

# Clones de linfocitos T aislados en la nefritis lúpica experimental demuestran que la afectación renal del lupus eritematoso sistémico es órgano-específica

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 participación del infiltrado celular autorreactivo en la patogénesis de nefritis autoinmunes órgano-específicas ha sido ampliamente descrita<sup>1-7</sup>. Sin embargo, se desconoce la contribución de linfocitos T autorreactivos nefroespecíficos en la afectación renal de enfermedades autoinmunes sistémicas.

El ratón MRL/lpr desarrolla espontáneamente una enfermedad autoinmune similar al LES humano, incluyendo producción de anticuerpos, artritis, vasculitis y nefritis<sup>8</sup>. La afectación renal consiste en una progresiva glomerulonefritis acompañada de un infiltrado intersticial, que progresa en pocas semanas hacia una insuficiencia renal terminal. En asociación a las manifestaciones autoinmunes, el ratón MRL/lpr también presenta una proliferación de linfocitos T «doble negativos» (CD3+, TCR  $\alpha/\beta$ +, CD4-, CD8-), cuya participación directa en la enfermedad autoinmune no está aclarada<sup>9</sup>.

El estudio de los linfocitos T autorreactivos nefroespecíficos en el contexto de enfermedades autoinmunes sistémicas y de sus interacciones con las células del parénquima renal requiere la obtención de poblaciones puras de linfocitos T nefroespecíficos y de células parenquimatosas renales. El propósito de este trabajo ha sido la obtención y caracterización de clones de linfocitos T infiltrantes del intersticio renal. Todos los clones de linfocitos T aislados del intersticio renal del ratón lúpico MRL/lpr presentaban el mismo fenotipo «doble negativo» característico de la subpoblación linfocitaria que prolifera en este animal. Esos clones linfocitarios eran autorreactivos, nefroespecíficos y capaces de inducir la expresión de moléculas de clase II en células tubulares renales, indicando su participación directa en la lesión renal autoinmune.

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

## Material y métodos

### Animales

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

### Reactivos y anticuerpos monoclonales

Los reactivos fueron suministrados por las compañías o investigadores siguientes: medios de cultivo (Gibco, NY, USA); anti-Thy 1.2 (CD3 murino), anti-L3T4 (CD4 murino), anti-Lyt-2 (CD8 murino) (Becton & Dickinson, CA, USA); suero bovino fetal (Hyclone, UT, USA); concanavalina A (Con A) y 2-mercaptoetanol (Sigma, MO, USA); <sup>3</sup>H-timidina (N. E. Nuclear, MA, USA); hibridoma 10-2.16 (anti-clase II, I-Ak) (American Type Culture Collection, MD, USA); hibridoma RA3-6B2 (anti-CD45R/B220) (Dr. A. Marshak-Rothstein, MA, USA); hibridoma H597 (anti-TCR murino) (Dr. R. Kubo, CO, USA); hibridoma 145-2C11 (anti-CD3 murino) (Dr. J. Bluestone, IL, USA); IL-2 recombinante humana (Dr. J. Murphy, MA, USA).

### Citometría de flujo

Las células a analizar se incubaron durante 30 minutos a 4° C con 5  $\mu$ g 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 gradillas de diámetro decreciente (250, 150, 75 y 38  $\mu$ m). 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  $\mu$ g/ml de estreptomina, 100 U/ml de penicilina,

10  $\mu$ M HEPES, 1  $\mu$ M piruvato sódico.  $10^{-5}$  M 2-mercapto-etanol, 1 % aminoácidos esenciales y 50  $\mu$ /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  $\mu$ l de volumen, usando como nutrientes células singeneicas esplénicas y tubulares, irradiadas previamente con 3.000 rads.

#### 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  $\mu$ m). 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,  $5 \times 10^{-11}$  M triiodotironina,  $10^{-8}$  M selenio,  $5 \times 10^{-8}$  M hidrocortisona, 25 ng/ml factor de crecimiento epitelial). Las células se clonaron en pocillos de 200  $\mu$ l de volumen, a densidad 1 célula/pocillo. Los clones resultantes se caracterizaron de la forma habitual descrita<sup>10</sup>.

#### Proliferación linfocitaria

Los linfocitos T ( $10 \times 10^5$ ) se cultivaron en 200  $\mu$ l de medio de cultivo  $\pm$  células singeneicas irradiadas con 3.000 rads. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las células se cultivaron durante tres días, añadiéndose al cultivo 5  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina/ml cuatro horas antes de recuperar las células. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina al DNA de las células se determinó mediante un contador de partículas  $\beta$ .

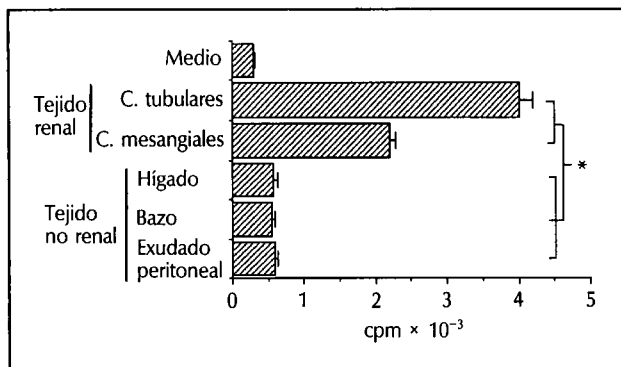


Fig. 1.—Los clones linfocitarios aislados de la nefritis lúpica experimental son autorreactivos y nefroespecíficos. La figura muestra un experimento representativo de la proliferación (media  $\pm$  1 DS) del clon H-10 frente a diversas células singeneicas. El experimento fue repetido  $\geq 3$  veces con resultados similares para todos los clones estudiados (G-8, E-12, H-6, H-9, H-10, H-11).  $P < 0,05$  para células renales (tubulares y mesangiales) vs. medio, hígado, bazo y exudado peritoneal.

#### Extracción de RNA mensajero y técnica de la reacción de la polimerasa (PCR)

El RNA citoplasmático fue extraído mediante lisis con NP-40. El RNA se transcribió reversamente a DNA complementario. Este DNA se amplificó mediante PCR, según la metodología descrita<sup>11</sup>.

#### 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) Caracterización morfológica de los clones de linfocitos T que infiltran el intersticio renal en la nefritis lúpica experimental

Para investigar las características del infiltrado intersticial linfocitario del ratón MRL/lpr afecto de nefritis lúpica se aisló una línea celular de linfocitos T del cortex renal de ratones MRL/lpr con proteinuria. Después de 15 días en cultivo, la línea celular fue clonada en presencia de células singeneicas esplénicas y tubulares renales previamente irradiadas. La eficiencia de la técnica de clonaje fue del 6,5 %, obteniéndose seis clones. Todos los clones compartían el mismo fenotipo (TCR  $\alpha/\beta$ +, CD3+, CD4-, CD8-, B220+), característico de la subpoblación de linfocitos T «doble negativos» que se acumulan en este modelo animal de enfermedad autoinmune.

##### 2) Proliferación linfocitaria

Para caracterizar funcionalmente estos clones linfocitarios se practicaron ensayos de proliferación celular, utilizando como estímulo células singeneicas. Todos los clones proliferaron exclusivamente frente a células tubulares renales y no frente a células no-renales, como esplenocitos, hepatocitos o células del exudado peritoneal (compuestas mayoritariamente por macrófagos y linfocitos B) (fig. 1).

##### 3) Producción de citoquinas

El estudio de producción de RNA mensajero específico para diferentes citoquinas se realizó en dos circunstancias: cuando los linfocitos T estaban en estado no activado y después de estimulación durante tres días con células tubulares renales. Los resultados mostraron que la producción de citoquinas era heterogénea, con un aumento de las mismas en estado de activación (tabla I). Las únicas características comunes para los diferentes clones fueron

**Tabla I.** Producción de citoquinas <sup>a</sup>

Estimulación <sup>b</sup>	Clones									
	H-6		H-9		H-10		H-11		E-12	
	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí
IL-2 .....	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-4 .....	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
IL-6 .....	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TNF- $\alpha$ .....	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
IFN- $\gamma$ .....	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
TGF- $\beta$ .....	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-

<sup>a</sup> La existencia de RNA mensajero específico para las diferentes citoquinas se estudió mediante PCR.

<sup>b</sup> Estimulación: Los clones ( $1 \times 10^6$ /ml) se mantuvieron en cultivo durante 3 días con células tubulares renales ( $5 \times 10^7$ /ml).

que ninguno producía IL-2 y que todos eran capaces de sintetizar mensajero para IFN- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .

#### 4) Capacidad de inducción de moléculas de clase II en la superficie de las células tubulares renales

En el ratón MRL/lpr, la expresión de clase II en las células tubulares renales precede a la aparición de proteinuria <sup>12</sup>. El IFN- $\gamma$  es la única citoquina capaz de inducir expresión de clase II en células tubulares renales <sup>10</sup>. Por tanto, y dado que todos los clones aislados del intersticio renal eran capaces de producir RNA específico para IFN- $\gamma$ , se investigó si los clones linfocitarios eran capaces de inducir la expresión de clase II en células tubulares.

Células tubulares renales fueron cultivadas con sobrenadantes (50 % volumen/volumen) recogidos tras tres días de cultivo de los clones linfocitarios ( $1 \times 10^6$  células/ml). Después de tres días de cultivo, la expresión de clase II en las células tubulares renales fue analizada mediante citometría de flujo (tabla II). Los resultados indicaron que los linfocitos T clonados del intersticio renal en la nefritis lúpica experimental eran capaces de inducir *in vitro* la expresión de clase II en células tubulares renales.

**Tabla II.** Expresión de clase II en células tubulares tratadas con sobrenadante de los cultivos linfocitarios. Efecto del tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ 

Clones	Medio K-1	Estímulo <sup>a</sup> SN 50 %
E-12 .....	2 %	45 %
G-8 .....	3 %	44 %
H-6 .....	2 %	50 %
H-9 .....	3 %	43 %
H-10 .....	2 %	44 %

<sup>a</sup> SN: Sobrenadante del cultivo  $1 \times 10^6$  células/ml  $\times$  3 días.

## Discusión

La participación del infiltrado linfocitario autorreactivo en la patogénesis de nefritis autoinmunes órgano-específicas ha sido ampliamente descrita. Sin embargo, se desconoce la contribución de linfocitos T autorreactivos nefroespecíficos en la afectación renal de enfermedades autoinmunes sistémicas. El objetivo de este estudio fue investigar la posible existencia de linfocitos T autorreactivos nefroespecíficos en un modelo experimental de enfermedad autoinmune sistémica (LES) con constante y severa afectación renal (ratón MRL/lpr). El estudio demuestra que existe una interacción específica entre el infiltrado intersticial linfocitario y las células parenquimatosas renales en la nefritis lúpica experimental.

Los linfocitos T que infiltran el intersticio renal en la nefritis lúpica proliferan exclusivamente frente a células tubulares renales, indicando que la afectación renal en el contexto del LES es específica. La afectación renal en el LES humano acontece en un 35-90 % de los pacientes. En todos los casos existe un grado variable de infiltrado intersticial, que será el que tendrá mayor valor pronóstico <sup>13</sup>. La evolución de la nefritis lúpica es variable, no encontrándose correlación con la evolución de otras manifestaciones de la enfermedad. La demostración de que los linfocitos T que infiltran la nefritis lúpica son nefroespecíficas sugieren la existencia de uno o varios antígenos renales que estimularían los linfocitos T potencialmente autorreactivos, iniciando la lesión autoinmune renal.

La presentación del antígeno a los linfocitos T requiere de la presencia de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II <sup>14</sup>. La hiperexpresión de clase II es característica de las enfermedades autoinmunes, incluyendo la nefritis lúpica <sup>12,15</sup>. La expresión de clase II en las células tubulares favorecería el reconocimiento de antígenos renales por linfocitos T autorreactivos, perpetuándose la lesión renal. Los linfocitos T que infiltran la nefritis lúpica son capaces de inducir moléculas de clase II en células tubulares renales, lo que indica su participación directa en el mantenimiento de la respuesta inmune.

En resumen, el aislamiento de clones de linfocitos T nefroespecíficos en la nefritis lúpica experimental demuestra que la afectación renal en enfermedades autoinmunes sistémicas puede ser órgano-específica. La capacidad de estos clones de inducir moléculas de clase II en células tubulares renales indica su participación directa en la respuesta inmunológica. El estudio de los antígenos renales que desencadenan esta reacción inmunológica podría contribuir a desarrollar alternativas terapéuticas dirigidas a prevenir la afectación renal en el LES.

## Agradecimientos

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

## Bibliografía

1. Fillit H, Read S, Sherman R, Zabriskie J y Van de Run I: Cellular reactivity to altered glomerular basement membrane in glomerulonephritis. *N Engl J Med*, 298:861, 1978.
2. Schreiner GF, Harris KPG, Purkerson ML y Klahr S: Immunological aspects of acute ureteral obstruction: Immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int*, 34:487-793, 1988.
3. Bolton WK, Chandra M y Tyson TM: Transfer of experimental glomerulonephritis in chickens by mononuclear cells. *Kidney Int*, 34:598-610, 1988.
4. Sugisaki T, Yoshida T y McCluskey RT: Autoimmune cell-mediated tubulointerstitial nephritis induced in Lewis rats by renal antigens. *Clin Immunol Immunopath*, 15:33, 1980.
5. Bannister KM, Ulich TR y Wilson CB: Induction, caracterización and cell transfer of autoimmune tubulointerstitial nephritis in the Lewis rat. *Kidney Int*, 32:642, 1987.
6. Kelly CJ y Neilson EG: Medullary cystic disease: An inherited form of autoimmune interstitial nephritis? *Am J Kidney Dis*, 10:389-395, 1987.
7. Kelly CJ y Neilson EG: Contrasuppression in autoimmunity: abnormal contrasuppression facilitates expression of nephritogenic effector T cells and interstitial nephritis in kdkd mice. *J Exp Med*, 165:107-123, 1987.
8. Theophilopoulos AN y Dixon FJ: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol*, 37:269-320, 1985.
9. Morse HCl, Davidson WF, Yetter RA, Murphy ED, Roths JB y Coffman R: Abnormalities induced by the mutant gene, *lpr*. *J Immunol*, 129:2612-2615, 1982.
10. 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.
11. Díaz-Gallo C, Moscovitz-Lopatin M, Strom TB y Rubin Kelley VE: Anergic, islet-infiltrating T cell clone that supresses murine diabetes secretes a factor that blocks IL-2/IL-4 dependent proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* (en prensa), 1992.
12. 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.
13. Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB y Camberon JS: Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney Int*, 37:100-109, 1990.
14. Doyle C y Strominger JL: Interaction between CD4 and class II molecules mediates cell adhesion. *Nature*, 330:256-259, 1987.
15. Pujol-Borrell R, Todd I, Londei M, Foulis A, Feldmann M y Bottazo GF: Inappropriate major histocompatibility complex class II expression by thyroid follicular cells in thyroid autoimmune disease and by pancreatic beta cells in type I diabetes. *Mol Biol Med*, 3:159-165, 1986.