

## Apoptosis de células renales: factores letales y de supervivencia

Alberto Ortiz Arduán<sup>1</sup>, Silvia González Cuadrado<sup>1</sup>, Jesús Egido<sup>1</sup>, Arturo Ortiz González<sup>2</sup>

### Resumen

En las nefropatías existen cambios, por exceso o por defecto, en el número de células. Existe evidencia reciente de que la muerte celular por apoptosis regula la celularidad renal. La apoptosis está controlada por factores de supervivencia y letales en células extrarenales. Sin embargo, la regulación de la apoptosis en células renales es mal conocida. En este trabajo hemos identificado al factor de necrosis tumoral (TNF) como factor que induce apoptosis en células mesangiales, tubulares y en fibroblastos renales. Las citoquinas presentes en el suero son factores de supervivencia para estas tres estirpes celulares. También hemos demostrado que las células mesangiales expresan el receptor inductor de apoptosis Fas a nivel de mRNA (Northern blot) y de proteína (citometría de flujo). El TNF incrementó la expresión de Fas. Las citoquinas del suero, por el contrario, no modificaron la expresión de Fas. En conclusión, la supervivencia de las células renales está regulada por factores de supervivencia y por factores letales como el TNF. Asimismo las células renales está regulada por factores de supervivencia y por factores letales como el TNF. Asimismo las células mesangiales expresan receptores para citoquinas que pueden inducir apoptosis, como Fas. El mejor conocimiento de la regulación de la supervivencia de células renales puede originar nuevas estrategias terapéuticas en Nefrología.

**PALABRAS CLAVE:** Apoptosis, TNF, Fas

### Apoptosis of renal cells: lethal and survival factors

In nephropathies there are changes in the number of cells either in excess or a shortage of these. Recent evidence shows that cell death due to apoptosis regulates renal cell production of cells. Apoptosis is controlled by survival and lethal factors in extra-renal cells. The regulation of apoptosis in renal cells is, however, not well known. In this study we have identified the tumoral necrosis factor (TNF) as the factor which induces apoptosis in mesangial and tubular cells and in renal fibroblasts. Cytokines present in serum are survival factors for these three types of cells. We have also demonstrated that mesangial cells express the Fas apoptosis inductor receptor on a mRNA (Northern blot) and protein (flow cytometry) level. The TNF increased the expression of Fas. The serum cytokines, on

the other and, did not alter the expression of Fas. In conclusion the survival of renal cells is regulated by survival factors and lethal factor such as the TNF. In addition, mesangial cells express receptors for cytokines that can induce apoptosis, such as Fas. A greater knowledge of the regulation of renal cell survival could lead to new therapeutical strategies in nephrology.

**KEY WORDS:** apoptosis, TNF, Fas.

Una de las características patológicas de las enfermedades renales es la variación en el número de células. En las glomerulonefritis proliferativas hay un aumento del número de células glomerulares, y en la fibrosis intersticial de las nefropatías crónicas, está incrementado el número de fibroblastos. Por el contrario, en el fracaso renal agudo y en la atrofia tubular de las nefropatías crónicas, el número de células tubulares está disminuido. La apoptosis es una forma de muerte celular que es activa (suicidio celular) y requiere la activación de un programa genético (muerte celular programada) (1). La apoptosis se caracteriza por una morfología típica (cuerpos apoptóticos) y por evidencia funcional de activación de una endonucleasa específica (degradación internucleosomal de DNA) (1). La muerte celular por apoptosis colabora en la regulación de la celularidad renal en condiciones fisiológicas y patológicas (2). Así, se ha demostrado que la normalización de la celularidad glomerular en la resolución de las glomerulonefritis proliferativas tiene lugar por apoptosis del exceso de células (3). Existe también apoptosis en distintos modelos de fracaso renal agudo (4) y en la atrofia tubular crónica (5). Los fibroblastos renales procedentes de pacientes con fibrosis renal sobreviven más tiempo en cultivo (6), sugiriendo que la ausencia de una tasa de apoptosis adecuada favorece su acumulación in vivo. El rechazo de trasplante fue una de las primeras patologías en que se observó apoptosis (7). Hoy sabemos que los linfocitos T, principales efectores del rechazo agudo, inducen apoptosis de células dianas extrarenales a través de la activación del receptor letal Fas (8, 9).

1. Servicios de Nefrología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid
2. Servicio de Nefrología, Hospital Universitario del Aire y Universidad Complutense de Madrid

La apoptosis de células extrarrenales está regulada por factores de supervivencia y por factores letales (10). En este sentido, aunque en diversas nefropatías se ha demostrado la presencia de células apoptóticas (4-7), los factores que desencadenan la apoptosis de células renales son poco conocidos. En células extrarrenales se han caracterizado algunos factores de supervivencia, como las citoquinas presentes en el suero, el EGF, el IGF-1, y el PDGF (10). El tratamiento con algunos de estos factores, como EGF e IGF-1 mejora la evolución del fracaso renal agudo experimental (11, 12), lo que sugiere que podrían regular también la supervivencia de las células tubulares renales. Por otra parte, la infiltración glomerular e intersticial por linfocitos T y monocitos/macrófagos es frecuente en el riñón dañado (13, 14), y se ha demostrado que los linfocitos T son capaces de matar células renales (14, 15), aunque no se conoce el mecanismo de esta muerte. Entre los factores letales que podrían ser liberados por monocitos/macrófagos y linfocitos T destacan el TNF y el ligando de Fas. El TNF induce apoptosis de células endoteliales y oligodendrocitos (16, 17), y es tóxico para células mesangiales y epiteliales glomerulares (18), aunque el mecanismo de esta citotoxicidad no ha sido aclarado. El TNF activa dos receptores específicos, denominados TNFR I y TNFR II (19). Recientemente se ha comprobado que ambos TNFR forman parte de una superfamilia de receptores con homología en la porción extracelular de la molécula (19). Los ligandos de estos receptores constituyen la familia de citoquinas similares al TNF, y guardan homología en sus dominios C-terminales (19). El receptor Fas (CD95) y su ligando (FasL) pertenecen a estas familias de receptores y ligandos (19). La activación de Fas induce apoptosis de células susceptibles, tanto *in vitro* como *in vivo* (20-22). El papel que FasL y Fas puedan jugar en patología renal y en el rechazo de trasplante permanece inexplorado. De hecho, en el estudio pionero de Watanabe y cols, el mRNA de Fas no fue detectado en el riñón normal (23). En este trabajo hemos abordado la hipótesis de que la supervivencia de células renales está regulada por los factores de supervivencia del suero y por el TNF, y que las células renales expresan el receptor letal Fas.

## Materiales y métodos

### Células y citoquinas

Estudiamos células mesangiales murinas MMC (24), células tubulares proximales MCT (25) y fibroblastos renales TFB (26). Las células se cultivaron en medio DMEM con 10% de suero de ternera fetal (STF), 100 u/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomycin, a 37°C, en 5% CO<sub>2</sub>.

EL TNF murino fue obtenido de Boehringer Mannheim GmbH (Alemania).

### Hibridación por Northern

El RNA se obtuvo por el método del guanidinio tiocianato-fenolcloroformo (27), y se analizó por Northern

blot. Para ello, se cargaron 20-35 µg de RNA total en geles de agarosa al 1% con 2.3% formaldehído (28). El RNA fue transferido a membranas de nylon (Genescreen plus, NEN) que se prehibridaron e hibridaron a 65°C en 6xSSC, 5x Denhardt's, 10% sulfato de dextrano, 1% SDS, 100 µg/mL de DNA de esperma de salmón y 100 µg/mL de poly-A. Para la hibridación se añadieron 1.5x10<sup>6</sup> cpm/mL de sonda génica marcada con <sup>32</sup>PCTP. Las membranas se lavaron dos veces en 2x SSPE 15 minutos a temperatura ambiente, una vez en 2xSSPE, 2% SDS 45 minutos a 65°C, y una vez en 0.1x SSPE, 0.1% SDS 15 minutos a 65°C. Las autorradiografías se expusieron a -70°C con el uso de pantallas intensificadoras. Posteriormente las membranas se lavaron y rehibridaron con la sonda de GAPDH para detectar pequeñas diferencias en la carga y transferencia del RNA.

### Citometría de flujo

Los anticuerpos policlonales de conejo anti-Fas murino fueron cedidos generosamente por el Dr. Keith Elkon (Cornell University) (29). Estos anticuerpos reconocen un péptido de 19 aminoácidos (5-23 de la secuencia de Fas maduro).

Para citometría de flujo, las células se cultivaron en presencia de medio control, de citoquinas o de LPS durante 20 a 72h. Las células fueron resuspendidas en tampón fosfato salino/0.1% albúmina sérica bovina, y 5 x 10<sup>5</sup> células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con una dilución 1:20 de anticuerpo anti-Fas y durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fluoresceína (ZYMED, San Francisco, CA). Posteriormente fueron analizadas con un citofluorógrafo. Las células muertas fueron excluidas del análisis. Se estudiaron al menos 10.000 células de cada muestra y los datos se mostraron en una escala logarítmica de intensidad de fluorescencia verde.

### Citotoxicidad

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en presencia o ausencia de suero de ternera fetal 10% o TNF 30 ng/mL. El porcentaje de células muertas se cuantificó mediante tinción con el colorante vital azul trypan.

### Caracterización de la muerte celular como apoptosis

El mecanismo de la muerte celular se identificó como apoptosis en base a criterios morfológicos y funcionales.

Desde el punto de vista morfológico, las células se fijaron en 10% formol, se tiñeron durante 30 minutos en propidio de yodo 0.1 µg/mL, 1 µg/mL RNasa A, PBS pH 7.4 a 37°C, y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

Desde el punto de vista funcional, se puso de manifiesto la fragmentación internucleosomal de DNA típica de la apoptosis. El DNA genómico se obtuvo a partir de muestras celulares o de riñón lisadas en 0.4 mL de tampón de lisis hipotónico con proteínasa K 0.2 mg/mL durante 18h a 55°C. El DNA fue separado en un gel de aga-

rosa al 1.5%, transferido a membranas de nylon e hibridado con DNA murino marcado con  $^{32}$ PCTP (30).

## Resultados

### Factores que regulan la supervivencia de células renales

Observamos que las tres estirpes de células renales estudiadas, células mesangiales, fibroblastos y células tubulares comparten entre sí, y con células extrarrenales, algunos de los estímulos que modifican la supervivencia celular. La privación de suero y la exposición al TNF (30 ng/mL) incrementó la tasa de muerte celular con respecto a controles cultivados en presencia de 10% STF. El efecto fue observable a las 24 horas y aumentó a las 48 horas (Tabla I y Fig. 1)

TABLA I

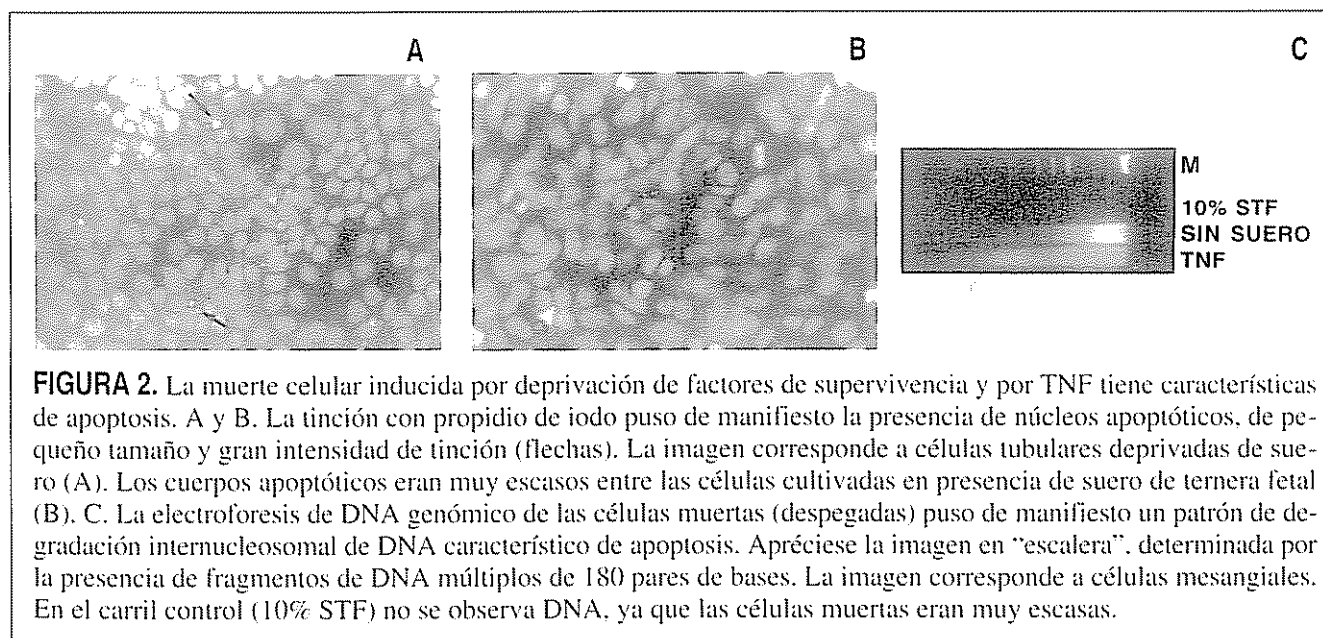
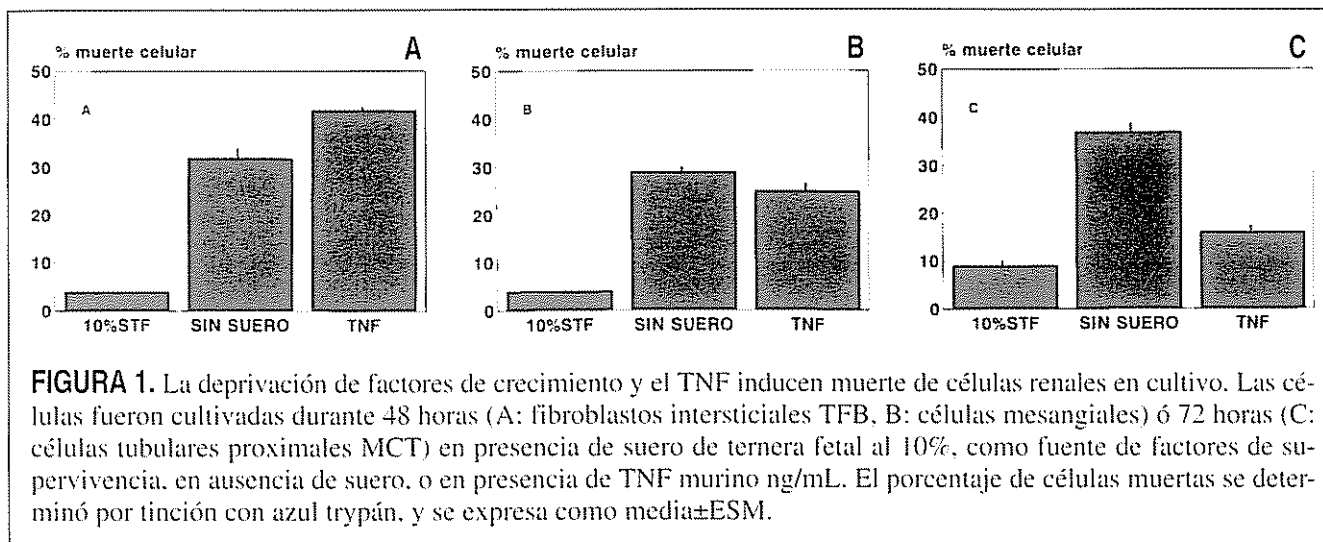
### PORCENTAJE DE CELULAS NO VIABLES TRAS 48 HORAS (TFB Y MESANGIALES) O 72 HORAS (MCT) DE CULTIVO

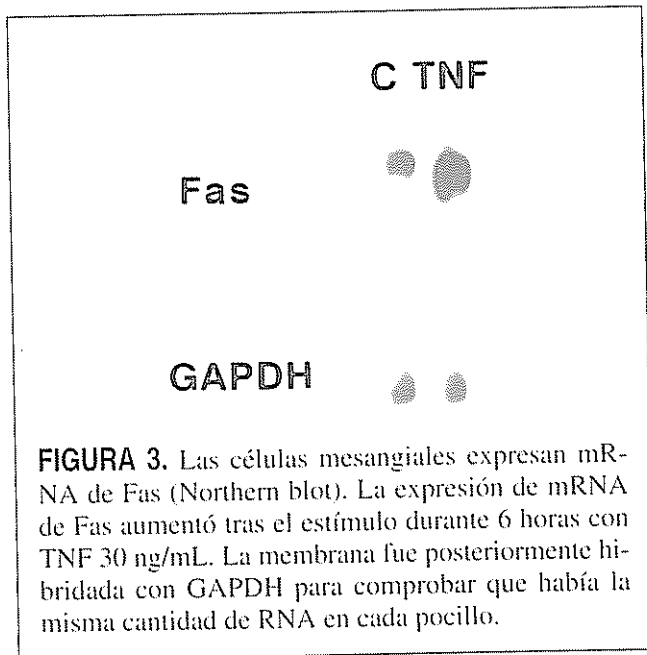
	10% STF	SIN SUERO	TNF
TFB	4.0±0.6	32.3±3.7*	41.9±1.4*
Mesangiales	4.3±0.1	29.1±1*	24.6±2.3*
MCT	9.6±1.0	36.8±2.3*	15.8±0.9*

\*  $p < 0.05$  respecto a control 10% STF

### Caracterización de la muerte celular como apoptosis

La tinción con propidio de yodo permitió observar numerosos cuerpos apoptóticos en las células sometidas a estímulos letales. Los fragmentos nucleares picnóticos, pequeños e hiperdensos se distinguían claramente de los





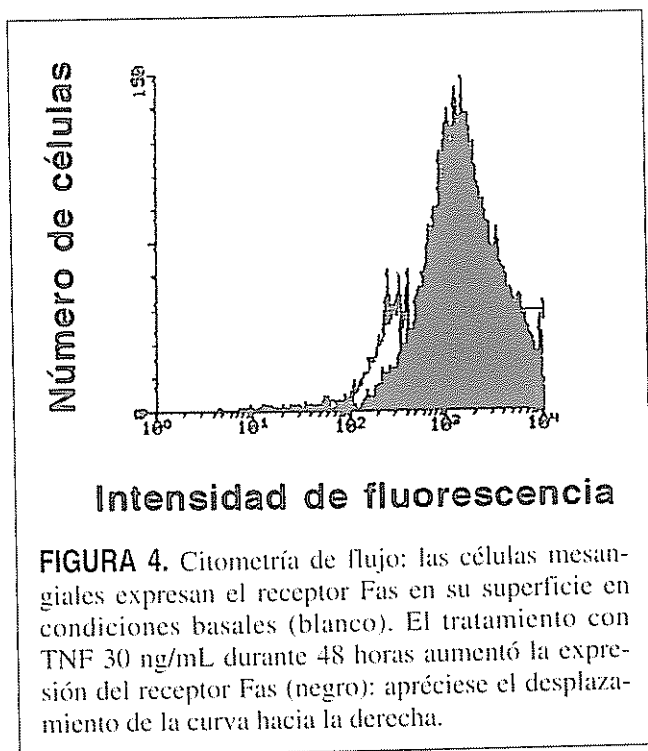
**FIGURA 3.** Las células mesangiales expresan mRNA de Fas (Northern blot). La expresión de mRNA de Fas aumentó tras el estímulo durante 6 horas con TNF 30 ng/mL. La membrana fue posteriormente hibridada con GAPDH para comprobar que había la misma cantidad de RNA en cada pocillo.

núcleos grandes, ovalados y pálidos de las células vivas. (Fig. 2.A y 2.B).

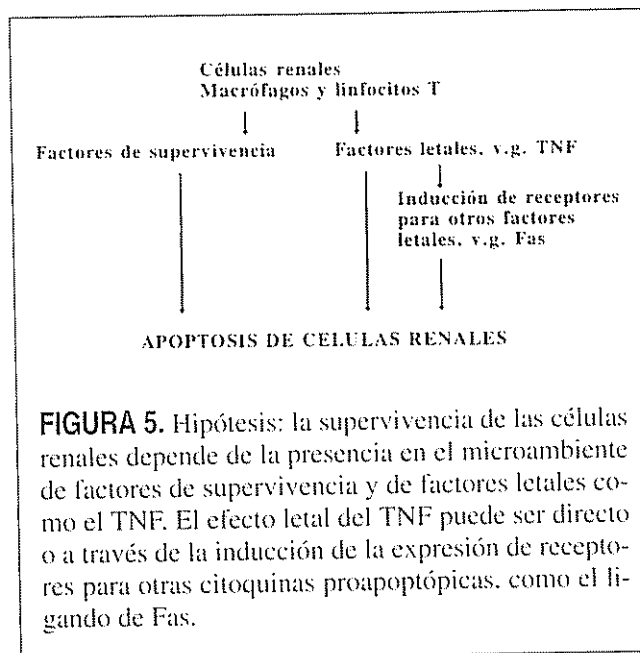
El DNA genómico obtenido de las células sometidas a estímulos letales mostró un patrón de degradación internucleosomal de DNA, que se manifestó como una "escalera" de DNA en la electroforesis, debida a la presencia de fragmentos de 180 pares de bases y múltiplos, sugestiva de apoptosis (Fig. 2.C).

#### Expresión de mRNA de Fas

La hibridación Northern puso de manifiesto que las células mesangiales expresan un transcrito de Fas de



**FIGURA 4.** Citometría de flujo: las células mesangiales expresan el receptor Fas en su superficie condiciones basales (blanco). El tratamiento con TNF 30 ng/mL durante 48 horas aumentó la expresión del receptor Fas (negro): apréciase el desplazamiento de la curva hacia la derecha.



**FIGURA 5.** Hipótesis: la supervivencia de las células renales depende de la presencia en el microambiente de factores de supervivencia y de factores letales como el TNF. El efecto letal del TNF puede ser directo o a través de la inducción de la expresión de receptores para otras citoquinas proapoptóticas, como el ligando de Fas.

2 kb, similar al previamente descrito en timo e hígado. La expresión de mRNA de Fas se incrementó tras el estímulo con TNF 30 ng/mL durante 6 horas (Fig. 3).

#### Expresión de receptor Fas

La citometría de flujo confirmó que las células mesangiales expresan el receptor Fas en su superficie. El tratamiento con TNF durante 48 h. aumentó la expresión de Fas (Fig. 4).

#### Discusión

La muerte celular es tan importante como la proliferación celular en la regulación del número de células de un tejido, así como en la patogenia del daño glomerular y renal. Sin embargo, si bien se conocen con bastante detalle los factores que regulan la proliferación de células renales, los factores que ocasionan muerte celular son poco conocidos. En este trabajo hemos caracterizado factores de supervivencia para células mesangiales glomerulares, tubulares y fibroblastos. Estos estudios pueden ayudar a comprender por qué se acumulan y luego desaparecen células glomerulares en la transición de glomerulonefritis proliferativa a glomerulosclerosis, y por qué las nefropatías crónicas cursan con atrofia tubular, caracterizada por un déficit de células tubulares, y fibrosis intersticial, con un exceso de fibroblastos renales.

Hemos observado que las distintas estirpes de células renales dependen, para no morir, de factores de supervivencia. Al haber utilizado suero como factor de supervivencia, que agrupa un conjunto de citoquinas, no podemos individualizar si los factores de supervivencia son distintos para las diferentes células renales, y si existe la posibilidad de manipulación diferencial de la supervivencia de estas células, mediante el empleo terapéutico de ci-

toquinas recombinantes. Nuestros datos aportan una nueva dimensión al mejor conocimiento del papel que pueda jugar la disminución de la expresión de EGF e IGF-1 durante el fracaso renal agudo (31, 32), así como de los mecanismos del efecto beneficioso de estos factores de crecimiento, que hoy sabemos que son de supervivencia, en el fracaso renal agudo experimental (11).

Las células renales comparten también un factor letal, el TNF, secretado fundamentalmente por monocitos y macrófagos (revisado en 33). Previamente se había demostrado que el TNF juega un papel fundamental en diversas nefropatías, puesto que su administración ocasiona daño renal, su producción está incrementada en patología renal, y el antagonismo selectivo del TNF mejora la evolución de glomerulonefritis y del fracaso renal agudo (34, 35). Es posible que parte de los efectos beneficiosos de los anticuerpos anti-TNF se deban a que evitan la apoptosis de células renales.

El presente trabajo sugiere que, in vivo, la acción letal del TNF procedente de los macrófagos puede verse amplificada por la inducción de otro receptor, Fas, que es activado por una citoquina de los linfocitos T, el ligando de Fas, y cuya única función conocida es inducir apoptosis (20, 21, 36). Estos datos no concuerdan con publicaciones previas que no pudieron demostrar la expresión de mRNA de Fas en el riñón (23). Creemos que esta discrepancia depende de la poca sensibilidad de las técnicas de otros autores, puesto que nosotros hemos demostrado la expresión de Fas en células mesangiales tanto a nivel de mRNA como de proteína. La principal fuente conocida de ligando de Fas son los linfocitos T citotóxicos (tanto CD4+ como CD8+) (8,9, 35). Estos linfocitos, junto a los macrófagos, infiltran el glomérulo y el intersticio en nefropatías glomerulares, tubulointersticiales y en el rechazo de trasplante (13). Esto sugiere que la apoptosis de células renales observada en estas patologías puede depender de la producción de citoquinas letales como TNF y FasL por macrófagos y linfocitos T, respectivamente, así como de un déficit absoluto o relativo, de factores de supervivencia.

En conclusión, la supervivencia de las células renales está regulada por factores letales y de supervivencia. El mejor conocimiento de estos factores puede aportar nuevas estrategias terapéuticas en Nefrología, basadas en la regulación de la apoptosis mediante el empleo de fármacos, citoquinas recombinantes, anticuerpos monoclonales, receptores solubles de citoquinas o terapia génica.

## Agradecimientos

Los estudios presentados han sido financiados por la Sociedad Española de Diálisis y Trasplante. SGC es una becaria de la Fundación Conchita Rábago. JE ha recibido financiación de FISS 94/370.

## Referencias

1. Ortiz-Arduan A, Neilson EG. Apoptotic cell death in renal disease. *Nefrología* 1994;14:391-407
2. Savill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:12-21
3. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994;94: 2105-2116.
4. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, Otoo KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 1992;140:831-838.
5. Gobe GC, Axelson RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischaemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest* 1990;63:770-779.
6. Rodemann HP, Muller GA. Abnormal growth, clonal proliferation and 35S-methionine polypeptide pattern of fibroblasts derived from kidneys with interstitial fibrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195:57-63.
7. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racussen LC, Solez K. Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: morphology and pathogenesis. *Medicine* 1989;68:173-187.
8. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993;177:195-200.
9. Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994;152:1127-1133
10. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
11. Kennedy WA, Buttyan R, Sawczuk IS. Epidermal growth factor suppresses renal tubular apoptosis following ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:738.
12. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11876-11880.
13. D'Amico. Role of interstitial infiltration of leukocytes in glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1988;3:596-600
14. Kelly CJ, Roth DA, Meyers CM. Immune recognition and response to the renal interstitium. *Kidney Int* 1991;31:518-530
15. Weiss RA, Kelly CJ, Madaio MP. Heat shock protein (HSP) reactive T cells eluted from the kidneys of nephritic mice are nephritogenic and cytotoxic to stressed renal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:641
16. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:447-453.
17. Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 1993;259:689-692.

18. Gómez-Chiarri M, Ortiz A, Lerma JL, Mampaso F, González E, Egido E. Involvement of tumor necrosis factor and platelet activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab Invest* 1994;70:449-459
19. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and cell death. *Cell* 1994;76:959-962
20. Yonehara S, Ishi A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of TNF. *J Exp Med* 1989;169:1747-1756.
21. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-305.
22. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364:806-809.
23. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse fas antigen. *J Immunol* 1992;148:1274-1279.
24. Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 1992;140:95-107.
25. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, Neilson EG. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 1988;107:1359-1368.
26. Alvarez RJ, Sun MJ, Haverty TP, Iozzo RV, Myers JC, Neilson EG. Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int* 1992;41:14-23.
27. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
28. Maniatis F, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York Press, 1989.
29. Drappa J, Brot N, Elkon KB. The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain MRL lpr/lpr. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10340-10344.
30. Facchinetti A, Tessarollo L, Mazzocchi M, Kingston R, Collavo D, Biasi G. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods* 1991;136:125-131.
31. Safirstein R, Zelent AZ, Price PM. Reduced renal preproepidermal growth factor mRNA and decreased EGF excretion in ARF. *Kidney Int* 1989;36:810-815.
32. Verstrepen WA, Nouwen EJ, Yue XS, De Broe ME. Altered growth factor expression during proximal tubular necrosis and regeneration. *Kidney Int* 1993;43:1267-1279.
33. Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Bustos C, Alonso J, GómezGuerrero C, Gómez-Garre D, López-Armada MJ, Egido J. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of glomerular diseases. *Adv Nephrol* 1995;24:53-78.
34. Ortiz A, González Cuadrado S, Bustos C et al. Tumor necrosis factor as a mediator of glomerular damage. *J Nephrol* 1995;8 (en prensa).
35. Ortiz A, Egido J. Is there a role for specific anti-TNF strategies in glomerular diseases? *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:309-311.
36. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.