultivo 5 μ Ci de ³H-timidina/ml cuatro horas antes de recuperar las células. La incorporación de ³H-timidina al DNA de las células se determinó mediante un contador de partículas β .

Evaluación de la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán

Los linfocitos T se cultivaron durante tres días con células tubulares cultivadas previamente en medio K-1 \pm IFN- γ (250 U/ml). Los linfocitos T se recuperaron y se diluyeron 1:2 en 0,1 % de azul tripán.

Fijación con glutaraldehído

Las células tubulares fueron lavadas tres veces en PBS e incubadas con 4 % glutaraldehído durante 15 minutos a 25° C. Posteriormente, las células se lavaron tres veces en medio de cultivo y fueron incubadas durante dos horas a 37° C. Finalmente, las células fueron lavadas de nuevo y utilizadas para los ensayos de proliferación linfocitaria.

Estadística: Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statview SE+ (Abacus Concepts, Ca, USA). Las diferencias entre grupos se compararon mediante T-test, U-Mann Whitney o ANOVA. Los resultados se expresan como media \pm 1 desviación estándar (DS).

Resultados

1) El estímulo de las células tubulares renales con IFN- γ disminuye la proliferación linfocitaria

Los linfocitos T infiltrantes de la nefritis lúpica proliferan en presencia de células tubulares renales. Estudios recientes han demostrado que si bien la activación del sistema mononuclear-fagocítico es necesaria para inducir proliferación linfocitaria, la activación de células epiteliales disminuye la respuesta inmune². Por tanto, para averiguar cuál era el efecto de la activación de las células tubulares renales sobre la proliferación de los linfocitos T in-

filtrantes renales, se estimularon células tubulares renales con IFN- γ (250 μ /ml \times 3 días). La activación celular fue comprobada mediante la inducción de expresión de clase II por citometría de flujo. Posteriormente, las células tubulares se irradiaron y se utilizaron en los ensayos de proliferación linfocitaria. Los resultados demostraron que la activación previa de las células tubulares renales con IFN- γ disminuía la respuesta inmune (fig. 1).

2) La disminución de la respuesta inmune no es debida a muerte celular

Para investigar si la disminución en la proliferación linfocitaria era debida a muerte celular, la viabilidad celular fue analizada mediante tinción azul tripán. Los clones linfocitarios se cultivaron durante tres días con células tubulares que previamente habían sido estimuladas o no con IFN- γ . Posteriormente, los linfocitos T se tiñeron con azul tripán y se calculó el porcentaje de muerte celular. Los resultados mostraron que no había diferencias entre los dos grupos, indicando que la disminución de la proliferación linfocitaria no era debida a muerte celular (fig. 2).

3) La disminución de la respuesta inmune requiere contacto intercelular

La disminución de la proliferación linfocitaria podría ser debida a una sustancia secretada por las células tubulares estimuladas con IFN- γ o bien debido al contacto con una molécula en la superficie de las células tubulares renales inducida por el IFN- γ . Con el propósito de averiguar cuál de estos dos mecanismos era el responsable, se practicó una fijación con glutaraldehído de las células renales que habían sido tratadas con IFN- γ . La fijación con glutaraldehído impide la secreción de sustancias por parte de la cé-

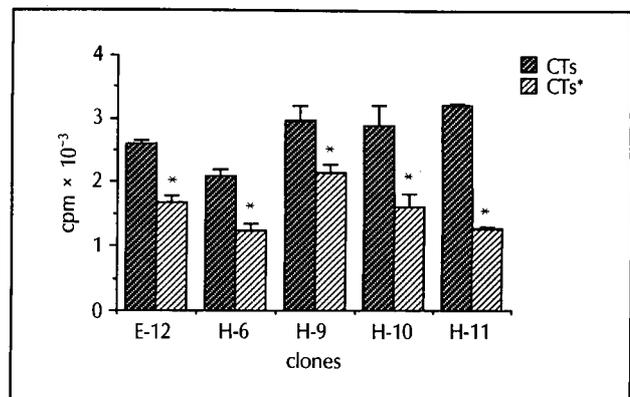


Fig. 1.—Las células tubulares estimuladas con IFN- γ disminuyen la respuesta autoinmune en la nefritis lúpica experimental. Los clones linfocitarios fueron cultivados durante 3 días con células tubulares previamente estimuladas (CTs*) o no (CTs) con IFN- γ (3 días, 250 U/ml). Los resultados se expresan como media \pm 1 DS. El experimento fue repetido ≥ 3 veces con resultados similares. $P < 0,05$.

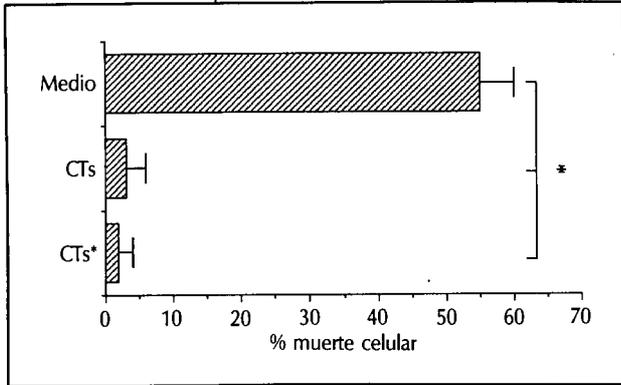


Fig. 2.—Viabilidad de los linfocitos T en contacto con células tubulares tratadas con IFN- γ . La figura muestra el porcentaje de muerte celular determinado por la tinción azul tripan de uno de los clones linfocitarios (H-10) en cultivo con células tubulares previamente estimuladas (CTs*) o no (CTs) con IFN- γ (3 días, 250 U/ml). Datos similares fueron obtenidos con los otros clones linfocitarios. El experimento fue repetido 3 veces con resultados similares. $P < 0,05$ en medio vs. CTs y CTs*, sin diferencias entre CTs vs. CTs*.

lula fijada. La fijación con glutaraldehído no modificó la actividad inhibitoria de las células tubulares tratadas con IFN- γ , indicando que se trataba de un mecanismo que requería contacto intercelular (fig. 3).

Discusión

El tratamiento de las células tubulares con IFN- γ disminuye la proliferación de los linfocitos T nefroespecíficos. La incapacidad de las células epiteliales de actuar como

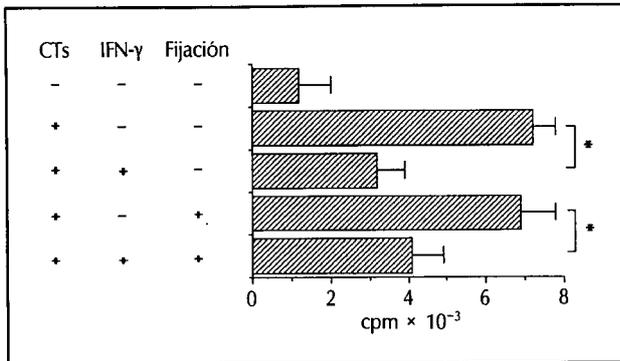


Fig. 3.—La fijación con glutaraldehído no modifica la reducción de la proliferación linfocitaria. Células tubulares (CTs) previamente estimuladas o no con IFN- γ (3 días, 250 U/ml) fueron fijadas con glutaraldehído y co-cultivadas con el clon linfocitario H-10. Experimentos de control fueron realizados utilizando células tubulares no fijadas. Los resultados se expresan como media ± 1 DS. El experimento fue repetido ≥ 3 veces con resultados similares para todos los clones estudiados (G-8, E-12, H-6, H-9, H-10, H-11). $P < 0,05$ CTs vs. CTs + IFN- γ , sin diferencias entre CTs fijadas o no con glutaraldehído.

células presentadoras de antígeno ha sido ampliamente demostrada. Queratinocitos estimulados con IFN- γ no sólo no estimulan la proliferación linfocitaria, sino que inducen tolerancia². La expresión de clase II en células beta pancreáticas es insuficiente para iniciar la respuesta inmune³. Las células tubulares renales estimuladas con IFN- γ son capaces de presentar antígenos y activar hibridomas, pero se desconoce su influencia en la proliferación linfocitaria⁴. En este estudio se demuestra que la activación de las células tubulares renales con IFN- γ inhibe *in vitro* la proliferación linfocitaria. La significación de este fenómeno *in vivo* aún no está aclarada. Es evidente que en la nefritis lúpica, a pesar de existir una hiperexpresión de clase II, la lesión inflamatoria renal es progresiva. Las diferencias entre los resultados *in vitro* y los hallazgos *in vivo* podrían tener varias interpretaciones: 1) la acción conjunta de varias citoquinas *in vivo* produciría cambios conformacionales en las moléculas de superficie tubular, indistinguibles mediante técnicas inmunohistoquímicas, pero capaces de impartir señales diferentes a los linfocitos infiltrantes renales; 2) el efecto supresor es exclusivo de los linfocitos «doble negativos», permitiendo la proliferación de otras subpoblaciones linfocitarias; 3) la interacción *in vivo*, con otras células del intersticio renal (p.e., macrófagos), modificaría la respuesta autoinmune; 4) la existencia de autoanticuerpos antimembrana tubular *in vivo* bloquearían la molécula supresora que *in vitro* disminuye la proliferación linfocitaria.

En conclusión, la posibilidad de aislar clones de linfocitos infiltrantes y de células tubulares renales ha permitido iniciar el estudio de las interacciones entre ambas células en el desarrollo de las nefritis autoinmunes. El estudio del efecto inmunomodulador de las células tubulares renales podría permitir el diseño de alternativas terapéuticas encaminadas a la adquisición de tolerancia inmunológica.

Agradecimientos

Becas del National Institute of Health (NIH) DK-40839 (VRK), DK-36149 (VRK), CA-48626 (VRK), Jules and Gwen Knapp Charitable Foundation (CDG y VRK), Sandoz/Sociedad Española de Nefrología (CDG), Fulbright-La Caixa (CDG) y Agua Mineral Bezoya (CDG).

Bibliografía

1. Wuthrich RP, Yui MA, Mazoujian G, Nabavi N, Glimcher LH y Kelley VE: Enhanced MHC class II expression in renal proximal tubules precedes loss of renal function in MRL/lpr mice with lupus nephritis. *Am J Pathol*, 134:45-51, 1989.
2. Gaspari AA, Jenkins MK y Katz SI: Class II MHC-bearing keratinocytes induce antigen-specific unresponsiveness in hapten-specific Th1 clones. *J Immunol*, 141:2216-2220, 1988.
3. Lo D, Burkly LC, Widera G y cols.: Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class II MHC molecules in pancreatic beta cells. *Cell*, 53:159-168, 1988.
4. Wuthrich RP, Glimcher LH, Yui MA, Jevnikar AM, Dumas SE y Kelley VE: MHC class II, antigen presentation and tumor necrosis factor in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int*, 37:783-792, 1990.