

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal)**



\* 5 3 0 9 5 3 9 4 4 1 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**PARTICIPACION DEL SISTEMA FAS-LIGANDO DE  
FAS EN LA MUERTE CELULAR (APOPTOSIS)  
DURANTE EL DAÑO RENAL**

**Director: Dr. Jesús Egido de los Rios  
Codirector: Dr. Alberto Ortiz Arduan**

**TESIS DOCTORAL**

**Silvia González Cuadrado**

**Madrid, 1995**

Don Jesús Egido de los Rios, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Don Alberto Ortiz Arduan, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid.

### CERTIFICAN

Que D<sup>a</sup> Silvia González Cuadrado, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección las experiencias necesarias para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presenta en Madrid, a 29 de Mayo de 1995.



Fdo. Director: Dr. Jesús Egido de los Rios



Fdo. Codirector: Dr. Alberto Ortiz Arduan



Fdo. Tutora: Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes

Fdo. Doctorando: Silvia González Cuadrado

**A mis padres  
A Begoña y Antonio**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Jesús Egido de los Rios por haberme abierto las puertas del laboratorio y por prestarme su ayuda cuando lo necesité.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por concederme la beca que me ha permitido poder realizar este trabajo.

A Eva González por su constante e incansable apoyo y por no dejar que mis ánimos decayeran.

Muy especialmente a Alberto, por su paciencia y por responderme siempre con una sonrisa. Esta tesis es también fruto de su trabajo.

Al Dr. Raimundo Garcia del Moral por su ayuda en la realización del estudio histológico.

A mis compañeras del laboratorio, Carmen B., Carmen G. y Martita porque siempre me han ayudado y por haberme hecho el trabajo más fácil.

Al resto de los compañeros: Rosario, Benito, Miguel Angel, M<sup>a</sup> José, Itziar, Mónica, Maritina, Raquel, Javi, Sylvia, Natalia, Corina y Puri. No me puedo quejar, todos han aportado su granito de arena.

Para Cristina que empezó conmigo y las circunstancias no permitieron que continuáramos juntas. Ella sabe mejor que nadie lo duro que ha resultado llegar hasta aquí.

En último lugar, pero no menos importante, doy las gracias a mis padres y a mis hermanos por ayudarme todos estos años, aguantando las subidas y, especialmente, las bajadas que han ido surgiendo. Para Manuel que, a pesar de dejarle escribir "letritas", de vez en cuando me dejaba escribirlas a mi. Y para Fernando, el futuro dirá.

Para todos los amigos que no nombro y que han estado ahí durante todos estos años.

El ligando de Fas es una nueva citoquina capaz de activar el programa de la apoptosis en células que expresen el receptor Fas y que posean la maquinaria genética necesaria. El sistema Fas-ligando de Fas juega un papel en la autoinmunidad, las hepatitis y la infección por VIH. La apoptosis inducida por Fas podría colaborar al daño renal en nefropatías glomerulares y tubulointersticiales. Sin embargo, hasta ahora se desconocía si las células renales expresaban Fas y cuales eran las consecuencias de su activación en estas células. En esta tesis hemos abordado la participación de Fas y de su ligando en patología renal. Hemos demostrado que las células renales (mesangiales, tubulares y fibroblastos intersticiales) expresan Fas y su ligando bajo la regulación del LPS y de citoquinas que participan en el daño renal. Los leucocitos que infiltran el riñón (linfocitos y macrófagos) también expresan la citoquina y el receptor, por lo que la interacción entre leucocitos y células renales puede ser bidireccional. Otros autores han demostrado que Fas puede inducir apoptosis y proliferación en leucocitos. Nosotros hemos comprobado que las células renales expresan los genes necesarios para la inducción de la muerte celular por Fas, así como genes protectores. De acuerdo con este hallazgo, **la activación de Fas induce muerte celular y apoptosis de células glomerulares y tubulointersticiales.** Además, Fas tiene otras funciones, como la regulación de la **expresión de genes relacionados con la quimiotaxis.** Hemos aportado datos sobre la capacidad de Fas para causar daño renal in vivo. De hecho, **la inyección de anti-Fas indujo una mesangiolisis** con hematuria y proteinuria. En riñones sanos las células tubulares son relativamente resistentes a la acción de Fas. Por otra parte, Fas también indujo apoptosis hepática. La lesión hepatorenal por Fas se asoció al incremento en la expresión de genes que regulan la quimiotaxis (MCP-1), la supervivencia (bclxL), y la proliferación y muerte celular (c-myc, c-fos). Además, demostramos que en el daño renal durante **la endotoxemia está elevada la expresión renal tanto de Fas como de su ligando** y existe evidencia morfológica y funcional de apoptosis.

En conjunto, estos resultados aportan nuevos datos sobre el papel del Fas en la patogenia de diferentes formas de daño renal. La confirmación definitiva vendrá determinada por la demostración del efecto beneficioso de los antagonistas de Fas en la evolución de las nefropatías.

---

**INDICE****I. INTRODUCCION**

1. PATOGENIA DEL DAÑO RENAL .....	1
2. MUERTE CELULAR: LA APOPTOSIS .....	2
2.1. Características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular programada ...	4
3. APOPTOSIS EN PATOLOGIA RENAL .....	7
4. LA APOPTOSIS ESTA REGULADA POR GENES .....	10
4.1. Estudios en <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	11
4.2. Estudios en vertebrados .....	11
4.2.1. Factores de transcripción .....	13
4.2.2. Proteínas intracelulares letales .....	13
4.2.3. Proteínas intracelulares que promueven la supervivencia celular: sus agonistas y antagonistas .....	14
4.2.4. Citoquinas y receptores .....	15
5. LIGANDO DE FAS Y FAS .....	16
5.1. El receptor Fas .....	16
5.2. El ligando de Fas es una citoquina similar al TNF .....	18
5.3. La activación de Fas induce apoptosis .....	20
5.4. Fas en Fisiopatología .....	20

<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
----------------------------	-----------

**III. MATERIALES Y METODOS**

1. CITOQUINAS Y ANTICUERPOS .....	24
1.1. Anticuerpos .....	24
1.2. Citoquinas .....	24
2. CULTIVOS CELULARES .....	25
2.1. Cultivo de células mesangiales humanas .....	25

---

2.2. Cultivo de líneas celulares .....	26
2.3. Aislamiento de macrófagos peritoneales de rata .....	26
3. ESTUDIOS IN VIVO .....	27
3.1. Modelos experimentales .....	27
3.1.1. Inyección de anticuerpos anti-Fas .....	27
3.1.2. Endotoxemia .....	27
3.2. Procesamiento de las muestras de tejido .....	27
3.3. Estudios histológicos .....	28
3.3.1. Microscopia óptica .....	28
3.3.2. Tinción con propidio de yodo .....	28
3.3.3. Inmunofluorescencia .....	28
3.4. Análisis de la orina .....	29
4. AISLAMIENTO DE RNA Y TECNICAS DE HIBRIDACION .....	30
4.1. Preparación del RNA .....	30
4.2. Transcripción inversa-PCR .....	30
4.3. Preparación de las sondas .....	32
5. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR .....	32
5.1. Cuantificación de la muerte celular. Ensayos de citotoxicidad .....	32
5.1.1. Viabilidad con azul tripán .....	32
5.1.2. Liberación de <sup>51</sup> Cr .....	32
5.2. Caracterización de la apoptosis .....	34
5.2.1. Estudios funcionales: fragmentación del DNA .....	34
5.2.2. Estudios morfológicos .....	34
6. CITOMETRIA DE FLUJO .....	35
7. ESTADISTICA .....	35

#### **IV. RESULTADOS**

1. LAS CELULAS RENALES EXPRESAN FAS Y SU LIGANDO .....	36
1.1. La expresión del RNA mensajero del ligando de Fas está regulada por el TNF .....	36
1.2. Las células renales expresan el receptor Fas .....	39
1.2.1. La expresión del receptor Fas en células mesangiales está regulada por citoquinas y LPS .....	39

1.2.2. Expresión del receptor Fas en la línea celular monocítica U937 .....	41
1.3. Expresión del RNA mensajero de Fas .....	41
1.3.1. El LPS induce la expresión del RNA mensajero de Fas .....	42
1.3.2. Diversas citoquinas inducen la expresión del RNAm de Fas .....	44
2. EL RECEPTOR FAS DE LAS CELULAS RENALES ES FUNCIONAL .....	47
2.1. La activación de Fas induce citolisis y apoptosis de células renales .....	47
2.1.1. Los anticuerpos anti-Fas son citotóxicos para células mesangiales humanas.....	47
2.1.2. Celulas mesangiales murinas .....	52
2.1.3. Los anticuerpos anti-Fas también son tóxicos para fibroblastos intersticiales renales TFB .....	56
2.1.4. Células tubulares renales .....	58
2.1.5. Células monocíticas U937 .....	61
2.2. Fas aumenta la expresión de RNAm de MCP-1 .....	61
2.3. Las células mesangiales murinas expresan genes reguladores de la apoptosis. Efecto de la activación de Fas .....	63
2.3.1. Las células mesangiales expresan de forma constitutiva genes que regulan la acción letal de Fas: bcl2, bax, bag-1 e ICE, así como otros genes reguladores de la apoptosis: bclxL e Ich-1 .....	63
2.3.2. Fas no modifica la expresión de RNAm de bclx-L in vitro .....	64
3. LA ACTIVACION DE FAS INDUCE DAÑO RENAL .....	65
3.1. La lesión renal debida a la estimulación de Fas se caracteriza por hematuria y proteinuria .....	65
3.2. La lesión histológica causada por los anticuerpos anti-Fas es una mesangiolisis .....	66
3.3. Caracterización de la apoptosis .....	70
3.4. Cambios en la expresión de genes que regulan la celularidad tisular durante el daño hepatorenal causada por Fas .....	72
3.4.1. Aumento de la expresión génica de un factor quimiotáctico: MCP-1 .....	73
3.4.2. Aumento de la expresión de un gen regulador de la apoptosis: bclx-L ....	74

---

3.4.3. Aumento de la expresión génica de factores de transcripción implicados en la proliferación y muerte celular: c-fos y c-myc .....	75
4. EXPRESION DE FAS-LIGANDO DE FAS DURANTE EL DAÑO RENAL: ENDOTOXEMIA .....	77
<b>V. DISCUSION</b>	
1. Durante el daño renal tanto las células renales intrínsecas como los leucocitos infiltrantes son fuentes potenciales de ligando de Fas .....	80
2. Las células renales expresan un receptor Fas funcional que causa muerte celular ....	82
2.1. Las células mesangiales expresan constitutivamente los factores que regulan la apoptosis .....	83
2.2. Fas tiene acciones distintas a la muerte celular: MCP-1 .....	84
2.3. Interacción de citoquinas y Fas .....	84
3. Activación de Fas como factor desencadenante de daño glomerular .....	85
3.1. ¿Por qué los ratones MRL-lpr/lpr, que tienen un defecto en la expresión de Fas, sufren una glomerulonefritis grave? .....	87
3.2. Durante el daño renal causado por Fas se activan genes que regulan la supervivencia y muerte celular, la mitosis y la quimiotaxis .....	87
3.2.1. Genes reguladores de la supervivencia celular: bclx-L .....	88
3.2.2. Genes implicados en la muerte y proliferación celular: c-myc y c-fos ..	88
3.2.3. Expresión de un gen que codifica una proteína quimiotáctica: MCP-1 .	89
4. Incremento de la expresión local de ligando de Fas y Fas durante el daño renal. El ejemplo de la sepsis .....	89
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	92
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	93

# **I. INTRODUCCION**

## 1. PATOGENIA DEL DAÑO RENAL

Las lesiones renales de cualquier etiología se caracterizan por tres aspectos fundamentales: cambios en la cantidad y tipo de células, cambios en la cantidad y calidad de la matriz extracelular, y cambios funcionales, no observables por técnicas histológicas. La celularidad renal es el resultado del equilibrio entre tres mecanismos. El número de células aumenta por mitosis (proliferación) de células renales intrínsecas o por quimiotaxis de leucocitos de la sangre periférica. El principal mecanismo de la disminución del número de células sería la muerte celular. El acúmulo de la matriz extracelular, origen de la fibrosis/esclerosis renal, depende del balance entre síntesis y depósito de nueva matriz, y la degradación de la matriz ya depositada. Además existen cambios reversibles de la función tanto de células aisladas, como de las unidades funcionales del riñón.

A pesar de este esquema, aparentemente sencillo, existe un gran margen para la mejoría en los resultados del tratamiento de los grandes síndromes nefrológicos. Entre las asignaturas pendientes de los nefrólogos están el tratamiento de las glomerulonefritis, el tratamiento específico del fracaso renal agudo, sobre todo en su forma más letal, el fracaso renal agudo en el seno de una sepsis, y el enlentecimiento de la progresión de la insuficiencia renal crónica. El diseño de nuevas alternativas terapéuticas pasa por el mejor conocimiento de la patogenia del daño renal. En este sentido, son numerosas las publicaciones en los últimos años sobre la regulación de la proliferación de células renales, sobre los mecanismos de reclutamiento de leucocitos y sobre el control de la síntesis, depósito y degradación de la matriz extracelular. Sin embargo, los estudios sobre la regulación y los mecanismos de la muerte celular en el riñón son mucho más escasos. Este tipo de trabajos nos permitirían comprender por qué, en algunas ocasiones, una lesión glomerular inicialmente hiper celular evoluciona a la recuperación de la celularidad normal y, en otras, a la pérdida casi total de células que caracteriza la esclerosis del glomérulo; por qué se mueren las células tubulares durante el fracaso renal agudo; y por qué las

nefropatías crónicas se caracterizan por pérdida progresiva de las células tubulares (atrofia tubular) y, sin embargo, el número de fibroblastos intersticiales aumenta.

## 2. MUERTE CELULAR: LA APOPTOSIS

En los organismos multicelulares, la homeostasis del número de células se mantiene a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular (**Figura 1**) [Raff, 1992; Steller, 1995]. La muerte celular fisiológica se produce, principalmente, por una forma de suicidio celular denominada apoptosis [Steller, 1995; Arends et al., 1995]. La apoptosis está íntimamente relacionada con su alter ego, la mitosis, de tal forma que los factores de crecimiento son también, en muchas ocasiones, factores de supervivencia. Además, apoptosis y ciclo celular comparten factores de transcripción comunes y un mismo estímulo es capaz de inducir apoptosis y mitosis en células de distinta estirpe [Mangan et al., 1991b; Robaye et al., 1991] o, incluso, en el mismo tipo de células bajo diferentes condiciones microambientales o funcionales [Alderson et al., 1993; Mapara et al., 1993; Nagata et al., 1995b].

La muerte celular programada es un término funcional usado para describir la muerte de la célula como parte normal del ciclo vital. Apoptosis, por otra parte es un término descriptivo ideado por Kerr [Kerr, 1971], que define un tipo de muerte celular que presenta una serie de características morfológicas determinadas.

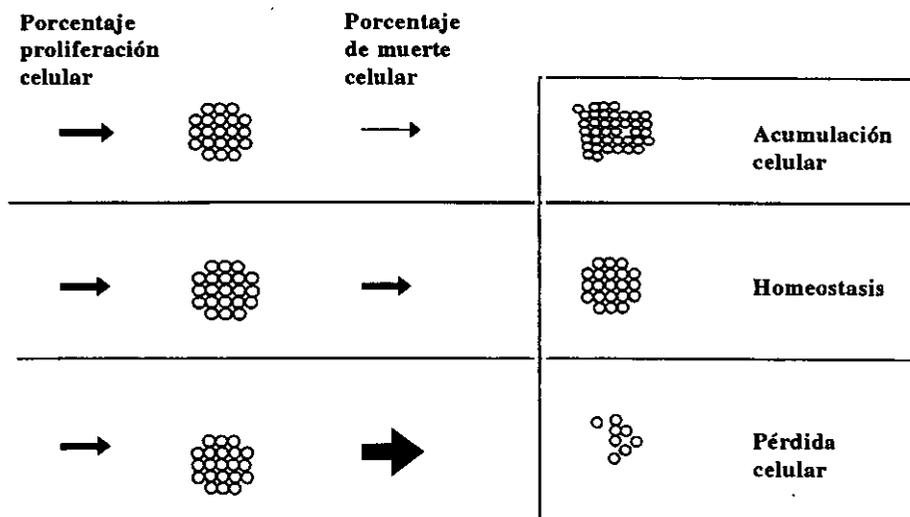
La apoptosis es una manera morfológicamente distinta de muerte celular programada que se produce a través de la activación de un programa de suicidio intrínseco a la célula [Steller et al., 1995]. La maquinaria que conduce a la apoptosis está presente en todas las células de mamíferos en las distintas etapas de su desarrollo, pero la activación del programa que conduce a su muerte está regulado por una amplia variedad de señales diferentes que tienen su origen en el medio intracelular y extracelular.

Los estudios sobre la regulación génica de la apoptosis se realizaron, inicialmente, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y han conducido al aislamiento de genes que son necesarios específicamente para la inducción de la muerte celular programada [Steller, 1995]. Al menos, algunos componentes de la maquinaria apoptótica se han conservado a lo largo de la evolución observándose similitudes entre los insectos, los nemátodos y los

vertebrados [Steller, 1995].

La apoptosis tiene una gran importancia en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos animales [Thompson et al., 1995]. Por ejemplo, es imprescindible en la etapa embrionaria para eliminar las células que no son necesarias, es un mecanismo regulador del número de células en la etapa de adulto y es un mecanismo de defensa para eliminar células dañadas y que son potencialmente perjudiciales para el organismo, tales como linfocitos auto-reactivos, células infectadas por virus o células tumorales. Las últimas investigaciones apuntan a que las alteraciones de la supervivencia celular podrían contribuir a la patología de un gran número de enfermedades humanas, incluyendo cáncer, infecciones virales o enfermedades autoinmunes [Vaux et al., 1994; Thompson et al., 1995].

**Figura 1: La homeostasis del número de células depende de un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. Las proporciones de proliferación y muerte celular están indicadas por el grosor de las flechas. A igual tasa de división celular, una insuficiente tasa de muerte conducirá a una acumulación de células y un exceso de muerte causará una depleción celular.(Reproducido de Thompson CB. Science 1995;267:1457).**



## 2.1. Características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular programada

Es importante distinguir entre necrosis y apoptosis ya que ambos fenómenos suponen la muerte de la célula pero con distintas características. Necrosis implica la muerte de la célula ante el daño de un agente nocivo y no necesita la activación de una serie de genes. En la **Tabla I** se resumen las principales diferencias entre ambas, si bien hay que matizar que existen formas de muerte "mixtas", que comparten características de ambas [Zychlinsky et al., 1991] y que un mismo estímulo puede desencadenar apoptosis y necrosis, dependiendo a veces de su intensidad [Hockenbery et al., 1993].

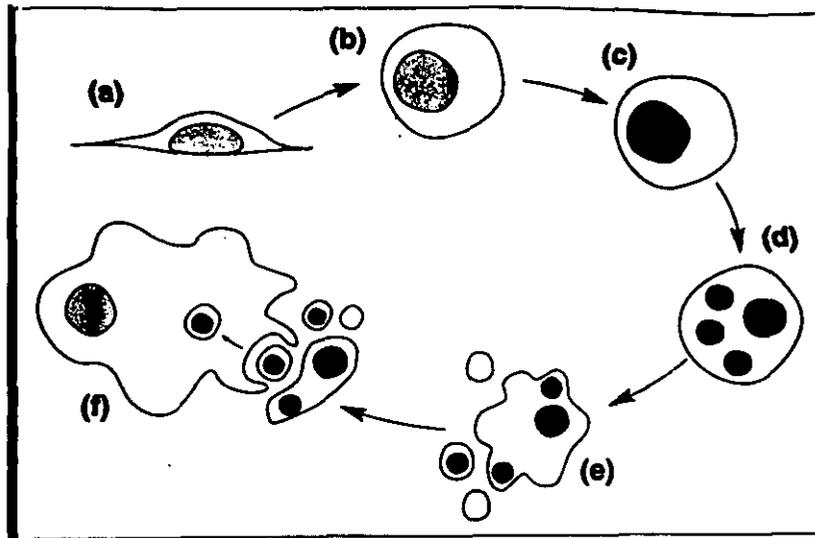
En tejidos la **apoptosis** es poco llamativa histológicamente y esto ha hecho que durante años no se le prestara la debida atención. Existen varias razones para ello. En primer lugar, la apoptosis es un proceso rápido. Se ha calculado que la vida media de la célula apoptótica en un tejido antes de desaparecer fagocitada por células adyacentes, es de alrededor de una hora [Barres et al., 1992]. Por ello, a pesar de que exista una gran tasa de apoptosis en un tejido, en un momento dado sólo se ve un porcentaje bajo de células apoptóticas (frecuentemente  $< 1\%$ ). En segundo lugar, la apoptosis se produce de forma parcheada: está asociada con la muerte de células aisladas y es un proceso asincrónico, mientras que la necrosis afecta a grupos de células adyacentes de una forma sincrónica. En tercer lugar, no suele existir un infiltrado inflamatorio llamativo, ya que la integridad de la membrana se conserva durante un tiempo y la célula es fagocitada por células adyacentes o fagocitos antes de que pueda liberar al medio sustancias inflamatorias.

**Tabla 1: Principales diferencias entre apoptosis y necrosis.**

Características	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Fisiológico	Patológico(daño)
Distribución	Cél. individuales	Grupos de células
Adhesión entre células	Pérdida (temprana)	Pérdida (tardía)
Orgánulos citoplásmicos	Deformación tardía	Deformación temprana
Liberación enzimas lisosomales	Ausente	Presente
Núcleo	Rotura	Desaparece
Cromatina	Condensación	No
Rotura de DNA	Internucleosomal	Inespecífico
Morfología	Cuerpos apoptóticos	Aumento tamaño y desintegración
Fagocitosis	Presente	Ausente
Inflamación	Ausente	Presente

Para el estudio de la apoptosis se suelen aprovechar sus características morfológicas y funcionales [Arends et al., 1991; Suda et al., 1993; Wang et al., 1994]. Desde el punto de vista morfológico, destaca la formación de los llamados cuerpos apoptóticos, producidos como consecuencia de la fragmentación de la célula en vesículas unidas a la membrana que posteriormente se separan y son fagocitadas (**Figura 2**). Desde el punto de vista funcional la característica más habitualmente estudiada es la degradación internucleosomal del DNA, debido a la activación de endonucleasas que lo rompen en fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases. El propósito de la fragmentación no está claro. Podría ser que de esta forma se facilitara la fagocitosis por otras células, que sirviera como una alternativa para destruir el DNA dañado, o simplemente podría ser consecuencia de la redistribución de iones que ocurren durante la apoptosis.

**Figura 2: Cambios morfológicos de la célula apoptótica, con formación de los cuerpos apoptóticos.** La célula apoptótica pierde el contacto con otras células, el núcleo se condensa y tanto el núcleo como otros restos celulares se fragmentan, originando los cuerpos apoptóticos. Estos son rápidamente fagocitados por células adyacentes de tal manera que la vida media de la célula apoptótica se considera de 1-2 horas.



Quizá el concepto más importante en relación a esta forma de muerte celular es el hecho de que está regulada por genes, lo que implica que del conocimiento de estos genes pueden surgir nuevas estrategias terapéuticas basadas en su manipulación mediante fármacos, citoquinas recombinantes o terapia génica. La mayor parte de los estudios que han caracterizado el efecto letal o protector de los distintos genes han cuantificado la muerte celular mediante técnicas clásicas de citotoxicidad, como la liberación de cromo o la tinción con azul tripán [Suda et al., 1993; Wang et al., 1994; Itoh et al., 1993a; Takayama et al, 1995].

### 3. APOPTOSIS EN PATOLOGIA RENAL

El interés por la participación de la apoptosis en patología renal es reciente (**Tabla II**). Este retraso en el reconocimiento de un posible papel de la apoptosis en las nefropatías, puede deberse a la dificultad que ya hemos comentado para observar la apoptosis in vivo. Así, en el sistema nervioso central en desarrollo tasas de apoptosis inferiores al 1% resultan en la pérdida del 50% de la masa celular en 48 horas [Barres et al., 1992]. El porcentaje de células apoptóticas esperable en procesos que tardan años en consumarse, como la atrofia renal de las nefropatías crónicas es, pues, mínimo.

En los últimos años se ha demostrado que existe apoptosis en numerosas patologías renales, que incluyen el fracaso renal agudo de diversas etiologías, la atrofia tubular de la insuficiencia renal crónica, las nefropatías quísticas y las glomerulonefritis [revisado en Ortiz et al., 1994c; Savill, 1994]. El papel preciso de la apoptosis en estas patologías no está claro. Además, existe todavía poca información sobre los factores extracelulares e intracelulares que regulan la apoptosis en los distintos compartimentos del riñón (glomérulo, túbulo, intersticio). Por ello en nuestros estudios hemos empleado células procedentes de cada uno de estos espacios: mesangiales glomerulares, tubulares proximales y fibroblastos intersticiales.

**Tabla II: Enfermedades renales en las que se ha implicado a la apoptosis**

- 
- Desarrollo metanéfrico
  - Fracaso renal agudo: tóxico, isquémico, obstructivo
  - Insuficiencia renal crónica: atrofia renal y fibrosis intersticial
  - Glomerulonefritis y otras inflamaciones renales
  - Autoinmunidad y trasplante
  - Enfermedad renal poliquística
  - Tumores
-

La apoptosis podría, en teoría, participar en distintas fases de la lesión glomerular (Tabla III), y tanto las células glomerulares, como los leucocitos infiltrantes podrían ser fuentes de citoquinas causantes de apoptosis. Así, una regulación anormal de la respuesta inmune conduce al desarrollo de una glomerulonefritis proliferativa autoinmune en ratones transgénicos que hiperexpresan el gen antiapoptótico bcl2 en linfocitos B [Strasser et al., 1991], así como en ratones cuyos linfocitos tienen un defecto en la expresión de ligando de Fas o del receptor Fas [Nagata et al., 1995a]. La participación de la apoptosis en la resolución del daño glomerular ha sido demostrada en un modelo autolimitado de glomerulonefritis proliferativa mesangial [Baker et al., 1994]. En este modelo la apoptosis fue el principal mecanismo de aclaramiento de células que condujo a la normalización de la celularidad glomerular [Baker et al., 1994]. El mantenimiento de esta elevada tasa de apoptosis podría, en teoría, conducir a la depleción celular característica del glomérulo esclerótico. Sin embargo, todavía no hay una demostración firme de que la apoptosis de células renales desencadene el daño glomerular o colabore a su mantenimiento y progresión. Tanto las células residentes glomerulares como los leucocitos infiltrantes podrían ser eliminados por apoptosis y esto podría colaborar en el mantenimiento y progresión del daño glomerular.

**Tabla III: Posible papel de la apoptosis mediada por Fas\* en patología glomerular**

- 
1. Regulación de la respuesta inmune [Nagata et al., 1995b]
  2. Desencadenamiento de la lesión glomerular: sin demostrar
  3. Mantenimiento/progresión de la lesión glomerular: sin demostrar
  4. Resolución de la lesión glomerular [Baker et al., 1994]
- 

\* Esta tabla representa la posible participación de la apoptosis en patología glomerular. Hemos individualizado Fas como uno de los receptores capaces de inducir apoptosis.

Durante el fracaso renal agudo la apoptosis podría ser un mecanismo que colaborase en la muerte de células tubulares. La participación relativa de apoptosis y necrosis podría estar en relación con la intensidad del estímulo desencadenante. Así, una interrupción brusca y mantenida del flujo sanguíneo renal causará necrosis, pero una isquemia más leve y mantenida, como la que se puede observar en pacientes con episodios repetidos de hipotensión severa, favorecería la apoptosis [Schumer et al., 1992; Gobe et al., 1990]. En otras formas de fracaso renal agudo, como la sepsis, las numerosas citoquinas liberadas podrían ser capaces de activar receptores específicos en células tubulares y ocasionar su muerte por apoptosis.

El hecho que caracteriza la atrofia tubular de la insuficiencia renal crónica es la pérdida progresiva de células tubulares a lo largo de años. Este es un claro ejemplo teórico de un proceso asincrónico y sin una respuesta inflamatoria llamativa que podría estar causado por apoptosis. De hecho, se ha comunicado que este parece ser el principal mecanismo de pérdida de células tubulares en esta patología [Gobe et al., 1990, 1991]. Los factores que causan la muerte celular en este contexto son desconocidos, pero la presencia constante de linfocitos T y de macrófagos en el intersticio renal [D'Amico, 1988] sugiere que algunos productos de estas células, como las citoquinas, podrían jugar un papel en el desencadenamiento de la lesión.

Mención aparte merece la acumulación de fibroblastos que se produce en el intersticio renal de los pacientes con insuficiencia renal crónica. Realmente no se sabe como se produce esta acumulación. Posibles orígenes son la transdiferenciación de células tubulares [Strutz et al., 1994] y la proliferación de fibroblastos. En cualquier caso, una insuficiente tasa de apoptosis puede colaborar en esta patología a la acumulación celular, tal y como lo sugiere el hecho de que los fibroblastos humanos aislados de riñones fibróticos sobreviven más tiempo en cultivo que los procedentes de riñones sanos [Rodemann et al., 1990].

#### 4. LA APOPTOSIS ESTA REGULADA POR GENES

Las primeras sugerencias de que la apoptosis está producida por un programa de suicidio celular activo, derivan de experimentos en los cuales la muerte celular se puede suprimir con inhibidores de la síntesis de RNA o de proteínas [Schwartz et al., 1990]. Sin embargo, posteriormente se ha visto que en otras ocasiones estos inhibidores fracasan a la hora de bloquear la apoptosis e incluso pueden inducirla, lo que sugiere que las moléculas efectoras de la apoptosis están presentes en la mayoría de las células de mamíferos [Raff et al., 1993]. La principal evidencia de que las proteínas necesarias para causar apoptosis están constitutivamente expresadas en determinadas células, parte de los experimentos realizados con células a las que se les ha quitado el núcleo [Jacobson et al., 1994]. Si a estos citoplastos se les retiran los factores de supervivencia o se les trata con altas concentraciones del inhibidor de las proteínas quinasas, estaurosporina, experimentarán todos los cambios citoplásmicos que son característicos de la apoptosis. El requerimiento de síntesis de proteínas y de RNA para la inducción de la muerte celular en determinadas situaciones, puede reflejar la necesidad de sintetizar moléculas que activen o repriman la maquinaria de muerte celular existente, más que la necesidad de nuevos componentes para el propio programa de muerte celular básico.

Si las proteínas efectoras apoptóticas están presentes en las células vivas, su actividad letal debe estar suprimida. Raff [Raff, 1992] ha propuesto que estas células están preparadas para suicidarse y necesitan continuamente señales de otras células para sobrevivir. Muchos tipos diferentes de células en mamíferos [Raff, 1992, 1993] necesitan factores extracelulares, producidos por otras células, para sobrevivir. Este control social de la supervivencia garantiza el mantenimiento de un número determinado de células en un tejido concreto.

#### 4.1. Estudios en *Caenorhabditis elegans*

Muchos de los conocimientos actuales sobre los genes implicados en la apoptosis se deben a los estudios realizados en este nemátodo [Steller et al., 1995]. Esta especie tiene 1090 células somáticas, 131 de las cuales mueren en unos determinados estadios de su desarrollo. Existen una serie de mutaciones, denominadas *ced*, que bloquean o aceleran la pérdida de estas células. La muerte celular programada en *C. elegans* se divide en cuatro estadios distintos. Estos incluyen la decisión de si una célula debe morir o pasar a otro estadio, la muerte en sí de la célula (la ejecución de la muerte), la eliminación de la célula muerta por los fagocitos y la degradación del cadáver fagocitado. Se han aislado mutaciones que afectan a cada uno de estos pasos y se han definido 14 genes que funcionan en la muerte celular programada del nemátodo. Existen tres genes fundamentales que funcionan en el paso que implica la consumación de la muerte de la célula, estos son *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*. La activación de los dos primeros promueve la muerte y la activación de *ced-9* protege de este hecho. *Ced-9* es homólogo a una familia de proteínas reguladoras de la muerte celular en mamíferos relacionadas con Bcl-2 [Vaux et al., 1992] y *ced-3* es similar a una proteasa de mamíferos, la convertasa de la IL-1 $\beta$  (ICE) [Yuan et al., 1993]. Hasta el momento no se conoce el homólogo de *ced-4*.

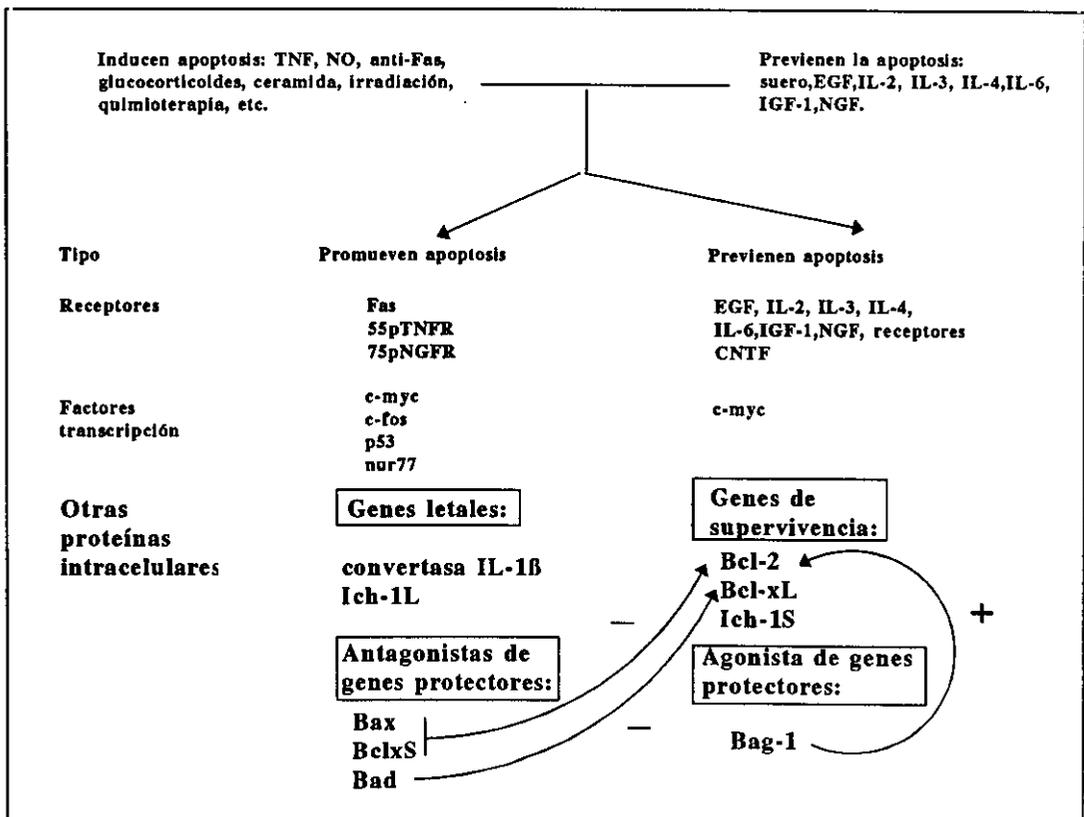
#### 4.2. Estudios en vertebrados

La conservación de algunos de los componentes moleculares de la apoptosis entre *C. elegans* y humanos, ha apoyado la idea de que la apoptosis es una opción característica de todas las células animales. Sin embargo, la apoptosis en vertebrados es más compleja ya que su regulación está influenciada por una serie de estímulos externos, letales y de supervivencia. La **tabla IV** resume algunos de los estímulos capaces de regular la supervivencia celular. Estos podrían, a su vez, activar los componentes ya expresados de la maquinaria letal o, mediante la acción de factores de transcripción, modificar la expresión de los genes que van a condicionar el que la célula se dirija o no hacia la muerte (**Figura 3**).

**Tabla IV: Factores que regulan la supervivencia y la muerte celular**

<p><b>Factores de supervivencia</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Citoquinas: factores de crecimiento/ supervivencia</li> <li>2. Matriz extracelular</li> <li>3. Lípidos: andrógenos</li> <li>4. Drogas</li> <li>5. Virus</li> </ol> <p><b>Factores letales</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Citoquinas letales: TNF, ligando de Fas, eliminación factores crecimiento/supervivencia</li> <li>2. Lípidos: glucocorticoides, ceramida, tromboxano A2, etc</li> <li>3. Pequeñas moléculas: NO, radicales libres, etc</li> <li>4. Factores físicos: calor, radiación, etc</li> <li>5. Drogas y toxinas: quimioterapia del cancer, CsA, etanol, etc.</li> <li>6. Virus</li> </ol>
--

**Figura 3: Genes que inducen y previenen la apoptosis.** La activación de receptores celulares por citoquinas y otros productos que regulan la supervivencia y muerte celular producirían una activación de segundos mensajeros intracelulares y factores de transcripción. Estos, a su vez, modularían la expresión y/o actividad de las proteínas intracelulares reguladoras de la apoptosis. Existen proteínas que inducen muerte celular y proteínas que protegen. Además, existen factores que modulan la actividad de estas últimas. Así, bclxS y bax se unen a bcl-2 inactivándola, y bad antagoniza a bclxL. Por el contrario, bag-1 potencia el efecto protector de bcl-2.



#### 4.2.1. Factores de transcripción

Utilizando estudios de transfección de genes, animales "knock-out" u oligonucleótidos antisentido, se han implicado varios factores de transcripción en la apoptosis. Los factores de transcripción que regulan la apoptosis pueden participar también en la regulación del ciclo celular. Así, por ejemplo, **c-myc** tiene un papel doble en promover la muerte y la proliferación dependiendo de la presencia o no de factores de crecimiento en el medio: la hiperexpresión de **c-myc** en ausencia de factores de crecimiento/supervivencia causa apoptosis [Evan et al., 1992]. En algunas circunstancias **c-myc** puede favorecer la supervivencia celular [Thompson et al., 1992]. **c-fos** forma homo y heterodímeros para constituir el factor de transcripción AP-1. Su expresión es rápida y transitoria y se le ha relacionado con la apoptosis inducida por la privación de factores de crecimiento en líneas celulares dependientes de IL-2 y IL-6 [Collata et al., 1992]. Por otra parte, **c-fos** también puede participar en la proliferación celular [Vamvakas et al., 1993].

**p53** es una fosfoproteína nuclear con características de factor de transcripción. Se ha estudiado bastante ya que se encuentra mutado en un amplio número de tumores animales y humanos [Perry et al., 1993]. **p53** participa en situaciones donde el DNA necesita ser reparado, deteniendo a la célula en la fase G1 del ciclo celular para dar tiempo a que la célula sea reparada antes de seguir con la división celular [Perry et al., 1993]. Además, **p53** es imprescindible para ciertas formas de apoptosis [Lane, 1993]. Aunque su papel en la misma no está claro, se sabe que disminuye la transcripción del gen protector **bcl2** y aumenta la de su antagonista, **bax** [Miyashita et al., 1995].

**nur77** es otro factor de transcripción que, dependiendo de su forma de activación, participa en la proliferación o muerte de timocitos [Liu et al., 1994].

#### 4.2.2. Proteínas intracelulares letales

Entre las proteínas capaces de desencadenar la muerte celular se encuentran los miembros de la familia de proteínas similares a la enzima de conversión de la IL-1 $\beta$  (**ICE**). **ICE** es una proteasa que procesa el precursor de la IL-1 $\beta$  de 31 kD en su forma proinflamatoria de 17 kD. **ICE**, asimismo, es sintetizado como una proenzima inactiva que

se autoprocresa a un tetrámero activo compuesto de dos subunidades de 10 kD y dos de 20 kD. Aunque las funciones fisiológicas de ICE en mamíferos son desconocidas, la sobreexpresión de ICE y de sus homólogos en líneas celulares transfectadas inducen apoptosis [Miura et al., 1993]. Este efecto se reduce cuando ICE es coexpresado con bcl-2. Recientemente se ha descrito que los timocitos de ratones carentes de ICE funcional son resistentes a la acción letal de Fas, a pesar de expresar este receptor [Kuida et al., 1995]. Esto sugiere que ICE juega un papel fundamental en la muerte celular inducida por Fas [Kuida et al., 1995].

**Ich-1** es un gen homólogo a ICE que codifica dos proteínas [Wang et al., 1994]. Ich-1L promueve la muerte celular al igual que ICE. Por el contrario, Ich-1S favorece la supervivencia celular.

#### **4.2.3. Proteínas intracelulares que promueven la supervivencia celular: sus agonistas y antagonistas**

La mayor parte de las proteínas que promueven la supervivencia celular pertenecen a la familia de proteínas similares a bcl-2 [Steller et al., 1995]. Bcl-2 es un potente represor de la muerte celular debida a agentes tan distintos como citoquinas, irradiación, venenos metabólicos, agentes anticancerosos, algunos virus y eliminación de factores de supervivencia [Reed, 1994]. En concreto, bcl-2 protege frente a la muerte celular inducida por TNF y Fas [Itoh et al., 1993a; Takayama et al., 1995; Reed et al., 1994], aunque no todos los autores han comunicado los mismos resultados [Chiu et al., 1995]. Esto puede deberse al hecho de que existen proteínas que se unen a bcl-2 y modifican su función, de tal manera que los niveles relativos de expresión de bcl-2 y de sus proteínas reguladoras, más que la expresión de bcl-2, son los que determinan la sensibilidad de la célula a la muerte celular. Así, bax y bclxS, proteínas similares a bcl-2, antagonizan su efecto protector [Oltvai et al., 1993; Boise et al., 1993] y Bag-1 lo potencia [Takayama et al., 1995]. El efecto protector de bcl-2 se ha relacionado con su capacidad para impedir la formación o la actuación de los radicales de oxígeno [Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993]. Bcl-2 puede jugar un papel en patología renal, ya que los ratones que carecen de bcl-2 funcional ("knock-out") desarrollan lesiones renales caracterizadas por atrofia tubular con formación de quistes que recuerda a la atrofia tubular de las nefropatías

crónicas. En este modelo también existen lesiones proliferativas glomerulares similares a las semilunas de las glomerulonefritis rápidamente progresivas [Veis et al., 1993].

**Bcl-x** también pertenece a la familia de **bcl-2**. Por splicing alternativo de un único gen se producen dos isoformas, **bcl-xS** y **bcl-xL**, que protegen de la apoptosis inducida por privación de factores de supervivencia o por exposición al fármaco nefrotóxico ciclosporina A [Boise et al., 1993; Gottschall et al., 1994]. Al igual que **bcl2**, **bclxL** tiene un antagonista endógeno, **Bad**, recientemente descrito [Yang et al., 1995]. **BclxS** antagoniza el efecto protector de **bcl2** [Gottschall et al., 1994]. Hemos de recordar aquí, que a diferencia de las proteínas similares a ICE; **bax**, **bclxS** y **Bad** no inducen muerte celular por si solas cuando las células se cultivan en un microambiente de citoquinas apropiado.

#### 4.2.4 Citoquinas y receptores

Nuestro interés se ha centrado en los factores que, como las citoquinas, modifican la supervivencia celular por medio de la activación de receptores. En este caso la activación del receptor originaría la actuación de una cascada de segundos mensajeros intracelulares. Los factores de supervivencia de las células renales son mal conocidos. Se ha descrito que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un factor de supervivencia para células tubulares [Coles et al., 1993]. Adicionalmente, factores como el factor de crecimiento derivado de insulina 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que promueven la supervivencia de células extrarenales [Rawson et al., 1991; Rodriguez et al., 1992], juegan un papel en patología renal [Johnson et al., 1993; Miller et al., 1992] y podrían estimular la supervivencia celular en el riñón. Entre las citoquinas letales tienen un especial interés en nefrología las que son producidas por las células que infiltran el riñón en procesos patológicos, los macrófagos y los linfocitos T [D'Amico et al., 1988].

El TNF es el principal representante de las citoquinas citotóxicas producidas por los macrófagos. Además, los linfocitos T citotóxicos y las células natural killer, inducen la muerte de sus células diana a través de moléculas expresadas sobre su superficie o por citoquinas producidas por estas. El TNF $\alpha$  o el TNF $\beta$  son algunas de estas moléculas [Schmid et al., 1986]. El TNF cumple los criterios que han sido sugeridos para considerar

que una citoquina participa en la patogenia de las lesiones renales [Johnson et al., 1993]. Así, su producción está aumentada localmente durante el daño renal, tiene acciones sobre células renales, la administración in vivo causa e incrementa el daño renal, y los antagonistas mejoran la evolución de diversas nefropatías [revisado en Ortiz et al., 1995]. La citotoxicidad podría ser uno de los mecanismos de la influencia adversa del TNF sobre el daño renal. Así, el TNF es citotóxico para células mesangiales y epiteliales glomerulares cultivadas [Gómez-Chiarri et al., 1994] y la inyección de TNF causa necrosis tubular aguda [Gresser et al., 1987]. El mecanismo de la citotoxicidad del TNF en células renales podría ser la apoptosis [Ortiz et al., 1993, 1994b]. El TNF es capaz de inducir apoptosis en células endoteliales, oligodendrocitos y células tumorales [Robaye et al., 1991; Obeid et al., 1993; Louis et al. 1993]. El TNF posee dos receptores, TNFR1 de 55kD, y TNFR2 de 75kD [Smith et al., 1994]. Existen formas solubles de ambos que se han utilizado para antagonizar los efectos del TNF [Smith et al., 1994]. La citotoxicidad del TNF depende fundamentalmente de la activación de los receptores de 55 kD (TNFR1) [Tartaglia et al., 1993]. Estos receptores pertenecen a una superfamilia de receptores, en la que está incluido el receptor Fas, recientemente descrito, que es capaz de inducir apoptosis.

## **5. LIGANDO DE FAS Y FAS**

El ligando de Fas es un representante de las citoquinas citotóxicas producidas por los linfocitos T. Comentaremos primero Fas ya que su descubrimiento precedió al de su ligando.

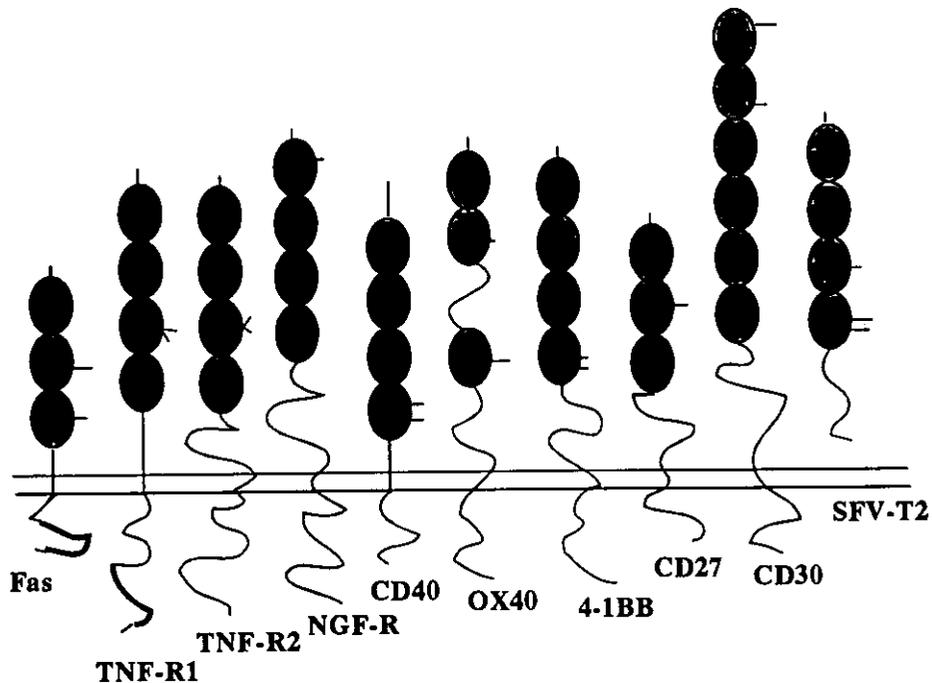
### **5.1. El receptor Fas**

En 1989 dos grupos independientes [Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989] aislaron unos anticuerpos monoclonales derivados de ratón, que eran citolíticos para varias líneas celulares humanas. Las proteínas de la superficie celular reconocidas por estos anticuerpos se llamaron Fas y APO-1. La purificación y clonaje molecular de ambas permitió descubrir que eran la misma. El clonaje del DNA complementario (DNAC) para

el antígeno Fas a partir de una librería de DNAC de un linfoma humano [Itoh et al., 1991], reveló que Fas es una proteína de membrana tipo 1 que pertenece a la familia de receptores del TNF (Figura 4). El Fas humano consta de 325 aminoácidos con una secuencia señal en el NH<sub>2</sub>- terminal. El estudio de la estructura indicó su similitud con el TNFR1 [Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992]. Análisis funcionales de Fas, indicaron que las células tratadas con anticuerpos anti-Fas humano transducen una señal apoptótica y que los anticuerpos anti-Fas funcionan como agonistas. Posteriormente se describieron también anticuerpos que activan Fas murino [Ogasawara et al., 1993].

El patrón de expresión de Fas es bastante variable en los distintos tejidos y líneas celulares. En ratones, se expresa abundantemente en timo, hígado, corazón, pulmón, y ovario [Watanabe-Fukunaga et al., 1992b]. Sin embargo, en este estudio pionero no se pudo demostrar RNAm de Fas en el riñón. Al igual que ocurre en timocitos murinos, existe una pequeña expresión de Fas en timocitos humanos. Fas se expresa en casi todas las poblaciones de timocitos, excepto en las CD4- CD8- [revisado en Nagata et al., 1995] y tiene una elevada expresión en linfocitos maduros activados [Trauth et al., 1989]. Algunas células tumorales también expresan Fas, aunque sus niveles son más bajos que los observados en las células linfoblastoides [Nagata et al., 1995b]. La expresión de Fas está regulada en varias líneas celulares por IFN $\gamma$  [Yonehara et al., 1989; Itoh et al., 1991] y por IFN $\gamma$  más TNF $\alpha$  en células B humanas [Moller et al., 1993]. Esto podría explicar el aumento de la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-Fas cuando se les pone junto con estas citoquinas [Yonehara et al., 1989]. Sin embargo, se conocen mal los factores que regulan su expresión en células no linfoides. Concretamente, no pudo demostrarse que el LPS indujera su expresión en macrófagos [Watanabe-Fukunaga et al., 1992b]. Al igual que ocurre con los receptores del TNF existen formas solubles de Fas que antagonizan los efectos de su ligando, y que podrían ser usadas terapéuticamente [Cheng et al., 1994].

**Figura 4:** Familia de receptores similares al TNF donde se incluye el receptor Fas. El dominio que activa la muerte celular del receptor 1 del TNF y del Fas se representa con un trazo mas grueso en el dominio citoplasmático. (Reproducido de Nagata et al. Science 1994;267:1450).



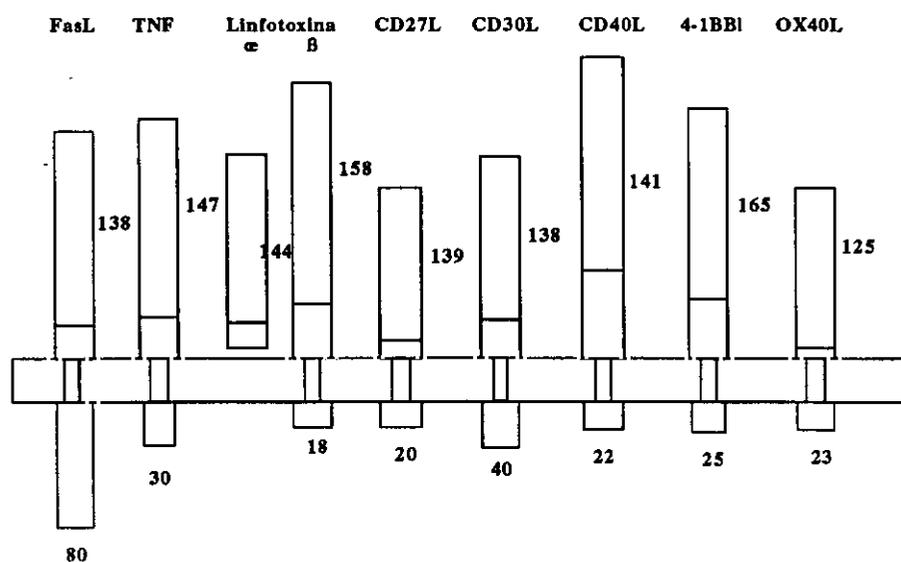
## 5.2. El ligando de Fas es una citoquina similar al TNF

La estructura de Fas sugería que era el receptor de una citoquina hasta el momento desconocida. Los trabajos de Rouvier [Rouvier et al., 1993] identificaron el ligando de Fas en un hibridoma de linfocitos T citotóxicos (CTL) (PC60), generado por la fusión de una línea celular de CTL de ratón y un linfoma de rata. Una sublínea de la anterior (PC60-d10S) era capaz de matar las células que expresaban Fas pero no aquellas que no lo expresaban. Construyendo formas solubles de Fas y del receptor del TNF, comprobaron que solo las de Fas eran capaces de inhibir la actividad de las células d10S, indicando que estas expresan un ligando para Fas que, además, juega un papel en la citotoxicidad.

El ligando de Fas se purificó de homogeneizados de las fracciones de membrana de las células d10S16 (sublínea de la d10S que expresa 100 veces más ligando de Fas) y se caracterizó como una proteína de, aproximadamente, 40 kD [Suda et al., 1994]. El ligando de Fas no tiene secuencia señal en el N-terminal, pero tiene un dominio de aminoácidos hidrofóbicos en el centro de la molécula, indicando que es una proteína de

membrana tipo 2, con la región C-terminal orientada hacia la cara extracelular de la membrana celular. Los ligandos de Fas humanos y murinos comparten un 76,9% de aminoácidos iguales y son funcionalmente intercambiables [Nagata et al., 1995b]. Aproximadamente 150 aminoácidos de la región extracelular del ligando de Fas, tienen homología con los miembros de la familia del TNF (Figura 5). La expresión del ligando de Fas recombinante en la superficie de células COS (línea celular derivada de riñón similar a fibroblastos), fue suficiente para inducir la muerte de células que expresaban Fas, indicando que el ligando de Fas es un factor de muerte y que Fas es su receptor [Suda et al., 1993]. El RNAm del ligando de Fas es expresado en esplenocitos y timocitos activados y en varios tejidos no linfoides, como los testículos [Suda et al., 1993]. Sin embargo, no se ha demostrado su expresión por células parenquimatosas, ni se conocen los factores que la regulan.

**Figura 5: Familia de citoquinas similares al TNF.** Son todas proteínas de membrana tipo 2, excepto la subunidad  $\alpha$  de la linfoxina que es una proteína secretoria con homología en la porción extracelular de la molécula. Se muestra el número de aminoácidos de la región homóloga y de la citoplásmica. (Reproducido de Nagata et al. Science 1995;267:1450).



### 5.3. La activación de Fas induce apoptosis

Los estudios pioneros con anticuerpos monoclonales demostraron que la activación de este receptor ocasionaba apoptosis. Estos hallazgos se confirmaron cuando se obtuvo el ligando de Fas. Sin embargo, la activación de Fas no ocasiona apoptosis de todas las células que lo expresan. Así, hay células como los linfocitos de sangre periférica que son resistentes a la acción letal de Fas. Es más, en linfocitos que expresan grandes cantidades de bcl2 [Mapara et al., 1993] y en los expuestos a un microambiente de citoquinas favorables [Alderson et al., 1993] Fas es capaz de inducir proliferación. En la actualidad se conocen algunos de los genes que regulan la letalidad de Fas. Así se sabe que bcl2 protege y que Bag-1 potencia esta protección [Takayama et al., 1995]. Por el contrario, ICE es un mediador imprescindible de la letalidad por Fas [Kuida et al., 1995]. Hasta el momento no se conocen acciones adicionales de Fas, pero su similitud con el TNFR1 [Itoh et al., 1993b], el receptor que media la mayor parte de las acciones del TNF, permite sospechar que Fas debe tener otros efectos.

### 5.4. Fas en fisiopatología

La participación del sistema ligando de Fas y Fas en fisiopatología se ha identificado en la eliminación de linfocitos normales activados y en células infectadas por virus (Tabla V). En este sentido, Fas participa en la citotoxicidad de los linfocitos T [Rouvier et al., 1993; Stalder et al., 1994].

La pérdida de su función debido a mutaciones de Fas o de su ligando en ratones ocasiona que se acumulen los linfocitos y produce enfermedades autoinmunes [Nagata et al., 1995]. Se han caracterizado dos cepas mutantes en el ratón MRL, la lpr está causada por una inserción de un endotransposon en el gen Fas que causa una gran disminución de la transcripción de RNAm de Fas, y la gld en la cual la mutación se encuentra en el gen que codifica el ligando de Fas [Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992a]. Los ratones MRL/lpr y MRL/gld desarrollan linfadenopatía y esplenomegalia y producen grandes cantidades de anticuerpos IgG e IgM. Los ratones mueren de nefritis o artritis aproximadamente a los cinco meses de edad. El estudio de estas dos cepas mutantes ha permitido el avance en la comprensión del sistema Fas y su ligando.

Tabla V: Acciones conocidas de Fas.

**Acciones de Fas in vitro:**

1. Muerte de linfocitos
2. Citotoxicidad mediada por células T: apoptosis de células no linfoides
3. Proliferación de linfocitos

**Fas en fisiopatología:**

1. Enfermedades autoinmunes en ratón
2. Muerte de células T CD4+ en la infección por VIH
3. Hepatitis fulminante en ratón
4. ¿Patología renal?

Una inyección de anticuerpos anti-Fas causa apoptosis masiva del hígado y muerte de ratones adultos al cabo de unas pocas horas [Ogasawara et al., 1993], lo que sugiere que las hepatitis fulminantes en humanos podrían estar mediadas por Fas. Avalan esta hipótesis la acumulación de linfocitos T citotóxicos en estas hepatitis [Ando et al., 1993], la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas de cultivos primarios de hepatocitos [Ni et al., 1995] y la elevada expresión de Fas en hepatocitos transformados con el virus C de la hepatitis [Hiramatsu et al., 1994]. En este sistema los antígenos víricos expresados sobre los hepatocitos podrían activar a los linfocitos T citotóxicos para que expresaran el ligando de Fas, el cual se uniría a Fas provocando la muerte de los hepatocitos.

Todos estos datos sugieren que el sistema de Fas tiene un papel en patología humana a través, al menos, de dos vías diferentes de actuación. Un tipo de enfermedades podrían estar causadas por un defecto del sistema que produciría desórdenes de la inmunidad. Otro tipo de enfermedades relacionadas con Fas serían producidas por una actividad excesiva que podrían producir hepatitis fulminantes [Ogasawara et al., 1993] o muerte de células T durante la infección por VIH ya que se conoce que Fas se expresa abundantemente en linfocitos T de niños infectados con el VIH [Debatin et al., 1994].

Fas también se expresa en otros órganos como corazón y pulmón [Watanabe-Fukunaga et al., 1992b], por lo que podría participar en la patología de estos órganos. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con el TNF, existe muy poca información sobre su participación en la patogenia de las nefropatías. En concreto, no se ha demostrado la presencia de Fas en el riñón [Watanabe-Fukunaga et al., 1992b]; se desconoce si la activación de Fas induce respuestas biológicas en células renales; tampoco se ha comunicado que la activación in vivo de Fas ocasione lesión renal [Ogasawara et al., 1993]; y no se sabe si existe un efecto beneficioso del tratamiento con antagonistas de Fas en patología renal. En esta tesis hemos explorado algunas de estas posibilidades.

## **II. OBJETIVOS**

El objetivo de esta tesis es caracterizar el posible papel del sistema ligando de Fas-Fas en patología renal en general y, más concretamente, en las variaciones del número de células que caracteriza a diversas nefropatías. Para ello hemos establecido objetivos parciales en la línea de los criterios propuestos por otros autores para considerar que una citoquina participa en la patogenia de las nefropatías [Johnson et al., 1993]:

1. Establecer si las células renales y los leucocitos que infiltran el riñón expresan el ligando de Fas y su receptor, y si las citoquinas que participan en el daño renal regulan esta expresión.
2. Estudiar las respuestas biológicas que desencadena la activación de Fas en células renales en cultivo.
3. Estudiar la capacidad de agonistas de Fas para causar daño renal in vivo.
4. Demostrar que la expresión local de Fas y de su ligando está incrementada durante el daño renal.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

## 1. CITOQUINAS Y ANTICUERPOS

### 1.1. Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal anti-Fas murino Jo2 es una IgG de hamster (Pharmingen, San Diego, CA), que reconoce y activa específicamente el Fas de ratón. Estos anticuerpos se emplearon para estudios funcionales. Como control se utilizó una IgG de hamster (Pharmingen). Los anticuerpos policlonales de conejo anti-Fas murino fueron un regalo del Dr. Elkon (U. Cornell) [Drappa et al., 1993]. Estos anticuerpos se emplearon para citometría de flujo.

El anticuerpo monoclonal anti-Fas humano (clon CH-11) es una IgM de ratón que se obtuvo de Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, NY). Reconoce y activa el antígeno Fas expresado en células humanas. Como control se usó una IgM monoclonal murina.

La contaminación por endotoxina de anti-Fas es, en ambos casos, menor de 0.05 ng/mL (según indicaciones del fabricante).

Los anticuerpos neutralizantes anti-TNF $\alpha$  murinos se consiguieron de R&D systems (Minneapolis, USA) y se usaron según las instrucciones.

Anticuerpo anti-C3 murino marcado con fluoresceína (Quidel, USA).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-clusterina de rata (Quidel, USA).

### 1.2. Citoquinas

Las citoquinas recombinantes humanas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , y el TNF $\alpha$  murino recombinante proceden de Boehringer Mannheim GmbH, Alemania.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1. Cultivo de células mesangiales humanas

Las células mesangiales humanas se obtuvieron de riñones de cadáveres no considerados adecuados para el trasplante mediante técnicas previamente descritas [Gómez-Guerrero et al., 1993]. Los glomérulos se aislaron por diferencia de tamaño, haciendo pasar el tejido renal a través de tamices de distinto poro. Primero los riñones se decapsularon y la corteza se separó de la médula. A continuación, la corteza renal se pasó por un tamiz de 105  $\mu\text{m}$  y el homogeneizado resultante se lavó sobre un tamiz de 75  $\mu\text{m}$  con tampón Dulbecco estéril. La porción retenida sobre el segundo tamiz se resuspendió en tampón Dulbecco pH 7,4 y se incubó con 500 U/ml de colagenasa tipo IA (Sigma, St Louis, MO) durante 30 minutos a 37°C. La digestión con colagenasa se paró en frío añadiendo medio de cultivo. A continuación se sembraron sobre frascos de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  (Costar, Cambridge, MA, USA) y se incubaron en una estufa de cultivos a 37°C y en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$  en medio RPMI 1640 con 25mM de HEPES (GIBCO BRL, Paisley, Scotland UK) a pH 7.4 y suplementado con 20% de suero de ternera fetal de complementado (STF), 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, 2 mM de glutamina (Gibco) y 0.06 U/ml de insulina (Novo Nordisk Pharma S.A., Madrid). A los siete días de cultivo se reemplazó el medio de los glomérulos adheridos al plástico y, aproximadamente a los veinte días, cuando las células mesangiales alcanzaron la confluencia, se despegaron con tripsina-EDTA. Los pases sucesivos se sembraron con una relación 1:3 o 1:4 y se hicieron subcultivos cada 8-10 días. Los experimentos se realizaron entre los pases tercero y séptimo.

La caracterización de las células mesangiales se realizó por microscopía de contraste de fases que nos permitió observar las características morfológicas de estas células.

Mediante estudios de inmunohistoquímica, las células presentaron tinción positiva con anticuerpos específicos para desmina y vimentina (marcadores característicos de células miogénicas). La tinción para el factor VIII y para citoqueratinas fue negativa, excluyendo de esta forma la presencia de células endoteliales y epiteliales, respectivamente.

## 2.2. Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares murinas: células mesangiales MMC [Wolf et al., 1992], células de túbulo proximal MCT [Haverty et al., 1988] y fibroblastos renales TFB [Alvarez et al., 1992]. Las células se crecieron en DMEM (GIBCO, Grand Island, NY) con 10% STF de complementado, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, a 37°C y en una atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$ .

También se utilizó la línea celular promielocítica U937 (American Type Culture Collection, ATCC, CRL 1593) y los macrófagos murinos Raw 264.7 (ATCC, TIB 71). Estas células crecen en suspensión en medio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Paisley, Scotland UK), con 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, 10 % de suero de ternera fetal y a 37°C en atmósfera del 5% de  $\text{CO}_2$ .

Asimismo, utilizamos células mesangiales murinas no transformadas [Wolf et al., 1992].

## 2.3. Aislamiento de macrófagos peritoneales de rata

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratas Wistar anestesiadas con éter. Se realizaron tres lavados consecutivos de la cavidad peritoneal con 10 ml de tampón PBS. Las células recogidas se lavaron dos veces en el mismo tampón, se resuspendieron a una concentración de  $10^5$  células/ml en RPMI-HEPES conteniendo 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA, fracción V) (Sigma Chemical Corporation, St Louis, USA) y se sembraron sobre placas de 6 pocillos (Costar). Al cabo de 2 horas de incubación a 37°C se retiraron las células no adheridas al plástico y se contaron para llevar un control del número de células en cada pocillo.

### **3. ESTUDIOS IN VIVO**

#### **3.1. Modelos experimentales**

Los ratones Balb/c se obtuvieron de los laboratorios IFFA Credo (Barcelona) y las ratas Wistar fueron suministradas por el animalario de la Fundación Jiménez Díaz.

##### **3.1.1. Inyección de anticuerpos anti-Fas**

Para los estudios de los efectos in vivo de los anticuerpos anti-Fas se inyectaron a ratones Balb/c de 4 semanas de edad, 10  $\mu\text{g}$  del anticuerpo anti-Fas murino Jo-2 [Ogasawara et al., 1993], 10  $\mu\text{g}$  de IgG de hamster ó vehículo (100  $\mu\text{l}$  de NaCl 0.9% estéril) por vía intraperitoneal, sacrificándolos a distintos tiempos.

Para descartar que el efecto de la inyección de los anticuerpos anti-Fas fuera debida al complemento, se deplementaron varios animales previamente a la inyección de anti-Fas [Sylvestre et al., 1994]. Para ello en 24 horas se les inyectaron 3 dosis de 100 U/kg de factor de veneno de cobra *Naja naja kaouthia* (Sigma, St Louis, MO, USA) por vía intraperitoneal.

##### **3.1.2. Endotoxemia**

La endotoxemia en los ratones se indujo por una sola inyección intraperitoneal de 200  $\mu\text{g}$  de lipopolisacarido (LPS) de *E. coli* 026.B6 (Sigma, St Louis, MO) y en las ratas por la inyección de 500  $\mu\text{g}$  of LPS.

#### **3.2. Procesamiento de las muestras de tejido**

Las ratas se anestesiaron con 5 mg/100 g de pentobarbital sódico. Los grandes vasos abdominales quedaron expuestos mediante laparotomía media y los riñones se perfundieron con salino 0.9% a 4°C, extrayéndose muestras renales para los estudios posteriores.

Los ratones balb/c fueron sacrificados a distintos tiempos despues de la inyección de los anticuerpos o el LPS. Tras sacrificarlos, fueron desangrados y perfundidos con NaCl 0.9% a 4°C. Se extrajeron muestras de hígado y riñón para histología y se

congelaron por inmersión en nitrógeno líquido las muestras que serían posteriormente utilizadas para estudios de DNA y RNA.

### **3.3. Estudios histológicos**

Los riñones y el hígado fueron estudiados por microscopía óptica convencional, tinción con propidio de iodo e inmunofluorescencia.

#### **3.3.1. Microscopía óptica**

Para microscopía óptica, el tejido renal y hepático fue fijado por inmersión en formol 10% tamponado, incluido en parafina, cortado en secciones de 2-3  $\mu\text{m}$  de grosor y teñido con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y PAS.

#### **3.3.2. Tinción con propidio de iodo**

Para los tejidos se utilizaron las muestras incluídas en parafina. Se hicieron cortes de 4 micras sobre portas, se desparafinaron en xileno y se deshidrataron en diferentes concentraciones de alcohol, se digirieron con 20 mg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron durante 30 minutos a 37°C con 1  $\mu\text{g/ml}$  de propidio de iodo y 10  $\mu\text{g/ml}$  de RNasa A, se lavaron con PBS, se montaron con 90% de glicerol en PBS y se analizaron con luz de fluorescencia.

#### **3.3.3. Inmunofluorescencia**

Esta técnica se utilizó para comprobar la deplementación de los animales utilizados para los estudios de activación del receptor Fas.

El tejido renal congelado fue cortado y fijado en 50% de metanol/acetona durante 10 minutos. A continuación se bloqueó con 10% suero de ternera fetal en PBS y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en 0.2% BSA/PBS con el correspondiente anticuerpo. Posteriormente se lavó con dos cambios de 5 minutos en 0,2% BSA/PBS y se incubó durante 30 minutos con el segundo anticuerpo. Se lavó de nuevo en BSA/PBS y se montó con 90% de glicerol en PBS analizándose con luz de fluorescencia.

Para estudiar los depósitos glomerulares de C3 se empleó una dilución 1:100 de un anticuerpo anti-C3 murino marcado con fluoresceína (Quidel, USA). Para los estudios

de clusterina se empleó como anticuerpo primario una dilución 1:1000 (Quidel) de un anticuerpo policlonal de conejo frente a clusterina de rata, y como anticuerpo secundario una anti-IgG de conejo conjugada con fluoresceína. En ambos casos se utilizaron como control positivo riñones de ratones inyectados con anticuerpos anti-membrana basal glomerular.

### 3.4. Análisis de la orina

La proteinuria y la hematuria se cuantificaron en una muestra de orina obtenida antes de la inyección de los anticuerpos (grupo control sano) y antes del sacrificio de los animales tratados, mediante una tira reactiva (Combur Test, Boehringer Mannheim), según la siguiente escala:

<b>Proteinuria</b>	<b>Negativo</b>	<b>30 mg/dL</b>	<b>100 mg/dL</b>	<b>500 mg/dL</b>
	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>
<b>Hematuria</b>	<b>Negativo</b>	<b>10 eritro/<math>\mu</math>l</b>	<b>50 eritro/<math>\mu</math>l</b>	<b>250 eritro/<math>\mu</math>l</b>
	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>

## 4. AISLAMIENTO DE RNA Y TECNICAS DE HIBRIDACION

### 4.1. Preparación del RNA

El RNA total se extrajo por el método de la guanidina-tiocianato-fenol-cloroformo en medio ácido [Chomczynski et al., 1987] y fue utilizado para estudios de transcripción inversa-PCR y Northern blot. Por cada muestra, la misma cantidad de RNA (30  $\mu$ g) fue desnaturalizado y sometido a electroforesis en un gel de 1% agarosa-formaldehido. A continuación el RNA fue transferido capilarmente a membranas de nylon Genescreen (New England Nuclear). Los blots fueron prehibridados 6 horas a 42°C en 50% formamida, 1% SDS, 5xSSC, 1xDenhardt's (0.02% Ficoll, 0.02% albúmina sérica bovina, 0.02% polivinilpirrolidona), 0.25 mg/ml DNA de esperma de salmón desnaturalizado y 50 mM fosfatos pH 6.5. La hibridación transcurrió a 42°C durante 16-18 horas, con un 20% de sulfato de dextrano y  $7 \times 10^6$  cpm de la sonda desnaturalizada. Los filtros se lavaron con 0.1% SDS, 2xSSC 30 min a temperatura ambiente y 15 min a 55°C. Los blots fueron expuestos con una película (Eastman Kodak, Rochester, New York, EEUU) y pantallas intensificadoras SHX (Valca, Madrid, España) a -70°C. Los blots fueron lavados de la sonda anterior y rehibridados con diferentes DNAs complementarios. La homogeneidad de la carga de RNA en el gel fue estudiada mediante tinción con bromuro de etidio del gel de agarosa original después de la transferencia capilar, y la expresión de RNA ribosómico 28S y de GAPDH se emplearon como control interno. Las autorradiografías se cuantificaron usando un densitómetro, y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de densitometría (Molecular Dynamics) en relación al control interno 28S o GAPDH.

### 4.2. Transcripción inversa-PCR

La retrotranscripción inversa para obtener el DNA complementario se realizó a partir de RNA total. Esta se realizó a 37°C durante 90 minutos en presencia de 900 ng de iniciadores oligo-dT, 1.25 mM de cada dNTP, 40 unidades de RNasin (Promega, Madison, WI) y 500 unidades de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Maloney (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) en un tampón de reacción que

contiene 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, y 10 mM DTT [Heeger et al., 1992].

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleamos los siguientes oligonucleótidos (Syntex, Barcelona), elegidos de la secuencia publicada de DNAc de ICE humano y murino [Miura et al., 1993] y Bag-1 murino [Takayama et al., 1995], obtenidas de Genbank. Está indicado el número de la primera base de cada oligonucleótido. Estos números corresponden a la secuencia publicada de los DNAc murinos. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar Ich-1 corresponden a los utilizados por Wang et al. [Wang et al., 1994]. Desconocemos a que número de la secuencia de Ich-1 corresponden, pues estos autores no lo especifican en su publicación.

ICE 5' 484 sentido: CGT CTT GC(TC) CTC ATT ATC TGC

ICE 3' 1216 antisentido: GTC C(CT)G GGA AGA GGT AGA AAC

Ich-1 5' sentido: ATG CTA ACT GTC CAA GTC TA

Ich-1 3' antisentido: GTC TCA TCT TCA TCA ACT CC

Bag-1 195 sentido 5': GTA ACA GTG AGC CAG TTG

Bag-1 646 antisentido 3': GCT AAG AAC ACC TGA ACC

Las reacciones de amplificación se realizaron usando el kit de GeneAmp™ (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) utilizando en cada reacción 20 pM de iniciadores, 200 μM de cada dNTP, 1X del tampón de amplificación (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina), 1.25 unidades de Taq polimerasa y 200 ng de DNAc. La amplificación del DNAc se realizó durante 40 ciclos con una temperatura de apareamiento de 56°C durante un minuto, una temperatura de extensión de 72°C dos minutos y una temperatura de desnaturalización de 95°C un minuto.

El producto obtenido de PCR del ligando de Fas se clonó dentro del vector PCR II (Invitrogen, San Diego, CA), se transfectó dentro de E. coli con el kit Oneshot (Invitrogen), se secuenció y posteriormente se usó como sonda en los estudios de hibridación de RNA. Los iniciadores utilizados comprendían varios exones, de esta manera descartamos la amplificación de DNA genómico.

### 4.3. Preparación de las sondas

Para Northern blot utilizamos sondas específicas para Fas [Watanabe-Fukunaga et al., 1992], ligando de Fas [Takahashi et al., 1994], bcl2 [Negrini et al., 1987], bax murino [Oltvai et al., 1993], obtenidas por RT-PCR a partir de DNAc murino. BclxL fue obtenido usando DNAc del gen bclxL humano [Boise et al., 1993]. Estas sondas fueron secuenciadas para comprobar su identidad (agradecemos la colaboración de E.G. Neilson).

La sonda de MCP-1, c-myc, c-fos, 28S y GAPDH se obtuvieron de la American Type Collection (ATCC).

Las sondas se marcaron con un metodo comercial, "rediprime DNA labelling system" (Amershan), el cual se basa en la incorporación de nucleótidos marcados con  $^{32}\text{P}$  a un DNA desnaturalizado, mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

## 5. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR

Cuantificamos la muerte celular mediante ensayos clásicos de citotoxicidad y a continuación estudiamos las características morfológicas y funcionales de la apoptosis.

### 5.1. Cuantificación de la muerte celular. Ensayos de citotoxicidad

Para cuantificar la citotoxicidad inducida por la activación de Fas en células cultivadas se empleó el colorante azul tripán y el ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ .

#### 5.1.1. Viabilidad con azul tripán

El azul tripán es un colorante vital que tiñe a las células muertas. Esta técnica permite distinguir entre células vivas y muertas pero no si éstas últimas han muerto por apoptosis.

Las células se cultivan por cuadruplicado en placas de 24 pocillos en presencia o ausencia de los correspondientes estímulos y preestímulos. Después del tiempo de incubación las células desprendidas presentes en el medio de cultivo se mezclan con las células que permanecen adheridas y que se despegan con tripsina. 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra

se mezcla con 20  $\mu$ l de 0,4% del colorante azul tripán. Por microscopía óptica, se cuentan al menos 150/200 células por cada muestra y se calcula el porcentaje de células que captan el colorante, expresando los resultados como porcentaje de mortalidad.

### 5.1.2. Liberación de $^{51}\text{Cr}$

Este ensayo determina la muerte de la célula por rotura de la membrana. El  $^{51}\text{Cr}$  se une covalentemente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Cuando la membrana celular está dañada, estas proteínas marcadas se liberan al medio de cultivo en relación directa al daño.

Las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos y se preestimularon durante 48 horas con medio control o pre-estímulos. A continuación, las células se cargaron con 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham, Arlington Heights, IL) en cada pocillo. Después de 18 horas a 37°C, las células se lavaron 4 veces y se incubaron por cuadruplicado en un volumen final de 500  $\mu$ l con los estímulos letales correspondientes. A los tiempos indicados, se recogen 100  $\mu$ l del sobrenadante y se determina la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  con un contador gamma. La liberación total se determinó lisando las células que permanecían adheridas con 0,1M de NaOH y sumándole el conteo de todas las demás fracciones de 100  $\mu$ l recogidas a los distintos tiempos. La liberación espontánea es la cantidad de radiactividad presente en el medio de células no tratadas. La liberación específica se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ Liberación específica } ^{51}\text{Cr} = \frac{\text{Liberación muestra} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación Total} - \text{Liberación espontánea}} \times 100$$

## 5.2. Caracterización de la apoptosis

### 5.2.1. Estudios funcionales: fragmentación del DNA

Mediante esta técnica se pretende observar el patrón característico de degradación internucleosomal del DNA que presenta bandas múltiples de 200 pares de bases debido a la activación de endonucleasas.

Para estos estudios se utilizaron tanto células pegadas como despegadas. Las células se lisaron en tampón de lisis (10mM EDTA, 50mM TrisHCl pH 8, 0,5% sarcosil) con 0,2 mg/ml de proteinasa K y se dejaron incubando a 55°C durante 2 horas. A continuación, se realizaron dos extracciones del DNA con 0,5 volúmenes de fenol y 0,5 volúmenes de cloroformo-isoamílico (24:1) y se precipitó con etanol absoluto y 0,3M de acetato sódico. Las muestras se resuspendieron en tampón TE (Tris-EDTA) y se digirieron durante una hora a 37°C con 10 µg/ml de RNasa A. Seguidamente se analizaron en un gel del 2% de agarosa al que se le había añadido 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

Para la extracción del DNA de bajo peso molecular se utilizó un método modificado del anterior. La solución de lisis utilizada consistía en 0,2% de Tritón en PBS y 10mM EDTA, pH 7,4. Tras dejar las células 10 minutos en hielo en esta solución, se centrifugan, se extrae el DNA con fenol-cloroformo-isoamílico, se precipita con etanol y se resuspende para cargarlo en un gel del 2% de agarosa [Facchinetti et al., 1991].

Para procesar el tejido se utilizó el método anterior con la variación de que los trozos de riñón y de hígado se incubaron durante toda la noche a 37°C en el tampón de lisis.

### 5.2.2. Estudios morfológicos

Para los estudios morfológicos las células se sembraron en portas de 8 pocillos (Labtek, NUNC, Naperville, IL) y para poder visualizar la morfología nuclear se utilizó el colorante propidio de yodo, el cual se une a los ácidos nucleicos.

Las células se lavaron con PBS y se fijaron con 10% de formol durante 10 minutos. A continuación se lavaron con PBS y se tiñeron durante 30 minutos con 0,1 µg/ml de propidio de yodo y 5 µg/ml de RNasa A en PBS a 37 °C. Se lavaron de nuevo con PBS y se montaron en 90% de glicerol en PBS. Las preparaciones se observaron con un microscopio de fluorescencia. En algunos experimentos se contó el porcentaje de

células con morfología apoptótica (nucleos pequeños, picnóticos e hiperdensos).

## 6. CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo se ha utilizado para estudiar la expresión del receptor Fas. Las células se cultivaron durante 24-48 horas en presencia de medio control solo o de los estímulos correspondientes.

Las células adheridas al plástico se despegaron utilizando 2,2 mM de EDTA en PBS más 0,2% de BSA y se lavaron varias veces en PBS/0,1% BSA utilizando centrifugaciones de 4 minutos a 3000 rpm. A continuación, se incubaron  $5 \times 10^5$  células durante 30 minutos a 4°C con 5  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti-Fas humano o IgM control en el caso de células humanas y una dilución 1:100 del anticuerpo policlonal de conejo anti-Fas murino o IgG control en las células de ratón. Se lavaron una vez con PBS/0,1% BSA y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína. Para ello se usó una dilución 1:100 de un anticuerpo anti-IgM de ratón (Calbiochem, La Jolla, CA) en el caso del anti-Fas humano y con una dilución 1:100 de un anticuerpo anti-conejo (Sigma) para el anti-Fas de ratón. Se lavaron y se resuspendieron en 4% de paraformaldehído y a continuación se analizaron por citometría de flujo. Se contaron, al menos, 10.000 células por muestra y los datos se representaron según una escala logarítmica de intensidad de fluorescencia. Las células muertas se excluyeron del análisis.

## 7. ESTADISTICA

Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM. La significación estadística se estableció en  $p < 0.05$  mediante el programa estadístico R-SIGMA (Horus, Madrid). Para ello se utilizaron los tests de ANOVA y t de Student. La normalidad de la distribución se estableció mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

## **IV. RESULTADOS**

## **1. LAS CELULAS RENALES EXPRESAN FAS Y SU LIGANDO**

El TNF participa en la patogenia del daño renal ya que su expresión está aumentada en diversas nefropatías, es capaz de desencadenar respuestas biológicas en células renales, su administración in vivo ocasiona daño renal, y el antagonismo específico del TNF mejora la evolución de la lesión renal [Ortiz et al., 1995]. El ligando de Fas es una citoquina perteneciente a la familia del TNF [Suda et al., 1993] cuyo papel en patología renal permanece inexplorado. A fin de sentar las bases para el estudio de su participación en el daño renal, hemos caracterizado las células que, además de los linfocitos T [Suda et al., 1993] pueden expresarlo en el riñón. Asimismo, hemos estudiado si las células renales poseen el receptor Fas, como se regula su expresión y qué respuestas biológicas desencadenan su activación.

### **1.1. La expresión del RNA mensajero del ligando de Fas está regulada por el TNF**

En primer lugar comprobamos que varias estirpes de células renales expresan el ligando de Fas.

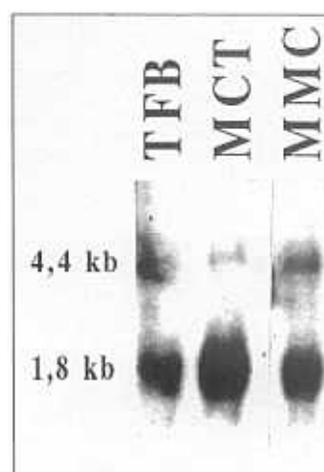
Usando la técnica de la transcripción inversa y de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de iniciadores del ligando de Fas murinos [Suda et al; 1993], se originó un producto de 486 pares de bases en células mesangiales MMC, células tubulares MCT y fibroblastos renales TFB cultivadas en condiciones basales (**Figura 1**). Este producto de la PCR fue usado posteriormente como sonda para los estudios de hibridación por Northern y su secuencia corresponde con el DNA complementario del ligando de Fas ya publicado.

**Figura 1: RT-PCR del ligando de Fas en células renales.** El primer carril corresponde al marcador de los pesos moleculares. Los siguientes carriles corresponden a la banda de 486 pb de los tres tipos de líneas celulares estudiadas tubulares MCT, fibroblastos TFB y mesangiales MMC.

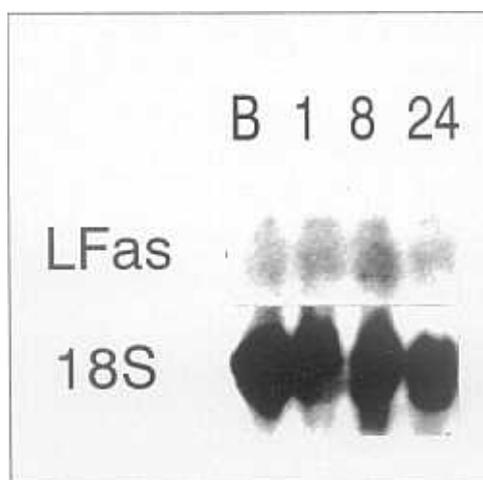


La técnica de Northern blot confirmó la expresión de RNAm de ligando de Fas en células renales. Cuando se utilizó el producto de la PCR como sonda y se hibridó con 2  $\mu\text{g}$  de RNAm (poli-A) de los tres tipos de células renales, se obtuvieron dos bandas de distinta intensidad, que corresponden a las previamente descritas [Suda et al., 1993]. La banda principal corresponde a un transcrito de 1,8 kilobases y la banda más débil a 4,4 kb, aproximadamente (Figura 2). La banda menos intensa no pudo ser detectada cuando se utilizó RNA total.

**Figura 2: Northern blot del ligando de Fas en células renales.** El primer carril corresponde al ligando de Fas en fibroblastos renales TFB, el segundo carril a células tubulares MCT y el tercer carril a células mesangiales murinas MMC. Se cargaron 2  $\mu\text{g}$  de RNA poli-A en cada carril.



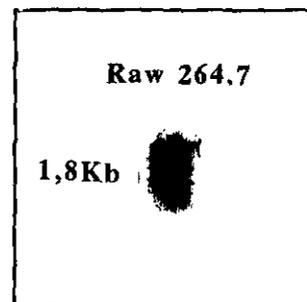
El TNF regula la expresión de múltiples citoquinas, por lo que estimulamos a las células mesangiales con 30 ng/ml de TNF $\alpha$  murino a 1, 8 y 24 horas. Como se ve en la **figura 3**, el estímulo con TNF produce un pico de mayor expresión de ligando de Fas a las ocho horas, volviendo a valores similares al control al cabo de 24 horas.



**Figura 3:** El TNF aumenta la expresión del RNAm del ligando de Fas en células mesangiales murinas utilizando la técnica de Northern blot. Las células se incubaron durante 1, 8 y 24 horas con 30 ng/ml de mTNF $\alpha$ . En la parte superior se muestran las bandas correspondientes al RNAm del ligando de Fas y debajo el RNA ribosómico 18S que se utilizó como control de que se había cargado lo mismo en todos los pocillos.

Nos preguntamos también si, además de los linfocitos T, otros leucocitos son capaces de expresar ligando de Fas. Los macrófagos infiltran frecuentemente el riñón dañado. Para ello crecimos células macrofágicas en condiciones basales, sin estimular y durante una hora. La hibridación por Northern puso de manifiesto que tanto en células Raw 264.7 (**Figura 4**) como los macrófagos peritoneales de rata expresaron constitutivamente RNAm del ligando de Fas, observándose la presencia de la banda de 1,8 kilobases que es la única que se puede ver por Northern blot.

**Figura 4: Expresión del RNAm del ligando de Fas en macrófagos Raw 264.7.** Se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de RNA total y se hibridó con la sonda del ligando de Fas. Esta sonda hibridó con un transcrito de 1,8 Kb.



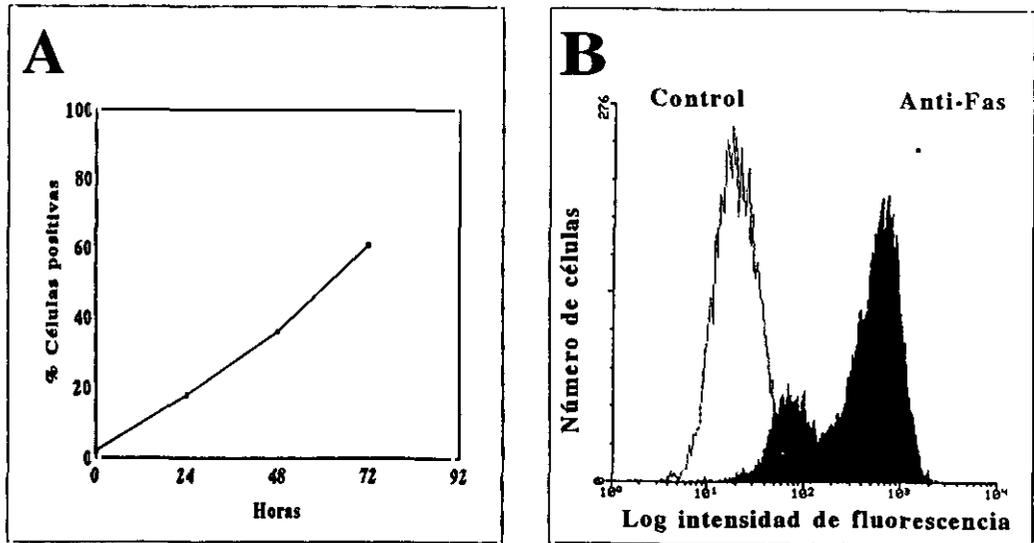
## 1.2. Las células renales expresan el receptor Fas

Los estudios de la expresión del receptor Fas se hicieron por citometría de flujo, utilizando células confluentes crecidas con 10% de STF tanto en condiciones basales como de estimulación.

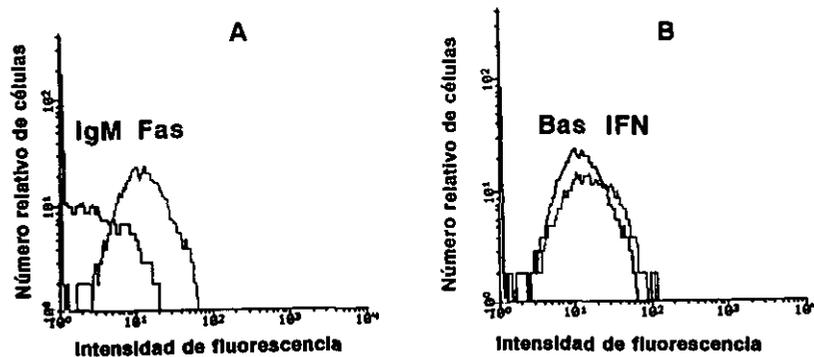
### 1.2.1. La expresión del receptor Fas en células mesangiales está regulada por citoquinas y LPS

Estudios mediante citometría de flujo no fueron capaces de demostrar la expresión del receptor Fas en células mesangiales murinas no estimuladas. Sin embargo, si estas células se estimulaban durante 20 horas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS se observaba expresión de Fas en el 15% de ellas. Este porcentaje se fue incrementando hasta alcanzar el 61% a las 72 horas. Este patrón temporal recuerda al previamente descrito en timocitos [Drappa et al, 1993]. La combinación de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS, 20 ng/ml de mTNF $\alpha$  ( $\sim 1000$  U/ml) y 300 U/ml de IFN $\gamma$  indujo la expresión del receptor en el 95% de las células después de 48 horas (Figura 5).

Una vez que hemos comprobado que las células mesangiales murinas estimuladas expresan Fas, decidimos estudiar si las células humanas se comportan de forma similar. La citometría de flujo demostró claramente la presencia de Fas en células mesangiales humanas no estimuladas. La estimulación con 1000 U/ml de IFN $\gamma$  incrementó la intensidad media de fluorescencia el 7% a las 24 horas y el 45% a las 48 horas (Figura 6). Cuando utilizamos una combinación de tres estímulos: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS, 300 U/ml de IFN $\gamma$  y 500 U/ml de hTNF $\alpha$  la intensidad de fluorescencia aumentaba un 73% a las 24 horas.



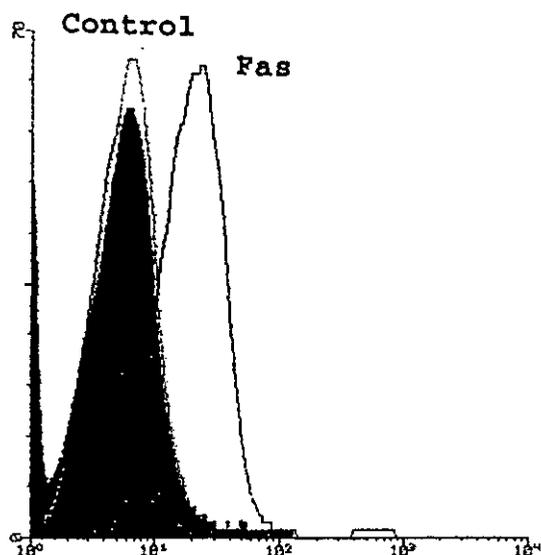
**Figura 5:** El LPS y las citoquinas aumentan la expresión del receptor Fas en células mesangiales murinas. (A) Expresión del receptor Fas en células estimuladas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS a lo largo del tiempo. La citometría de flujo no pudo demostrar expresión de Fas en condiciones basales. Sin embargo, el porcentaje de células positivas aumentó tras el estímulo con LPS. (B) Citometría de flujo de células estimuladas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, 20  $\text{ng/ml}$  de  $\text{mTNF}\alpha$  y 300  $\text{U/ml}$  de  $\text{IFN}\gamma$  durante 48 horas. Al cabo de este tiempo, el 95% de las células resultaron positivas (relleno de negro). El control sin estimular está en blanco. Se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia respecto al número de células.



**Figura 6:** El IFN aumenta la expresión del receptor Fas en células mesangiales humanas: Citometría de flujo. (A) En condiciones basales se detectó la expresión del receptor Fas mediante citometría de flujo. Como anticuerpo primario se empleó una IgM control (IgM) o anticuerpos anti-Fas. (B) La exposición de células mesangiales durante 48 horas con 1000  $\text{U/ml}$  de  $\text{IFN}\gamma$  aumentó un 45% la intensidad media de fluorescencia respecto a la expresión basal (Bas). Se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia respecto al número de células.

### 1.2.2. Expresión del receptor Fas en la línea celular monocítica U937

La citometría de flujo demostró que las células monocíticas humanas U937 expresaron constitutivamente el receptor Fas (Figura 7).



**Figura 7:** Expresión del receptor Fas en monocitos U937 por citometría de flujo. La curva en negro y la primera curva en blanco (control) son controles negativos (sin anticuerpo primario e IgM control como anticuerpo primario, respectivamente). Se observa un desplazamiento a la derecha de la curva cuando se empleó anti-Fas como anticuerpo primario (Fas). Se representa el número de células frente al log de la intensidad de fluorescencia.

### 1.3. Expresión del RNA mensajero de Fas

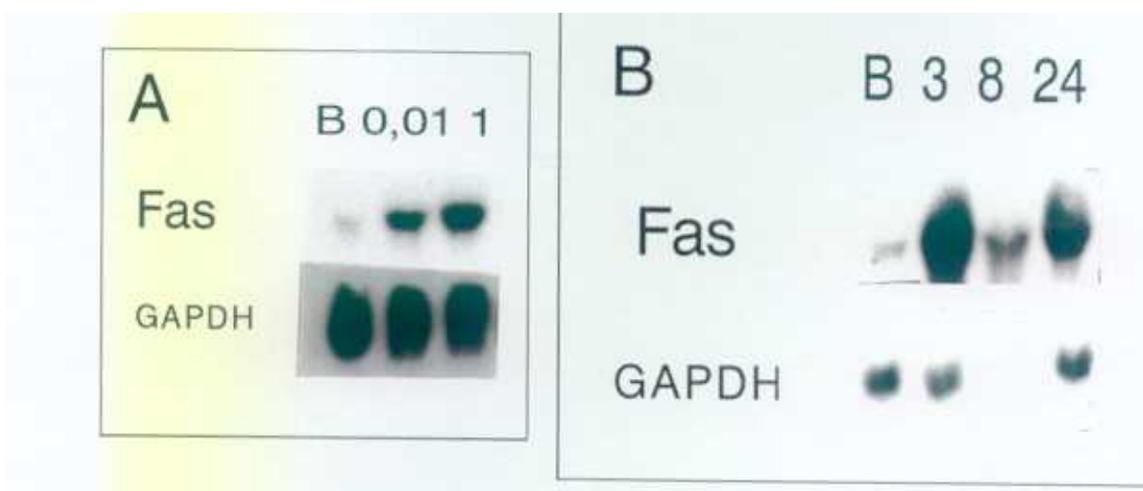
Una vez demostrado que las células renales expresan el receptor para Fas, nos propusimos estudiar los factores que regulan la expresión del RNA mensajero de este receptor. Para ello empleamos distintos tipos de células renales: mesangiales murinas MMC, tubulares proximales MCT, fibroblastos intersticiales TFB y células inflamatorias que infiltran el riñón, como los macrófagos.

Se sabe que el LPS y diversas citoquinas regulan la expresión de los receptores del TNF, que pertenecen a la misma familia que el receptor Fas [Yonehara et al., 1989], por lo que estudiamos el efecto de estos agentes sobre la expresión del RNA mensajero de Fas.

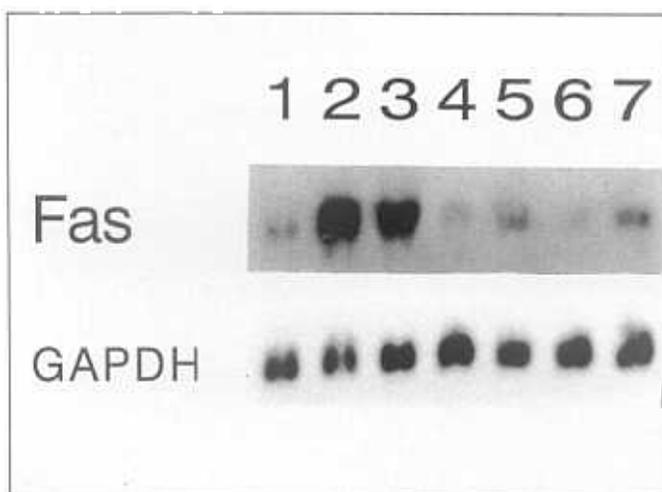
### 1.3.1. El LPS induce la expresión del RNA mensajero de Fas

El LPS estimuló la expresión del RNAm de Fas de una forma dosis y tiempo-dependiente. Cuando las células mesangiales se estimulan en presencia de 10% de suero de ternera fetal con diversas concentraciones de LPS durante 3 horas, se observa una respuesta dosis-dependiente (**Figura 8A**). El efecto del LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) se observa una hora después de la adición del mismo y persiste, al menos, hasta 24 horas (**Figura 8B**). El incremento en la expresión de RNAm de Fas fue de alrededor de 10 veces sobre el control

A continuación estudiamos el efecto de la incubación con inhibidores de la síntesis de macromoléculas: 10  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida (CHX) y 5  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D (Act D). La actinomicina D, pero no la cicloheximida, evitó el aumento de la expresión del RNAm de Fas, lo que sugiere que el efecto del LPS depende de la transcripción de nuevos RNA y no necesita la síntesis de proteínas. Nótese además la corta vida media del RNA de Fas, ya que bastó con inhibir la síntesis de RNAm durante 3 horas para apreciar una disminución de su nivel de expresión (**Figura 9**).

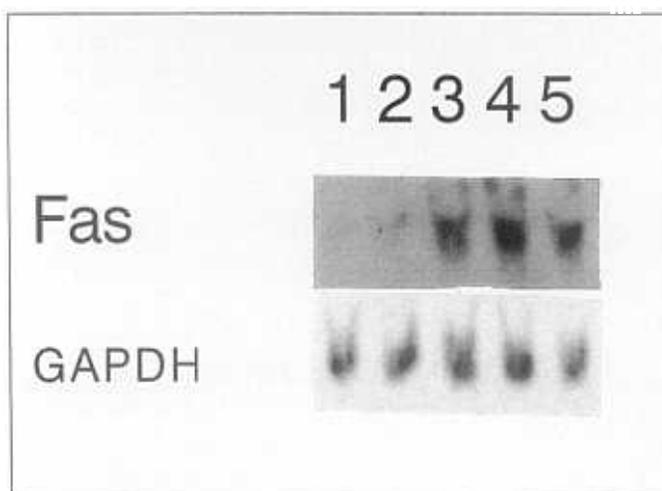


**Figura 8:** El LPS aumenta la expresión de RNAm de Fas en células mesangiales. Se cargaron 35  $\mu\text{g}$  de RNA total y se hibridó primero con Fas y después con GAPDH como control de que se había cargado lo mismo en todos los pocillos. (A) Las células se incubaron sin LPS, y con 0,01  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 3 horas y (B) con 1  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 3, 8 y 24 horas.



**Figura 9: Efecto de inhibidores de la síntesis de macromoléculas sobre la expresión de RNAm de Fas en células mesangiales.** Se cargaron 35  $\mu\text{g}$  de RNA total y se hibridó primero con Fas y después con GAPDH. Los carriles corresponden con: 1-control; 2- 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS; 3- 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS+10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHX; 4- 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS + 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Act D; 5- 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHX; 6- 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Act D; 7- control. El tiempo de estimulación fue de 3 horas.

El LPS también indujo la expresión de RNAm de Fas en células tubulares de una forma dependiente de la dosis (**Figura 10**).



**Figura 10: El LPS aumenta la expresión de RNAm de Fas en células tubulares:** Se cargaron por pocillo 30  $\mu\text{g}$  de RNA y se hibridó primero con Fas y después con GAPDH. 1- control; 2- 0,0001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS; 3- 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS; 4- 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS; 5- 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS. El tiempo de estimulación fue de 3 horas

También pudimos comprobar que los macrófagos Raw 264.7 expresaron constitutivamente el RNAm del receptor Fas y que el LPS aumenta esta expresión (no mostrado).

### 1.3.2. Diversas citoquinas inducen la expresión del RNAm de Fas

Entre las citoquinas se sabe que el  $\text{IFN}\gamma$  regula la expresión de Fas en células linfoides [Watanabe et al; 1992a] pero no se ha estudiado el efecto de otras citoquinas en células no linfoides.

Nosotros estudiamos el efecto de diferentes citoquinas sobre la expresión de RNAm de Fas en células mesangiales, tubulares y en fibroblatos intersticiales renales. Las células mesangiales se estimularon durante 24 horas con medio control, 30 ng/ml de  $\text{hTNF}\alpha$ , 30 U/ml de  $\text{hIL-1}\beta$ , 3 ng/ml y 30 ng/ml de  $\text{mTNF}\alpha$ . Tanto el  $\text{TNF}\alpha$  humano como el murino, así como la  $\text{IL-1}\beta$  indujeron la expresión de RNAm de Fas (Figura 11A). Se utilizaron dos tipos de  $\text{TNF}\alpha$  para ver si las diferencias que pudieran existir en la expresión de Fas, eran debidas a la activación de uno o de ambos receptores, ya que el TNF humano solo activa al receptor tipo 1 murino (55kD) [Lewis et al, 1991].

La combinación de 30 ng/ml de  $\text{mTNF}\alpha$  y 300 U/ml de  $\text{IFN}\gamma$ , aumentó la expresión del RNAm de Fas. Esta expresión es inducible por ambos estímulos por separado, pero es mayor cuando ambas citoquinas se añaden en combinación (Figura 11B).



**Figura 11:** Las citoquinas regulan la expresión de RNAm de Fas en células mesangiales renales. Células mesangiales fueron estimuladas durante 24 horas con: (A) 1- medio control; 2- 30 ng/ml hTNF $\alpha$ ; 3- 30 U/ml de hIL-1 $\beta$ ; 4- 3 ng/ml mTNF $\alpha$ ; 5- 30 ng/ml mTNF $\alpha$ . (B) 1- medio control; 2- 30 ng/ml mTNF $\alpha$ ; 3- 30 ng/ml mTNF $\alpha$ +300 U/ml IFN $\gamma$ ; 4- 300 U/ml IFN $\gamma$ . Las membranas se rehibridaron con GAPDH como control de carga.

En las células tubulares MCT también se observó aumento en la expresión de RNAm de Fas cuando se estimuló con 30 ng/ml de mTNF $\alpha$  y 300 U/ml de IFN $\gamma$ , solos o en combinación (**Figura 12A**). El efecto del mTNF $\alpha$  fue una respuesta dependiente del tiempo (**Figura 12B**) y es inhibible con anticuerpos anti-TNF. El TNF también aumentó la expresión de RNAm de Fas en fibroblastos intersticiales renales TFB (no mostrado).



**Figura 12: Efecto de las citoquinas sobre la expresión de Fas en células tubulares.** Las células tubulares se incubaron durante 3 horas con: (A) 1- medio control; 2- 30 ng/ml mTNF $\alpha$ ; 3- 300 U/ml IFN $\gamma$ ; 4- 30 ng/ml mTNF $\alpha$ +300 U/ml IFN $\gamma$ . (B) Las células MCT también se incubaron a distintos tiempos con 30 ng/ml de mTNF $\alpha$ : 1- basal; 2- 1 hora; 3- 3 horas; 4- 8 horas; 5- 24 horas; 6- 48 horas. Se representa arriba el RNAm de Fas y abajo la GAPDH como control de carga.

## 2. EL RECEPTOR FAS DE LAS CELULAS RENALES ES FUNCIONAL

Tras observar que las células renales expresan Fas, demostrado tanto por Northern como por citometría de flujo, decidimos estudiar si este receptor es funcional. Para ello utilizamos anticuerpos monoclonales que activan los receptores Fas humano y murino, y que tienen actividad citolítica en células humanas y murinas, respectivamente [Yonehara et al., 1989; Ogasawara et al., 1993].

En esta parte del estudio quisimos demostrar si la unión de los anticuerpos anti-Fas al receptor producían la muerte de células renales y si los sucesos desencadenados tras la activación del receptor Fas tenían las características morfológicas y funcionales de la apoptosis.

Desde el punto de vista morfológico utilizamos la microscopía óptica y desde el punto de vista funcional estudiamos la fragmentación del DNA. Cuantificamos la muerte celular por ensayos de citotoxicidad.

Así mismo, hipotetizamos que al igual que el TNF tiene múltiples acciones sobre células renales, Fas podría activar respuestas diferentes a la inducción de muerte celular. Estudiamos el efecto sobre la expresión de MCP-1 porque esta proteína es quimiotáctica para monocitos y juega un papel muy importante en el reclutamiento de los monocitos durante la inflamación renal. Además, se sabe que el  $\text{TNF}\alpha$  es un potente estímulo para la inducción de este gen.

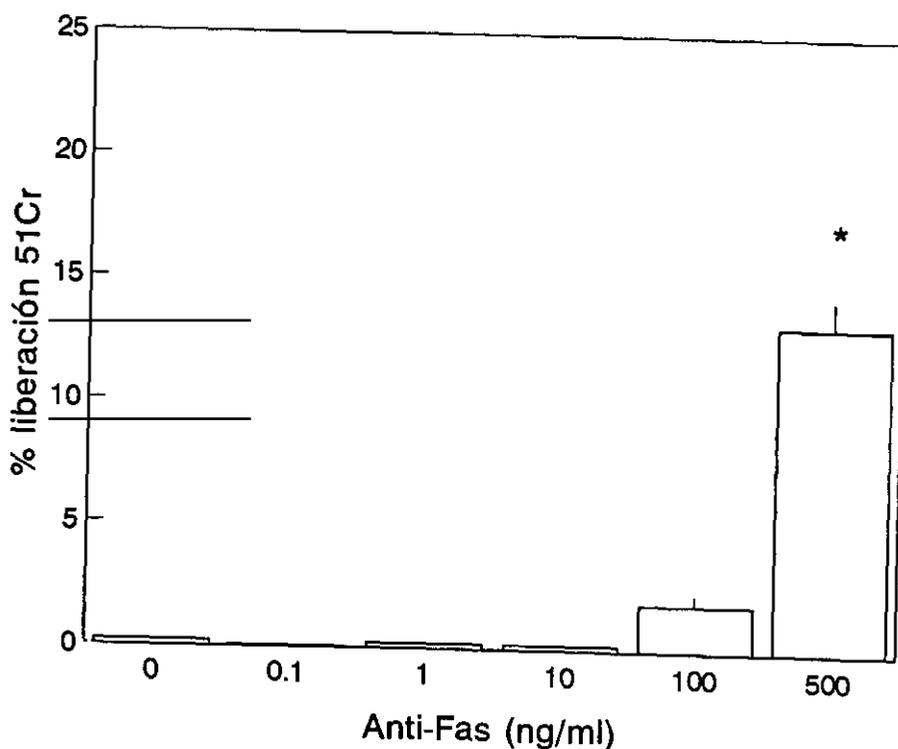
### 2.1. La activación de Fas induce citolisis y apoptosis de células renales

#### 2.1.1. Los anticuerpos anti-Fas son citotóxicos para células mesangiales humanas

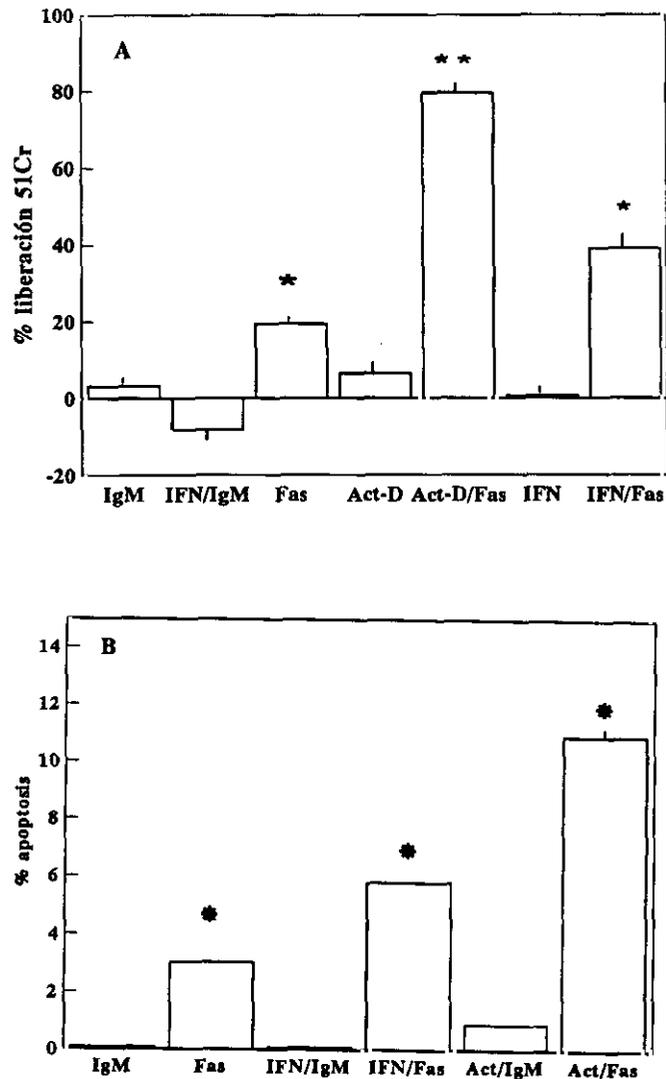
En células mesangiales humanas la mínima dosis para observar una citotoxicidad significativa de los anticuerpos anti-Fas, fue de 500 ng/ml ( $13,2 \pm 1,8\%$  liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$  a las 8 horas,  $p < 0,01$  respecto al control) (Figura 13). Los anticuerpos anti-Fas por sí solos tienen poca actividad citotóxica, pero cuando se inhibió la síntesis de RNA con 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de actinomicina D, el efecto citotóxico fue más acusado ( $79,5 \pm 3,2\%$ ,  $p < 0,001$  respecto a los anticuerpos solos), mientras que la actinomicina D por sí sola fue moderadamente tóxica ( $10,8 \pm 3,9\%$ ) (Figura 14A). Esto implica que estas células necesitan alguna molécula para su supervivencia, que sería inhibida por la

actinomicina D. Asimismo, estudiamos el efecto de la estimulación con  $\text{IFN}\gamma$ , ya que habíamos comprobado que esta citoquina aumenta la expresión de Fas. Para ello se preestimularon las células durante 48 horas con 1000 U/ml de  $\text{IFN}\gamma$ , observándose un incremento del efecto citotóxico de los anticuerpos anti-Fas a las 24 horas de su adición ( $39 \pm 4,6\%$ ,  $p < 0,05$  respecto a los anticuerpos solos), mientras que el  $\text{IFN}\gamma$  por sí solo no tuvo efecto citotóxico ( $0,7 \pm 2\%$ ). Una concentración similar de una IgM monoclonal de ratón no tuvo efecto tóxico ( $3,2 \pm 1,2\%$ ) incluso después de la preestimulación de las células con  $\text{IFN}\gamma$  durante 48 horas. ( $-8,5 \pm 2,2\%$ ) (Figura 14).

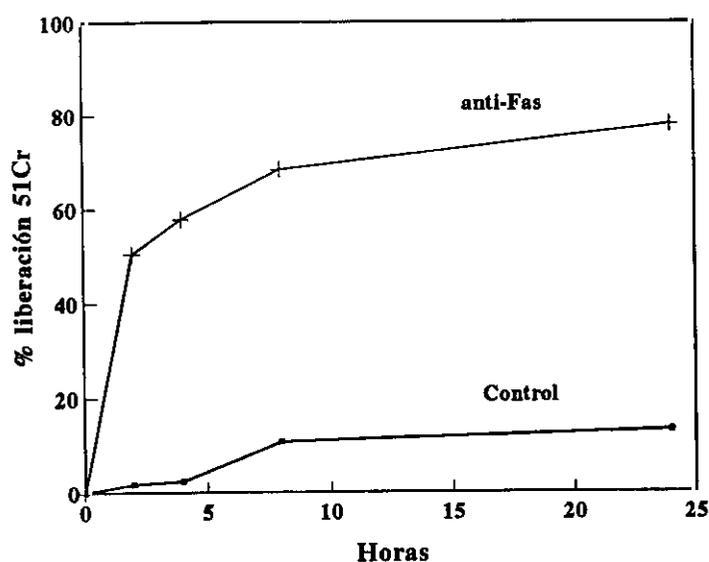
El patrón temporal de la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  se estudió bajo las condiciones de mayor toxicidad. Tanto en las células pretratadas como en las cotratadas con IFN se observó liberación de cromo a las 2 horas de la adición del estímulo, con un aumento progresivo a lo largo del tiempo (Figura 15).



**Figura 13:** Los anticuerpos anti-Fas son citotóxicos para células mesangiales humanas cultivadas: efecto de la dosis. Se representa la liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$  a las 8 horas de incubación con las distintas dosis de los anticuerpos anti-Fas en ng/ml. Los datos representan la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos realizados por cuadruplicado. \*  $p < 0,01$  vs control.



**Figura 14: El IFN y la actinomicina aumentan la citotoxicidad y la apoptosis causada por Fas en células mesangiales humanas.** (A) Las células se preestimularon durante 48 horas con 1000 U/ml de IFN $\gamma$  y a continuación se añadió 0,5  $\mu$ g/ml de la IgM control, 0,5  $\mu$ g/ml de los anticuerpos anti-Fas y 0,2  $\mu$ g/ml de actinomicina D durante 24 horas más. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado y se expresaron como la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  vs sus respectivos controles. (B) La tinción con propidio de iodo demostró que Fas induce apoptosis en células mesangiales humanas y que la apoptosis inducida por Fas aumenta después de preestimar con IFN o coestimar con actinomicina D durante 24 horas. \* $p < 0,05$ .

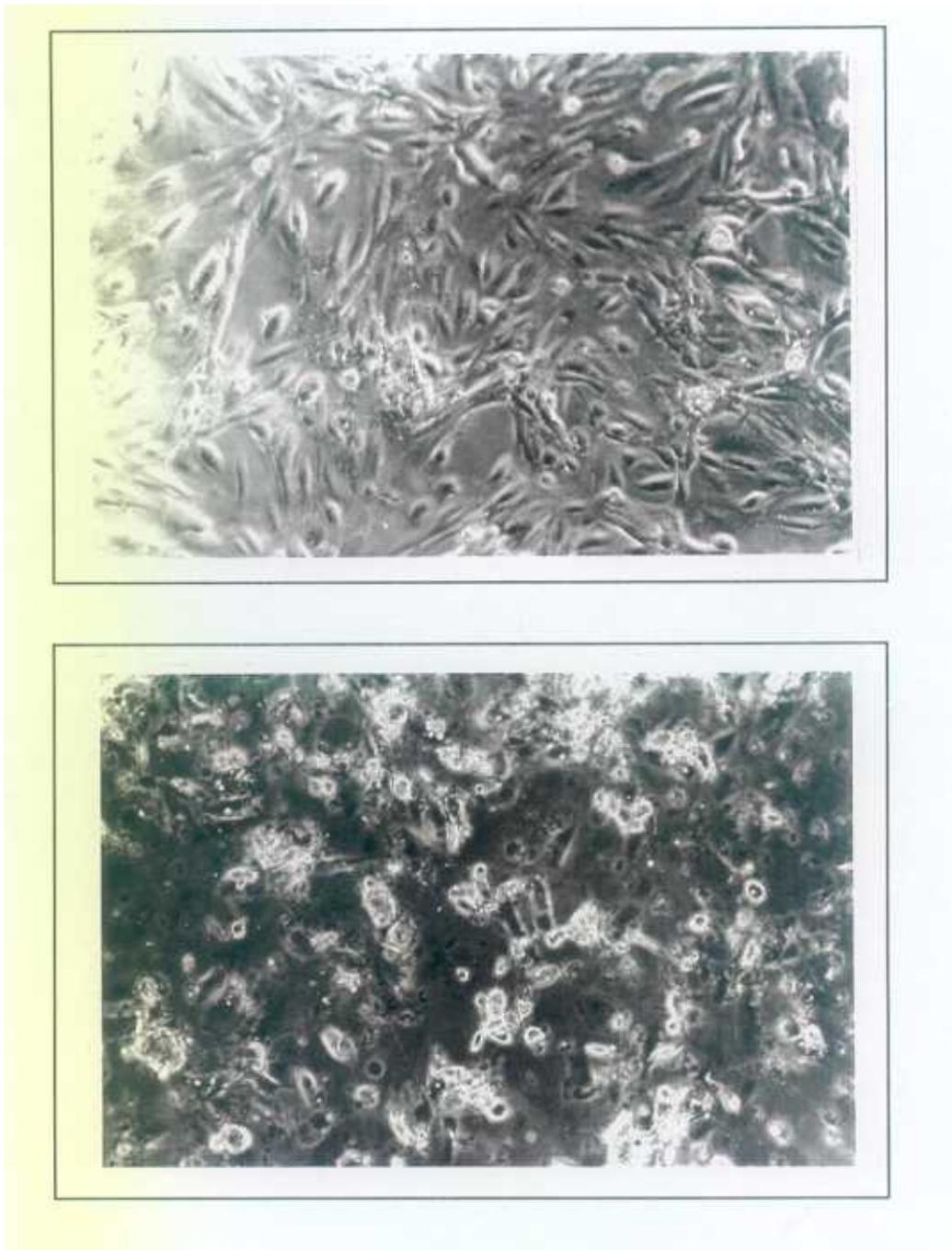


**Figura 15:** Liberación de  $^{51}\text{Cr}$  inducida por los anticuerpos anti-Fas a lo largo del tiempo en células cotratadas con actinomicina D. Se muestra el efecto de  $1\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas a lo largo de 24 horas respecto a células control. Los estudios se hicieron por cuadruplicado y la figura muestra un experimento representativo.

Una vez demostrado que los anticuerpos anti-Fas eran tóxicos para estas células, comprobamos si eran capaces de inducir apoptosis. Para ello, se utilizaron criterios morfológicos y funcionales.

Ya que habíamos comprobado que los anticuerpos anti-Fas por sí solos tienen poca actividad citotóxica, los siguientes experimentos los hicimos preestimulando las células con  $1000\text{ U/ml}$  de  $\text{IFN}\gamma$  durante 48 horas. Las células mesangiales humanas tratadas con  $\text{IgM}$  control permanecen confluentes y pegadas a la placa de cultivo. Por el contrario, si después de la preestimulación se añaden  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  de anticuerpos anti-Fas durante 24 horas, se observa que las células empiezan a despegarse perdiendo la confluencia (**Figura 16**).

Si estas células tratadas con anticuerpos anti-Fas se tiñen con propidio de yodo, se pueden ver núcleos pequeños y fragmentados y con una tinción más intensa que los núcleos de células normales, lo que es característico de núcleos apoptóticos (**Figura 17**). La cuantificación de estos núcleos apoptóticos a las 24 horas permitió comprobar que los cambios observados con  $^{51}\text{Cr}$  eran demostrados también con esta técnica de cuantificación de apoptosis (**Figura 14B**).



**Figura 16:** Las células mesangiales humanas tratadas con anti-Fas se despegan de la placa de cultivo. Las células se incubaron con 1000 U/ml de  $\text{IFN}\gamma$  durante 48 horas y con IgM control (arriba) o 500 ng/ml de anticuerpos anti-Fas (abajo). Microscopía de contraste de fases ( $\times 40$ ). Obsérvese que las células control permanecen adheridas a la placa y confluentes, mientras que gran parte de las células tratadas con anti-Fas se han despegado.

Como se observa en la **figura 18** el DNA genómico obtenido de células mesangiales tratadas con 500 ng/ml de anticuerpos anti-Fas, mostró el típico patrón de degradación internucleosomal, debido a la activación de endonucleasas que rompen el DNA en fragmentos múltiples de 200 pares de bases. El DNA de células tratadas con IgM control era de alto peso molecular.

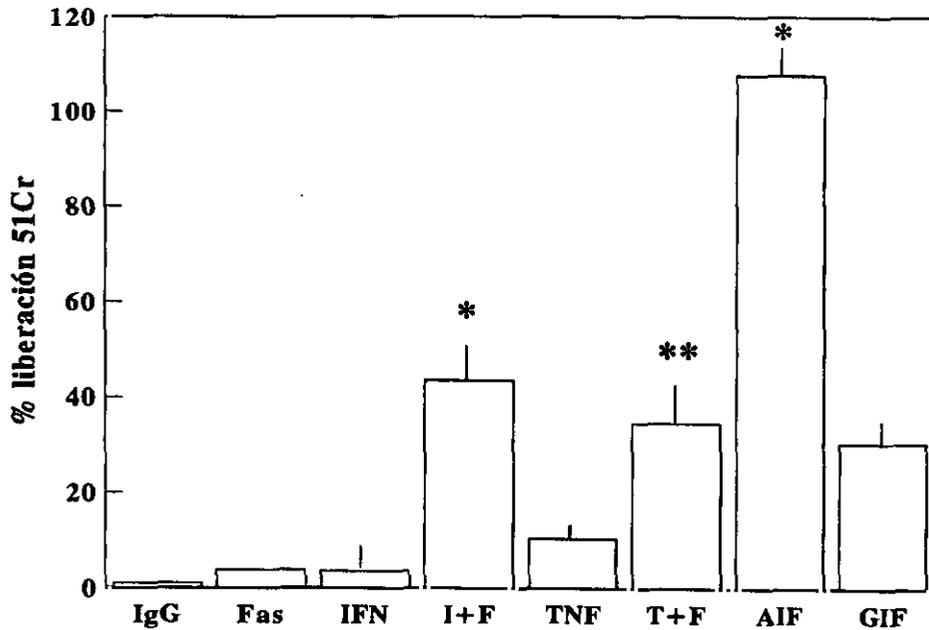
**Figura 18: Degradación internucleosomal del DNA.** El primer carril corresponde con el DNA de alto peso molecular de las células tratadas con IgM control. El segundo carril son las células tratadas con los anticuerpos anti-Fas que presentan la "escalera" de degradación nucleosomal.



### 2.1.2. Células mesangiales murinas

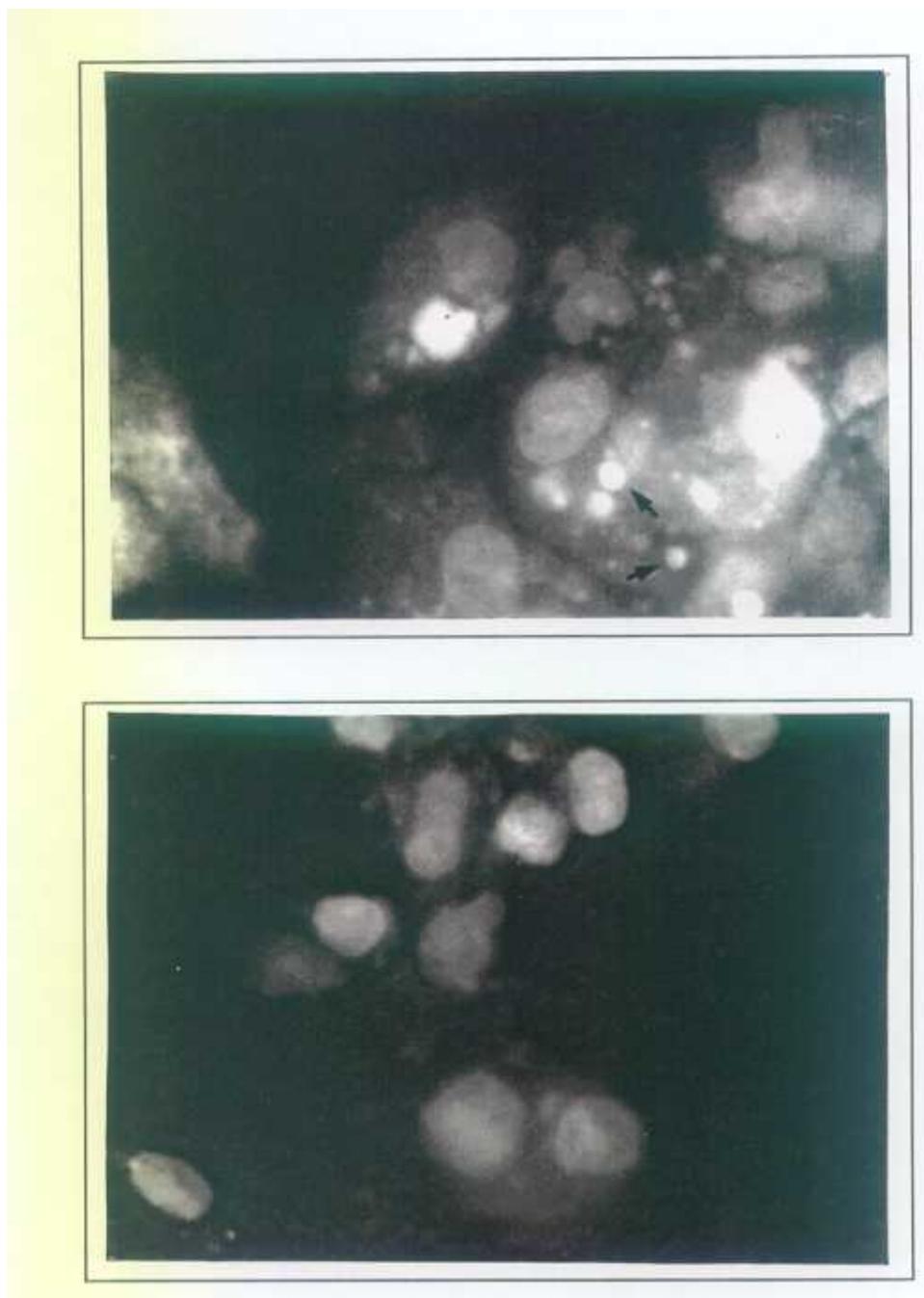
La activación de Fas también indujo citolisis y apoptosis en células mesangiales murinas. Los anticuerpos anti-Fas murinos (1  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron poco tóxicos para las células mesangiales no estimuladas ( $3,8 \pm 0,9\%$  de incremento en la liberación de cromo respecto a los controles, no significativo). La ausencia de toxicidad no fue debida a la falta de receptores, ya que cuando añadimos 0,08  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D el efecto tóxico era evidente ( $83,3 \pm 9,9\%$  respecto a  $29 \pm 6,3\%$  en células tratadas solo con actinomicina D,  $p < 0,01$ ). El pretratamiento con factores que aumentan la expresión de Fas como 300 U/ml de  $\text{IFN}\gamma$  y 100 U/ml de  $\text{mTNF}\alpha$  aumentaron el efecto citotóxico de los anticuerpos anti-Fas ( $\text{IFN}\gamma$   $3,5 \pm 6\%$ ,  $\text{IFN}\gamma + \text{anti-Fas}$   $43,4 \pm 7,6\%$ ,  $p < 0,01$ ;  $\text{mTNF}\alpha$   $10,3 \pm 3,1\%$ ,  $\text{mTNF}\alpha + \text{anti-Fas}$   $34,5 \pm 7,6\%$ ,  $p < 0,05$ ). El  $\text{IFN}\gamma$  junto con la actinomicina D potencian más aun el efecto de los anticuerpos anti-Fas (actinomicina D +  $\text{IFN}\gamma + \text{anti-Fas}$   $107,6 \pm 6,6\%$  respecto a  $30,4 \pm 5\%$  con IgG control,  $p < 0,01$ ) (**Figura 19**).

El efecto citotóxico de los anticuerpos anti-Fas también fue evidente en células mesangiales MMC.

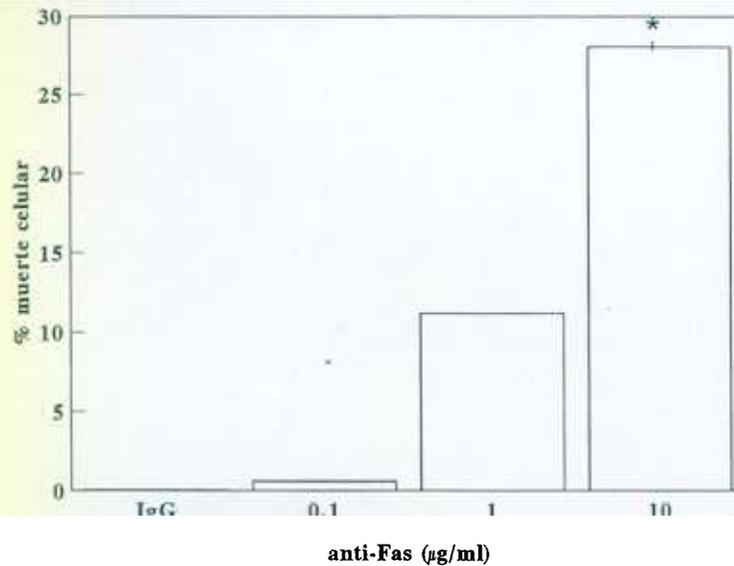


**Figura 19:** Citotoxicidad de los anticuerpos anti-Fas en células mesangiales murinas medida por ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr. Las células se pretrataron durante 48 horas con 300 U/ml de IFN $\gamma$ , 100 U/ml de mTNF $\alpha$  o medio control. A continuación se añadió 1  $\mu$ g/ml de anti-Fas o 1  $\mu$ g/ml de IgG control con/sin 0,08  $\mu$ g/ml de actinomicina D durante 28 horas. F-Fas, I-IFN, T-TNF, AIF-ActD+IFN+Fas, GIF-IgG+IFN+Fas. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado y se expresaron como la media  $\pm$  ESM \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,05$ .

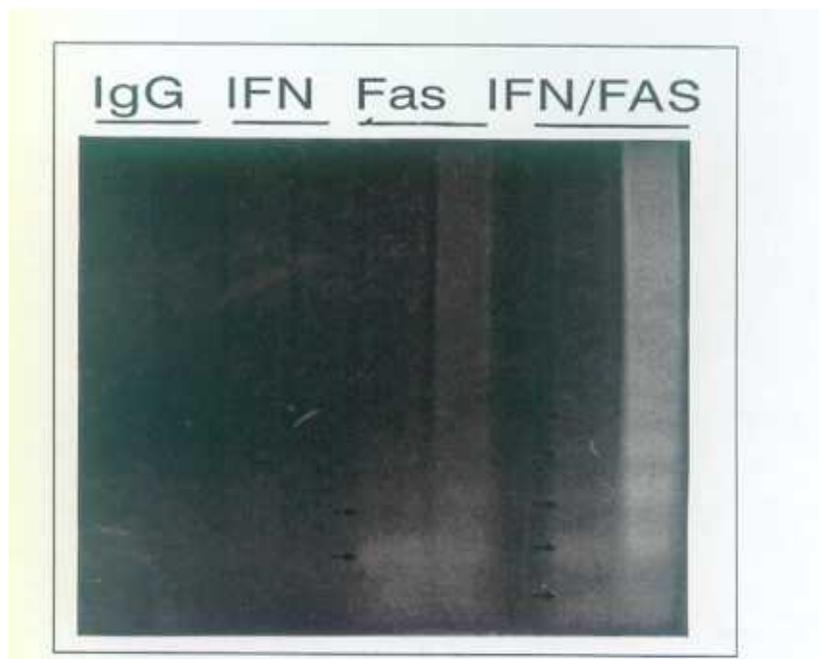
La confirmación de que Fas induce apoptosis en células mesangiales se realizó mediante la observación de la morfología típica en células teñidas con propidio de yodo (Figura 20 y 21) y con la demostración de que había fragmentación internucleosomal de DNA (Figura 22). Cuantificamos el número de células con morfología apoptótica entre las teñidas con propidio de yodo. Así comprobamos que este es un método más sensible que la liberación de <sup>51</sup>Cr para poner de manifiesto la letalidad de Fas. De hecho, el estímulo de Fas durante 24 horas aumentaba el porcentaje de células con morfología apoptótica de una forma dosis-dependiente (10  $\mu$ g/ml IgG,  $0.05 \pm 0.02\%$ ; 0.1  $\mu$ g/ml Fas,  $0.6 \pm 0.3\%$ ; 1  $\mu$ g/ml Fas,  $11.2 \pm 1.1\%$ ; 10  $\mu$ g/ml Fas,  $28.04 \pm 1.6\%$ ;  $p < 0.0002$  vs IgG) (Figura 21).



**Figura 20:** La muerte inducida por la activación de Fas en células mesangiales cultivadas tiene características morfológicas de apoptosis. (Arriba) La tinción con propidio de iodo puso de manifiesto los núcleos picnóticos, pequeños e hiperdensos de las células apoptóticas (flechas), claramente diferentes de los núcleos grandes y pálidos de las células sanas adyacentes. (Células mesangiales tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas durante 24 horas, fijadas con formol y teñidas con propidio de iodo). (Abajo) Apenas se observaron células apoptóticas entre las tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de IgG control de hamster.



**Figura 21:** Los anticuerpos anti-Fas inducen apoptosis de células mesangiales murinas de forma dosis dependiente, detectable por estudios morfológicos tras tinción con propidio de yodo al cabo de 24 horas. Control: 10 µg/ml IgG de hamster. \* $p < 0.0002$  vs IgG control.



**Figura 22:** La muerte inducida por la activación de Fas en células mesangiales cultivadas tiene características funcionales de apoptosis: Degradación internucleosomal de DNA. El DNA de bajo peso molecular fue extraído de células adherentes y despegadas, tratadas con 1 µg/ml de anti-Fas o IgG control durante 24 horas con/sin estimulación previa con 1000 U/ml de IFN $\gamma$  durante 48 horas. El DNA fue separado en un gel del 2% de agarosa, teñido con bromuro de etidio y fotografiado. Se observa la presencia de la típica escalera de DNA en las células tratadas con anti-Fas, pero no en los controles.

### 2.1.3. Los anticuerpos anti-Fas también son tóxicos para fibroblastos intersticiales renales TFB

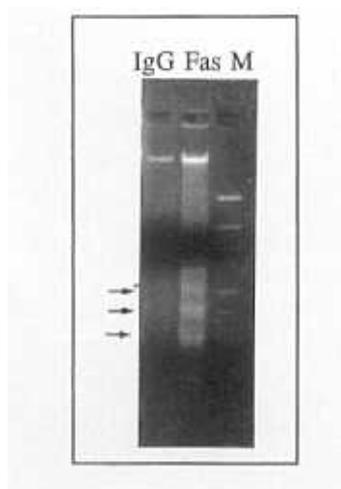
La estimulación de estas células con distintas dosis de anti-Fas demostró que había un efecto dosis-respuesta, alcanzando un porcentaje de muerte estimado con azul tripán, del 50% a las 24 horas con 4  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas (Figura 23A). Utilizando esta dosis hicimos una curva de tiempo y vimos que a las 24 horas ya es evidente la muerte inducida por Fas ( $49,5 \pm 5,8\%$  vs  $10,5 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ), aumentando hasta llegar al 100% a las 72 horas (Figura 23B).

A continuación comprobamos que, al igual que ocurría en células mesangiales, tanto el pretratamiento con 100 U/ml de TNF durante 48h ( $70 \pm 7,1\%$  vs  $41,8 \pm 4,2\%$  TNF solo;  $p < 0,01$ ) como el cotratamiento con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  actinomicina D ( $74,8 \pm 2,5\%$  vs  $20,4 \pm 1,8\%$  Act D sola;  $p < 0,01$ ) aumentaron significativamente la toxicidad de 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas durante 24 h (Figura 24A).

Estos datos se confirmaron con la liberación específica de  $^{51}\text{Cr}$ . A la dosis de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  los anticuerpos anti-Fas fueron moderadamente tóxicos ( $8,5 \pm 0,6\%$  vs  $2,6 \pm 4,1\%$  la IgG control,  $p < 0,05$ ). Con la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  esta toxicidad aumentó ( $22,3 \pm 5\%$ ,  $p < 0,05$  respecto a la IgG). La actinomicina D (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) en combinación con los anticuerpos, produjo un aumento considerable de liberación de cromo ( $73,6 \pm 6,2\%$  vs  $-0,3 \pm 2,3\%$  la actinomicina D sola,  $p < 0,001$ ) inducido por 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas. El pretratamiento con 100 U/ml de  $\text{mTNF}\alpha$  durante 48 horas potenció el efecto de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas ( $18,9 \pm 3,3\%$  vs  $1,4 \pm 0,4\%$  el  $\text{TNF}\alpha$  solo,  $p < 0,05$ ) (Figura 24B).

Los porcentajes obtenidos con las dos técnicas no son iguales aunque se confirman las diferencias. Las discrepancias en los valores de toxicidad atribuibles al TNF sólo se deben a que en los experimentos cuantificados con azul tripán las células se preincubaron durante 48 horas con TNF antes de añadir anti-Fas y luego se incubaron con TNF y Fas ó IgG control durante 24 horas más. En los experimentos realizados con  $^{51}\text{Cr}$ , el TNF se utilizó únicamente como preestímulo y, a continuación, se lavó de la placa de cultivo. También comprobamos que el TNF es tóxico para los fibroblastos renales, y que la muerte inducida por TNF tiene características morfológicas y funcionales de apoptosis.

Se confirmó que el anticuerpo anti-Fas induce apoptosis por la existencia de fragmentación del DNA (Figura 25) y por visualización microscópica de las células apoptóticas (no mostrado).

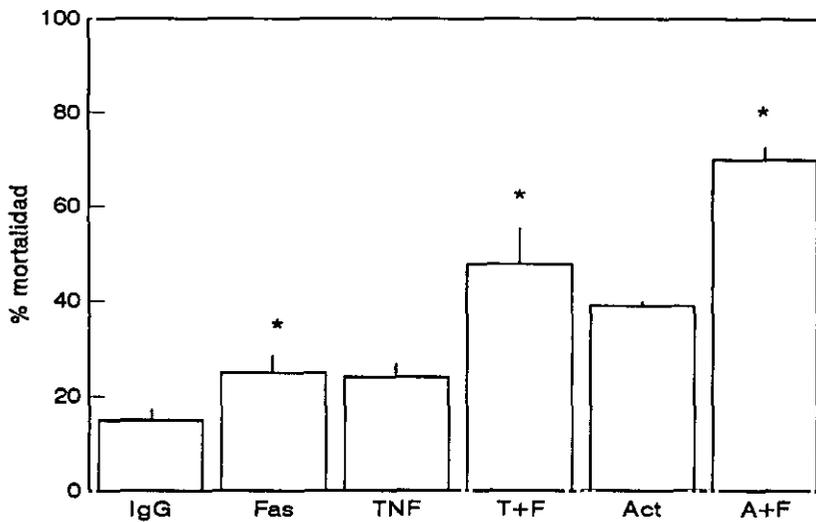


**Figura 25:** La muerte inducida por anti-Fas en fibroblastos tiene características funcionales de apoptosis. La electroforesis de DNA genómico de las células muertas puso de manifiesto un patrón de degradación internucleosomal de DNA característico de apoptosis. Se observa la imagen en "escalera", determinada por la presencia de fragmentos de DNA múltiples de 200 pares de bases. Células tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de IgG control y 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas durante 24 horas. M-marcador de peso molecular.

#### 2.1.4. Células tubulares renales

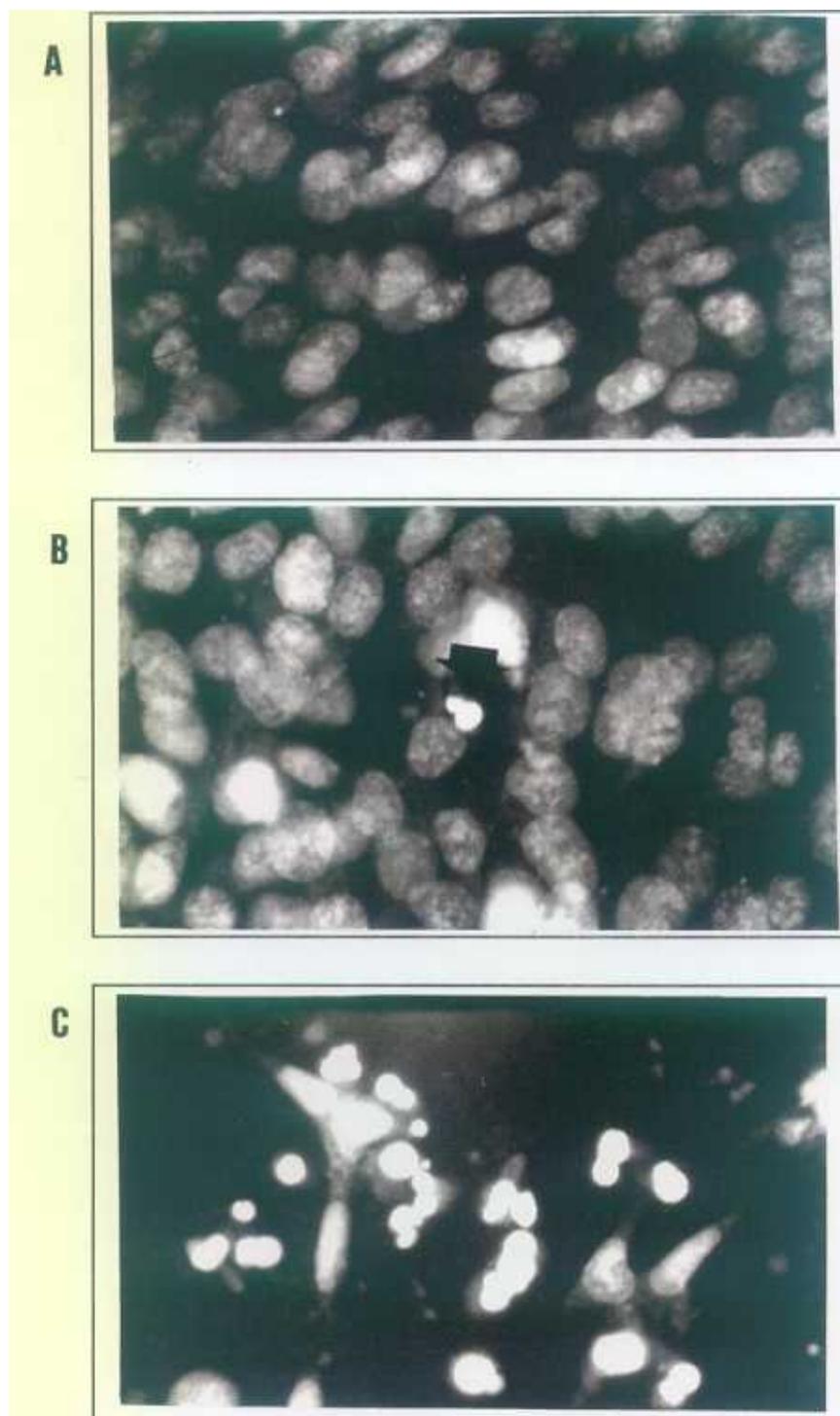
Las células tubulares también fueron sensibles a los anticuerpos anti-Fas. La respuesta fue dependiente del tiempo y de la dosis, siendo las diferencias significativas con la dosis de 4  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas y a las 24 horas ( $24,9 \pm 3,3\%$  vs  $15 \pm 1,6\%$ ,  $p < 0,05$ ).

El pre y co-tratamiento con 100 U/ml de  $\text{TNF}\alpha$  y la coestimulación con 0,08  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D potenciaron, al igual que ocurría en los otros tipos celulares, la actuación de los anticuerpos anti-Fas ( $47,8 \pm 7,4\%$   $\text{TNF} + \text{Fas}$  vs  $24 \pm 2,3\%$   $\text{TNF}$ ,  $p < 0,05$ ;  $69 \pm 2,9\%$   $\text{Act D} + \text{Fas}$  vs  $39 \pm 0,8\%$   $\text{Act D}$ ,  $p < 0,05$ ) (**Figura 26**).



**Figura 26:** El TNF y la actinomicina D aumentan la toxicidad de Fas en células tubulares renales. El preestímulo con 100 U/ml de TNF durante 48 horas y posterior co-estimulación con TNF+ 1µg/ml anti-Fas (T+F) durante 24 horas, o la co-estimulación con actinomicina D (0.08 µg/ml) y anti-Fas durante 24 horas (A+F) aumentó la capacidad letal de los anticuerpos anti-Fas en células tubulares. Resultados expresados como porcentaje de células muertas (captan el azul tripán) sobre el total de células. Media ± ESM. \* $p < 0.05$  vs los respectivos controles.

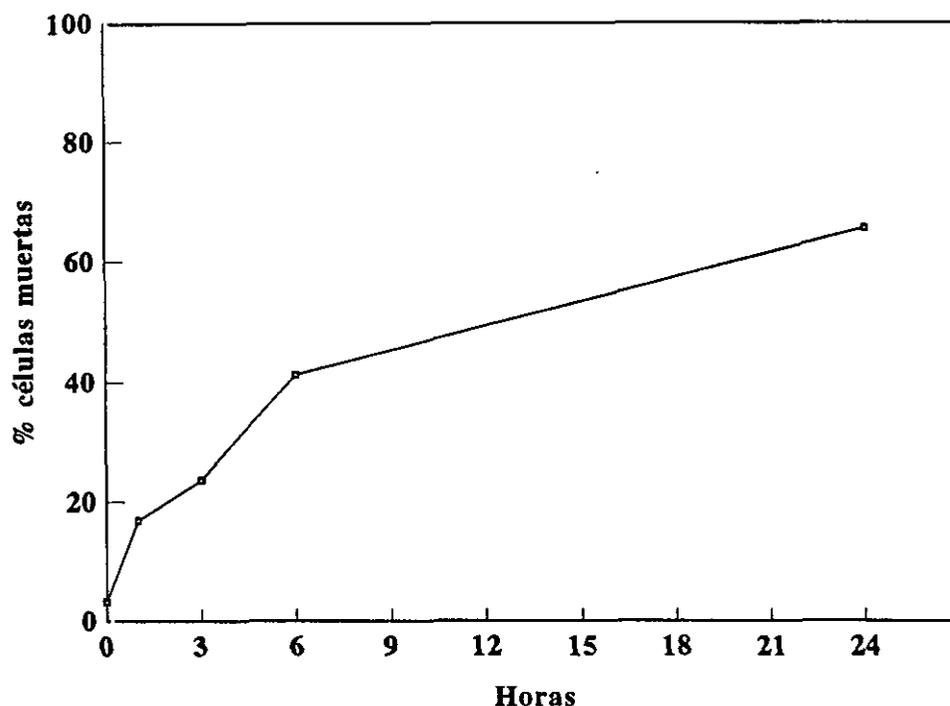
En estas células también encontramos fragmentación del DNA cuando se exponían a los anticuerpos anti-Fas y morfología de apoptosis cuando se teñían con propidio de yodo (**Figura 27**). El pretratamiento con 1 µg/ml de LPS durante 48 horas aumentó, llamativamente, el porcentaje de apoptosis inducible por anti-Fas (**Figura 27**).



**Figura 27. La muerte inducida por anti-Fas en células tubulares tiene características morfológicas de apoptosis. La tinción con propidio de iodo puso de manifiesto la presencia de núcleos apoptóticos de pequeño tamaño y gran intensidad de tinción entre las células sometidas a estímulos letales. (A) Células tubulares control cultivadas en medio con 10% de suero; (B) células tubulares tratadas durante 24 horas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anti-Fas: se observa un núcleo apoptótico entre células sanas; (C) células tubulares pretratadas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS durante 48 horas e incubadas con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anti-Fas durante 24 horas. Se observan numerosas células apoptóticas .**

### 2.1.5. Células monocíticas U937

Los monocitos también son sensibles a los anticuerpos anti-Fas, siendo esta toxicidad dependiente del tiempo (Figura 28). Otros autores ya han demostrado que la muerte inducida por Fas en estas células era debida a la apoptosis [Yonehara et al; 1989].

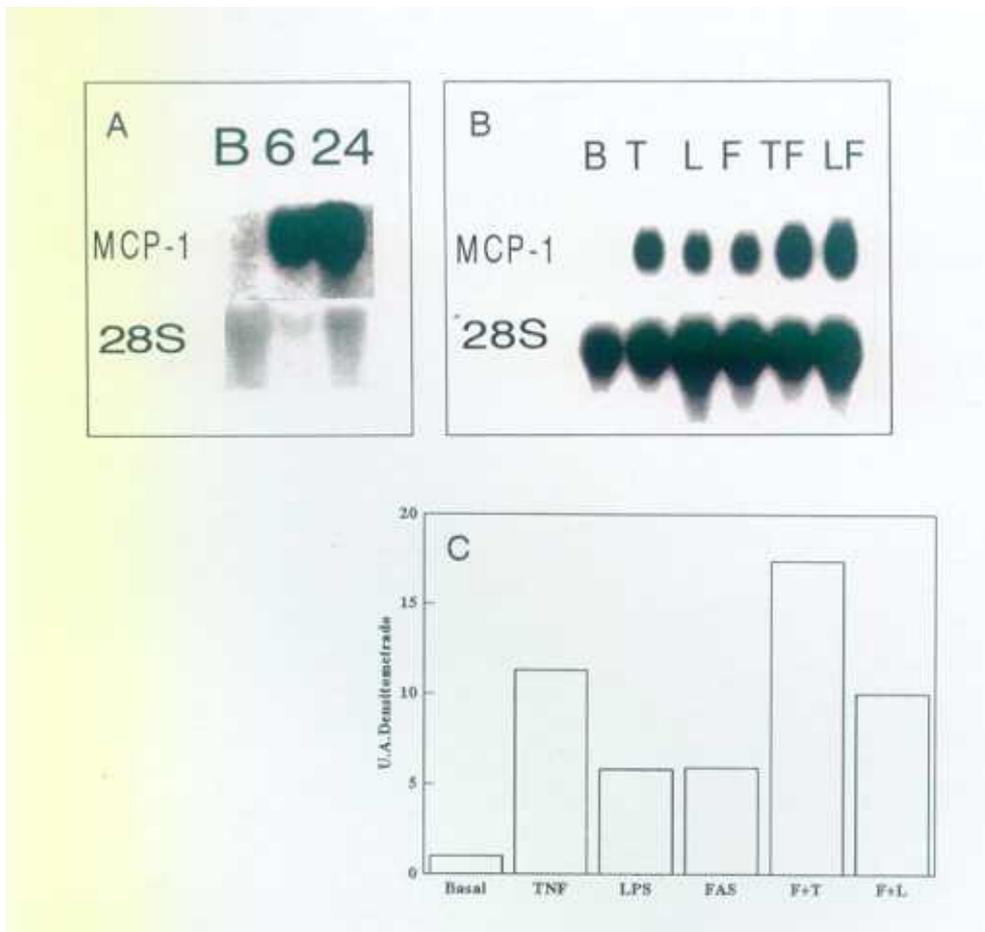


**Figura 28:** Mortalidad de monocitos humanos debido a la activación de Fas. Las células U937 se incubaron a distintos tiempos con 1 µg/ml de anticuerpos anti-Fas. El método utilizado fue la tinción con azul tripán y los resultados se expresan como porcentaje de células muertas respecto al total. El porcentaje de muerte inducida por 1 µg/ml de IgM control a las 24 horas fue del 3,3%. La figura es un experimento representativo.

### 2.2. Fas aumenta la expresión de RNAm de MCP-1

Nos planteamos la posibilidad de que la activación de Fas tuviera acciones diferentes de la muerte celular. Estudiamos el efecto de la estimulación con Fas en células mesangiales y monocitos U937 sobre la expresión de la citoquina quimiotáctica MCP-1.

Células mesangiales y monocitos estimulados con 1 µg/ml de anti-Fas mostraron un aumento de, aproximadamente, 6 veces sobre el control en la expresión de MCP-1 al cabo de 6 horas. Confirmando los datos de otros autores, el TNF y el LPS también estimularon la expresión de MCP-1 [Satriano et al., 1993]. Además, el cotratamiento con 100 U/ml de TNF y 10 µg/ml de LPS potenció el efecto estimulador de Fas (Figura 29).



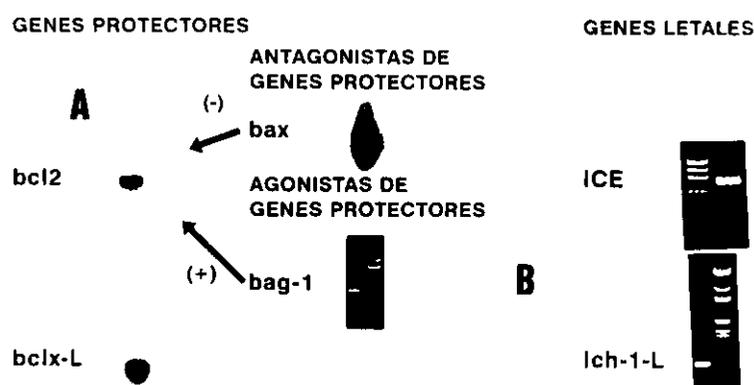
**Figura 29: Fas aumenta la expresión de RNAm de MCP-1 en células mesangiales y monocitos. (A)** Northern blot de células mesangiales hibridado con MCP-1 y 28S como control de carga. Las células se incubaron con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Fas durante 6 y 24 horas. B-basal. **(B)** Northern blot de monocitos U937 hibridado con MCP-1 y 28S, y **(C)** cuantificación en unidades arbitrarias de densitometrado de este último blot. Las células se trataron durante 6 horas con 100 U/ml de TNF, 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS y 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas. B-basal; T-TNF; L-LPS; F-Fas; TF-TNF+Fas; LF-LPS+Fas.

### 2.3. Las células mesangiales murinas expresan genes reguladores de la apoptosis. Efecto de la activación de Fas.

El hecho de que Fas sea capaz de inducir apoptosis en células mesangiales sugiere que estas poseen la maquinaria genética necesaria para llevar a cabo el proceso de suicidio celular. Por otra parte, el hecho de que la actinomicina D aumente el efecto tóxico de Fas sugiere que también existen factores que protegen del efecto letal de Fas. Si bien se han descrito genes que regulan la acción letal de Fas, no se había estudiado previamente su expresión en células renales.

#### 2.3.1 Las células mesangiales expresan de forma constitutiva genes que regulan la acción letal de Fas: *bcl2*, *bax*, *bag-1* e ICE, así como otros genes reguladores de la apoptosis: *bclxL* e *Ich-1*

La técnica de Northern blot puso de manifiesto que las células mesangiales cultivadas expresan constitutivamente los genes protectores *bcl2* y *bclxL*, y el gen letal *bax* (Figura 30). La técnica de RT-PCR permitió observar la expresión constitutiva de ambas isoformas de *Ich* (*IchL* e *IchS*), así como la expresión de *Bag-1* e ICE (Figura 30).



**Figura 30:** Expresión de genes reguladores de la apoptosis en células mesangiales cultivadas. Northern blot realizado con 25 µg de RNA total de células mesangiales cultivadas. (A) La membrana fue hibridada secuencialmente con las sondas de *bcl2*, que identificó un transcripto principal de 7.5 kb; *bax*, que identificó un transcripto principal de 1.0 kb; y de *bclxL*, que identificó un transcripto principal de 3.4 kb. (B) RT-PCR realizada a partir de cDNA obtenido de células mesangiales. Los oligonucleótidos específicos de ICE amplificaron un producto de PCR de 732 bases; los de *Bag-1*, uno de 451 bases; y los de *Ich*, dos productos, de 172 y 233 bases, que se corresponden con los RNAm que codifican las dos isoformas de *Ich-1* (*Ich-1L* e *Ich-1S*, respectivamente). Tal y como está descrito en otras células, el producto correspondiente a *IchL* fue el más abundante, y es el que se observa claramente en la figura.

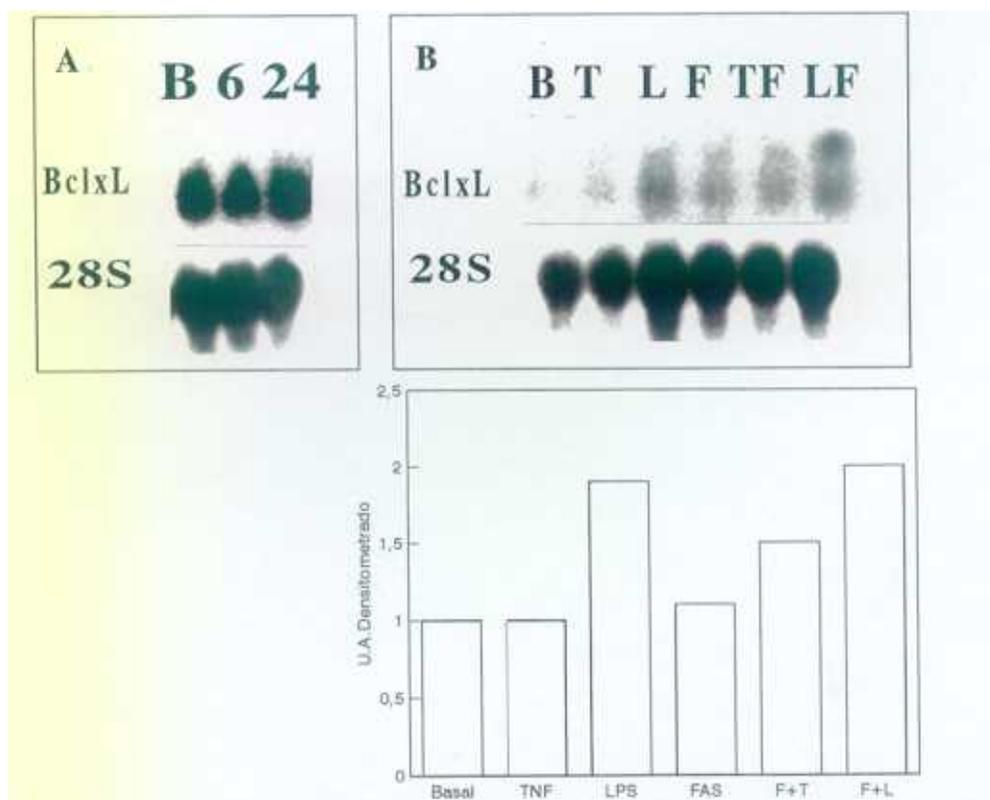
### 2.3.2. Fas no modifica la expresión de RNAm de bclx-L

Nos planteamos la posibilidad de que la activación de Fas pudiera modificar la expresión de genes reguladores de la apoptosis, de forma similar a las acciones del TNF [Ortiz et al., 1994b].

Fas no modificó la expresión del gen protector bclxL en células mesangiales a pesar de utilizar varias dosis (0,001 a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y distintos tiempos (de 1 a 24 horas) (Figura 31).

A la vista de estos resultados decidimos estudiar si en otros tipos de células, como los monocitos, ocurría lo mismo que en las células mesangiales.

Estimulamos células U937 con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos anti-Fas, 1  $\mu\text{g/ml}$  de IgM control, 100 U/ml de  $\text{TNF}\alpha$  y 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 6 horas. Observamos que la combinación de TNF y anti-Fas aumentó la expresión de bclxL el doble sobre el control, aunque ninguna de las dos citoquinas por separado reprodujo este efecto (Figura 31).



**Figura 31:** Efecto de anti-Fas sobre la expresión de bclxL en células mesangiales (A) y en monocitos humanos (B). Se muestra el Northern blot del RNAm de bclxL y de 28S como control de carga. La gráfica representa la cuantificación del gel de los monocitos ya corregido para la expresión de 28S. Las células se estimularon con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Fas, 100 U/ml de TNF y 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS durante 6 horas. F- anti-Fas; T- TNF; L- LPS.

### **3. LA ACTIVACION DE FAS INDUCE DAÑO RENAL**

Ya que habíamos demostrado que los anticuerpos anti-Fas son tóxicos para las células renales cultivadas, nos propusimos comprobar si también lo eran cuando se inyectaban in vivo. Un trabajo anterior de Ogasawara en el año 1993, ya había evidenciado la existencia de apoptosis a nivel hepático en ratones inyectados con 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpos anti-Fas, por lo que nosotros nos propusimos demostrarlo a nivel renal.

Para ello, inyectamos 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpos anti-Fas a ratones balb/c de 4 semanas de edad y los seguimos durante 30 minutos, 1, 3, 6, 10 y 24 horas. Como controles dejamos ratones sin inyectar nada y ratones con vehículo (0,9% salino) e IgG control. Al cabo de estos tiempos los ratones se sacrificaron, se perfundieron a través del corazón y se extrajeron muestras de distintos órganos.

#### **3.1. La lesión renal debida a la estimulación de Fas se caracteriza por hematuria y proteinuria**

Las manifestaciones clínicas inducidas por la inyección intraperitoneal de 10  $\mu\text{g}$  de anti-Fas se observaron a partir de las 6 horas, y se caracterizaron por letargia, disminución de la motilidad y erizamiento del pelo. La mortalidad a las 24 horas fue del 30%, similar a la previamente publicada [Ogasawara et al; 1993].

La inyección de anticuerpos anti-Fas, pero no de IgG control no inmune, ocasionó proteinuria y hematuria a partir de las 6 horas. La intensidad de ambas aumentó con el tiempo y fue máxima a las 24 horas (Figura 32).

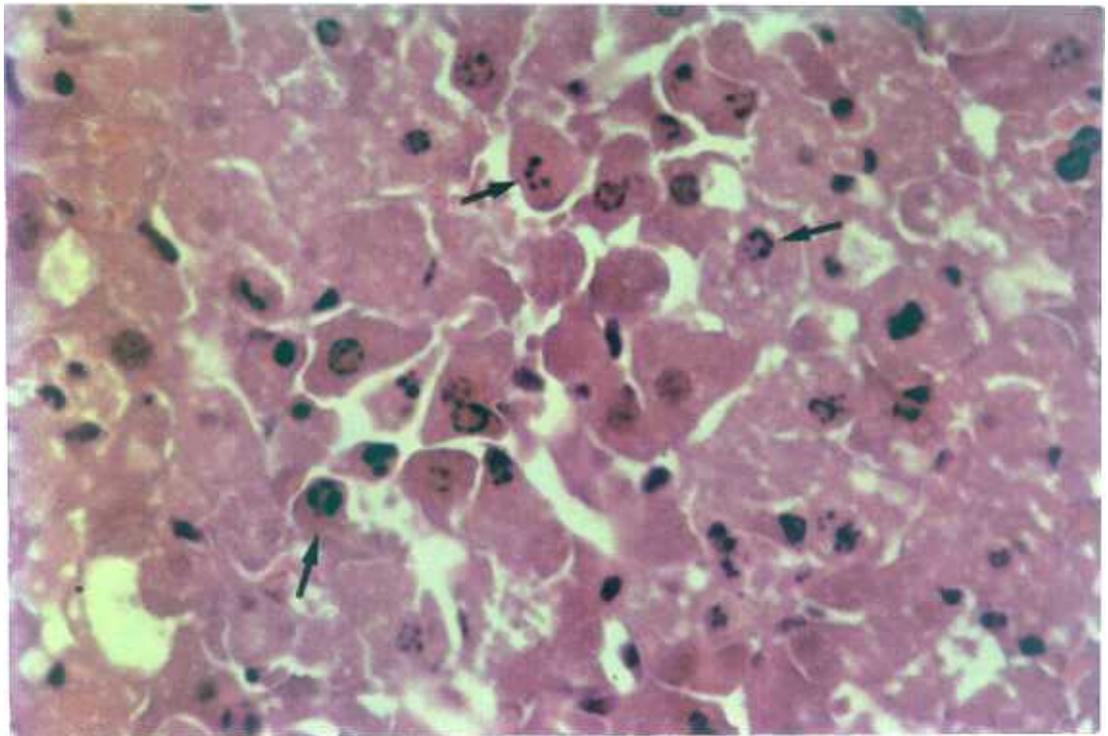
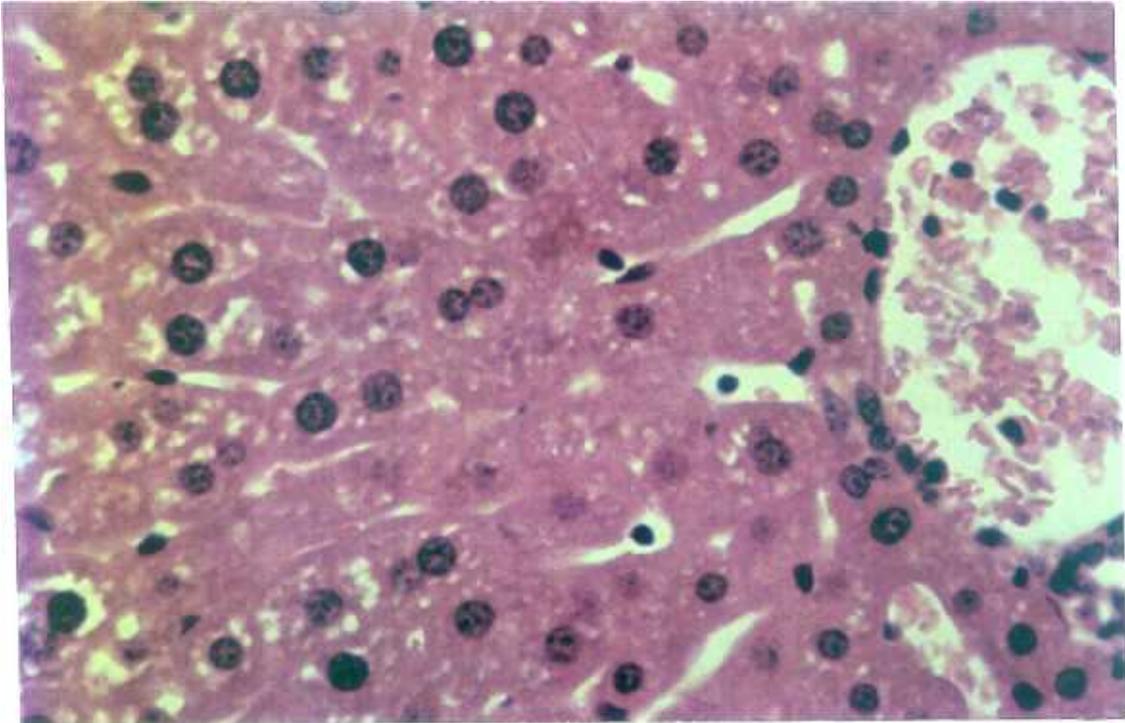
Los ratones deplemetados con veneno de cobra también desarrollaron proteinuria y hematuria tras la inyección de los anticuerpos anti-Fas.

Grupo	Sanos	IgG	Fas				Fas/ DEC
	Horas	-	3	6	10	24	10
Proteinuria	+	+	+	+ / ++	++ / +++	+++	++
Hematuria	-	-	-	- / ++	+ / ++	+++	++
n	22	5	2	2	3	4	3

**Figura 32:** La inyección de anti-Fas produjo hematuria y proteinuria. Se representan los grupos de ratones y las cruces correspondientes a los valores de proteinuria y hematuria (ver materiales y métodos para conocer la correspondencia de las cruces).

### 3.2. La lesión histológica causada por los anticuerpos anti-Fas es una mesangiolisis

En primer lugar comprobamos que habíamos reproducido el modelo publicado [Ogasawara et al; 1993]. Los estudios histológicos demostraron que la lesión hepática es más intensa que la lesión renal. En el hígado, a las 3 horas ya hay evidencia de cuerpos acidófilos aislados, con degeneración vacuolar focal de hepatocitos y ocasionales acúmulos inflamatorios. A las 6 horas hay presencia de infiltrado inflamatorio sinusal y en acúmulos parenquimatosos y ya se visualizan cuerpos apoptóticos. A las 24 horas existe una muerte masiva, que varía desde el 90% al 75% de los hepatocitos, con abundantes cuerpos apoptóticos. Mediante el PAS se observó una depleción masiva de glucógeno. Hay que hacer notar que la lesión hepática es progresiva desde las tres horas postratamiento (Figura 33).

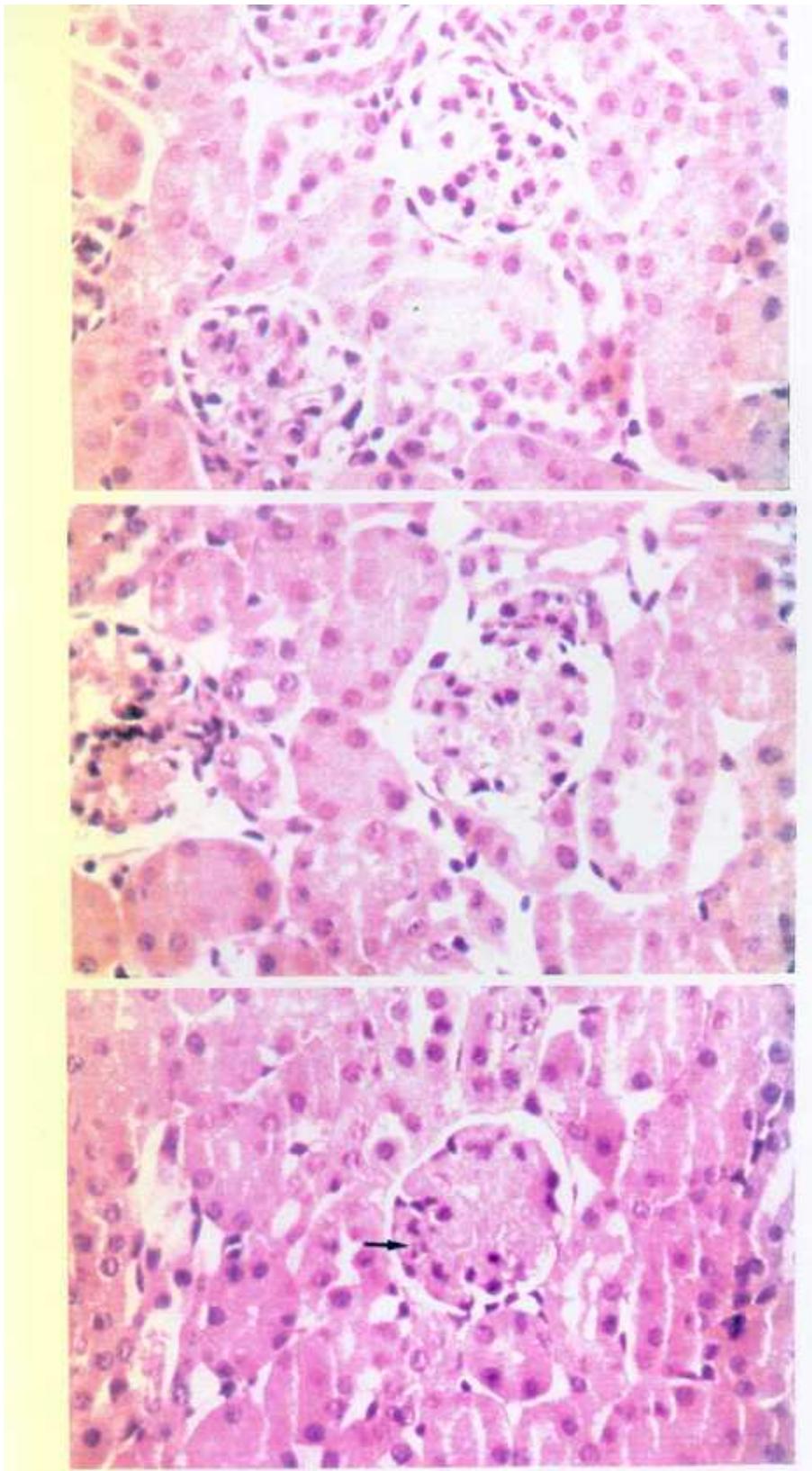


**Figura 33:** Inducción de apoptosis hepática por la inyección de anticuerpos anti-Fas en ratones balb/c. Microscopía óptica del hígado a las 24 horas de la inyección de IgG control (arriba) o anti-Fas (abajo) teñido con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan los núcleos hiperdensos y fragmentados, correspondientes a células apoptóticas, en los hígados de los animales tratados con anti-Fas.

La lesión renal es más tardía que la hepática y consiste en muerte de células mesangiales con fragmentación nuclear. El mesangio queda compacto con aspecto isquémico de los flóculos. A las 6 horas empieza a aparecer una mesangiólisis inicial muy leve con algunos restos nucleares y a las 24 horas ya se evidencia claramente la presencia de polvo nuclear mesangial. En los tiempos estudiados, no existe proliferación celular y los tubulos son normales (**Figura 34**).

Tanto el hígado como el riñón de los controles eran normales (**Figura 33 arriba y Figura 34 A**).

Investigamos un posible papel del complemento en el daño glomerular inducido por anti-Fas. No pudimos demostrar depósitos de C3 ni de clusterina en glomérulos de ratones tratados con anti-Fas o con IgG de hamster (no mostrado). Estos depósitos sí fueron evidentes en los glomérulos de ratones con glomerulonefritis por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, que utilizamos como control positivo.

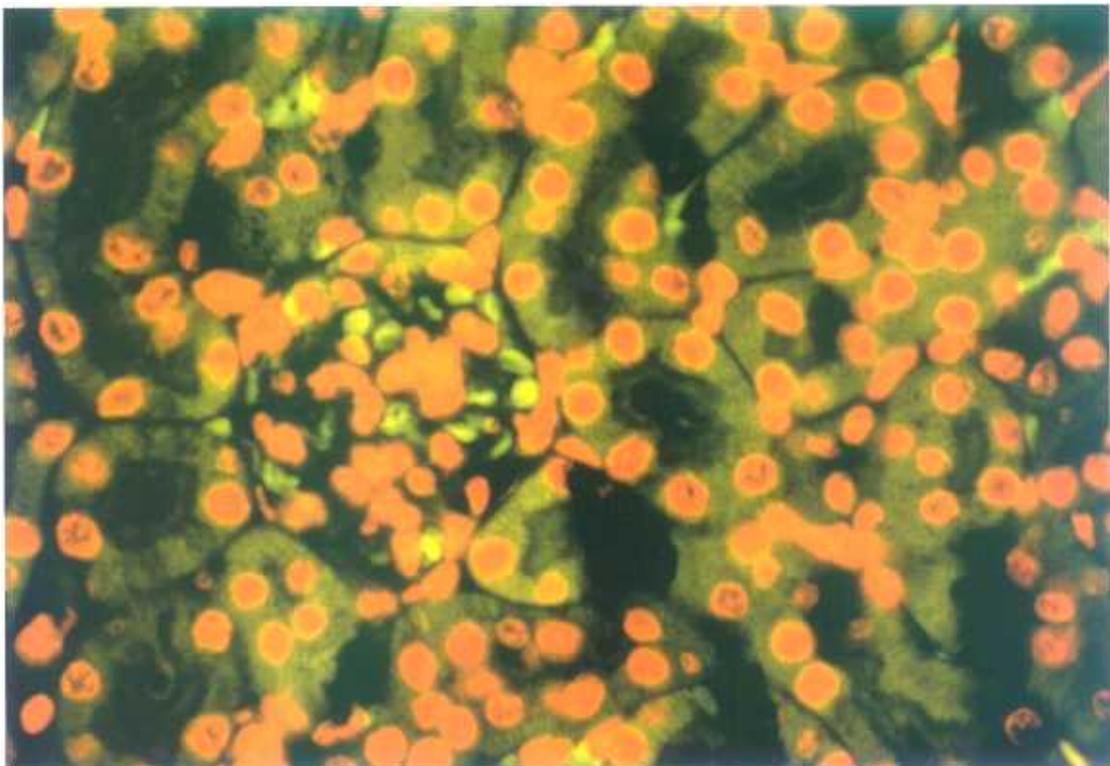


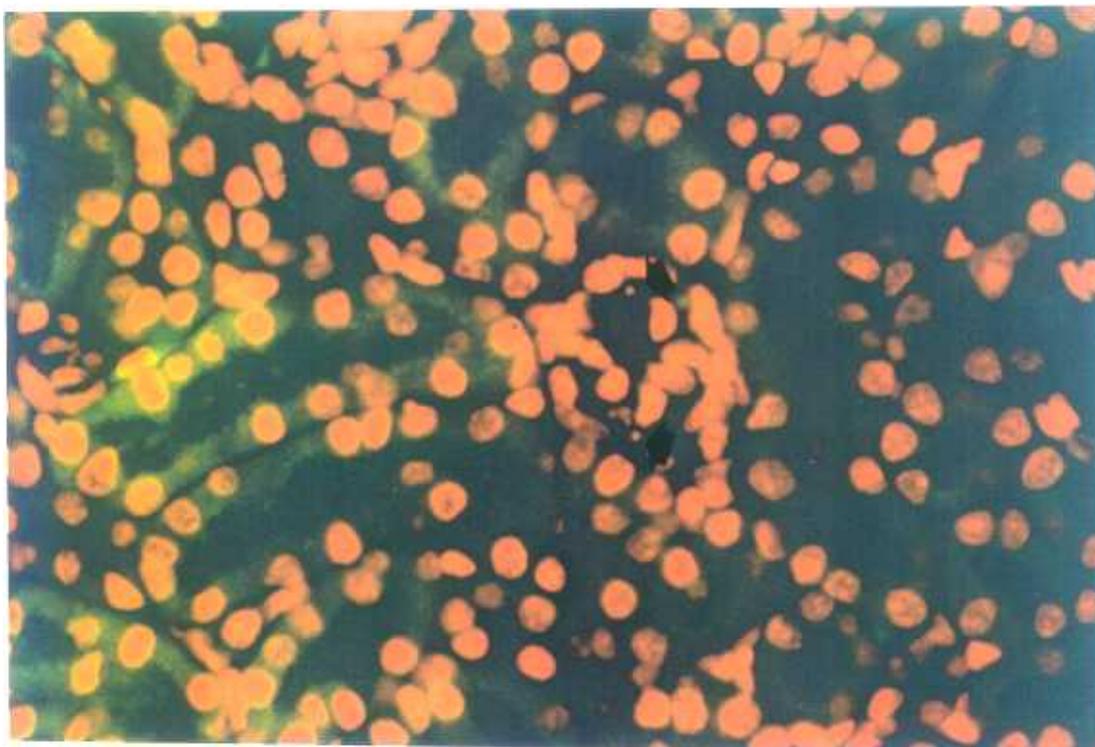
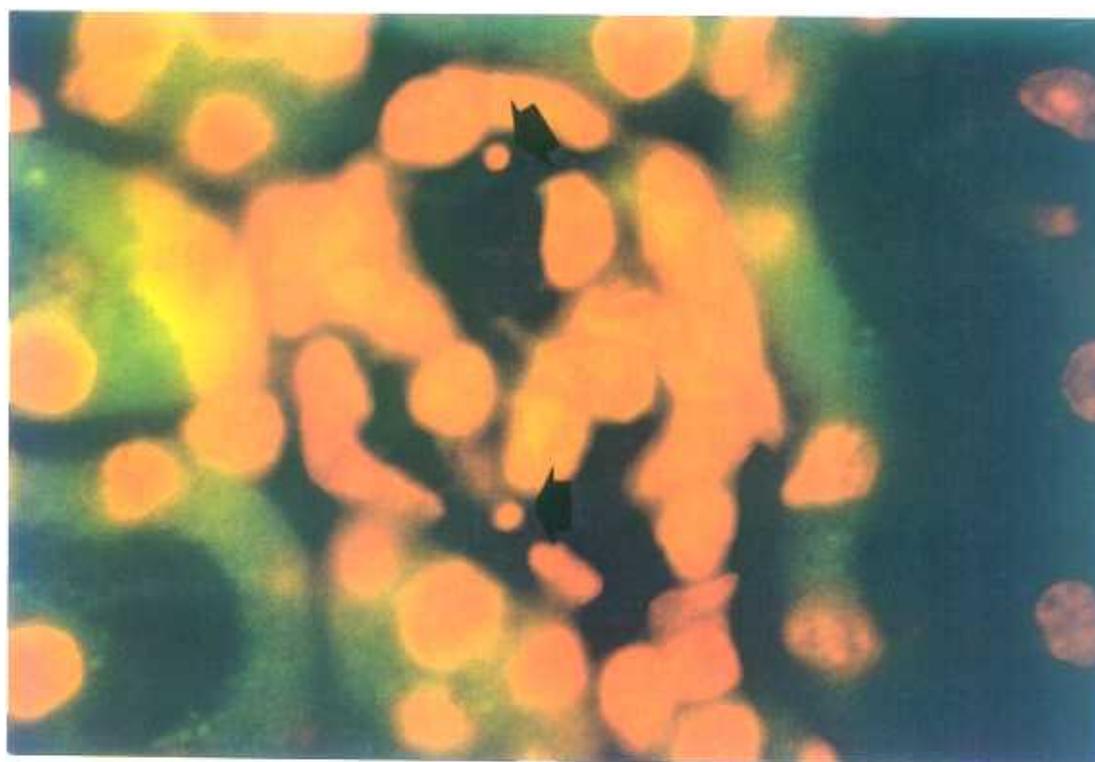
**Figura 34:** Los anticuerpos anti-Fas inducen mesangiólisis en ratones balb/c. Microscopía óptica de riñones obtenidos de ratones inyectados con (A) IgG control y (B,C) anticuerpos anti-Fas. Se aprecia en estos últimos una mesangiólisis, con depleción de células mesangiales y aumento relativo de la matriz extracelular. También se aprecian fragmentos nucleares en los glomérulos (flecha) (hematoxilina-eosina, x 200).

### 3.3. Caracterización de la apoptosis

Una vez establecido que el daño renal producido por los anticuerpos anti-Fas era independiente del complemento y que esta lesión podía ser producida por la activación de la maquinaria apoptótica, estudiamos la existencia de la misma por distintos métodos. Para ello teñimos las muestras renales con propidio de iodo, a fin de poner de manifiesto la morfología nuclear típica de la apoptosis. Observamos 1 ó 2 núcleos de aspecto apoptótico en cada glomérulo de ratones tratados con anti-Fas a las 24 horas (**Figura 35 B, C**) pero no en los controles (**Figura 35A**). Mediante propidio de iodo, y al igual que ocurrió con la microscopía óptica convencional, no observamos lesiones tubulares.

**A**

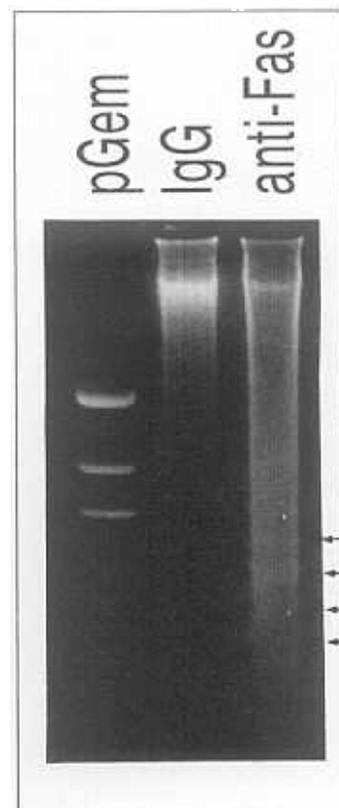


**B****C**

**Figura 35: Tinción con propidio de iodo de riñones de ratones inyectados con anti-Fas o IgG control. Por microscopía de fluorescencia se observan los nucleos apoptóticos (flechas) en los ratones con anti-Fas (B y ampliado C), que no se ven en los controles (A).**

Así mismo, se detectó la presencia de degradación internucleosomal del DNA en los riñones enteros de los ratones inyectados con los anticuerpos anti-Fas a las 24 horas (Figura 36).

**Figura 36: Degradación internucleosomal del DNA renal de ratones inyectados con anti-Fas.** Se muestra el marcador de peso molecular y a continuación el DNA genómico de ratones inyectados con IgG control y con anti-Fas 24 horas antes. En este último carril se observa la presencia de fragmentos múltiples de 200 pb.



### 3.4. Cambios en la expresión de genes que regulan la celularidad tisular durante el daño hepatorenal causada por Fas

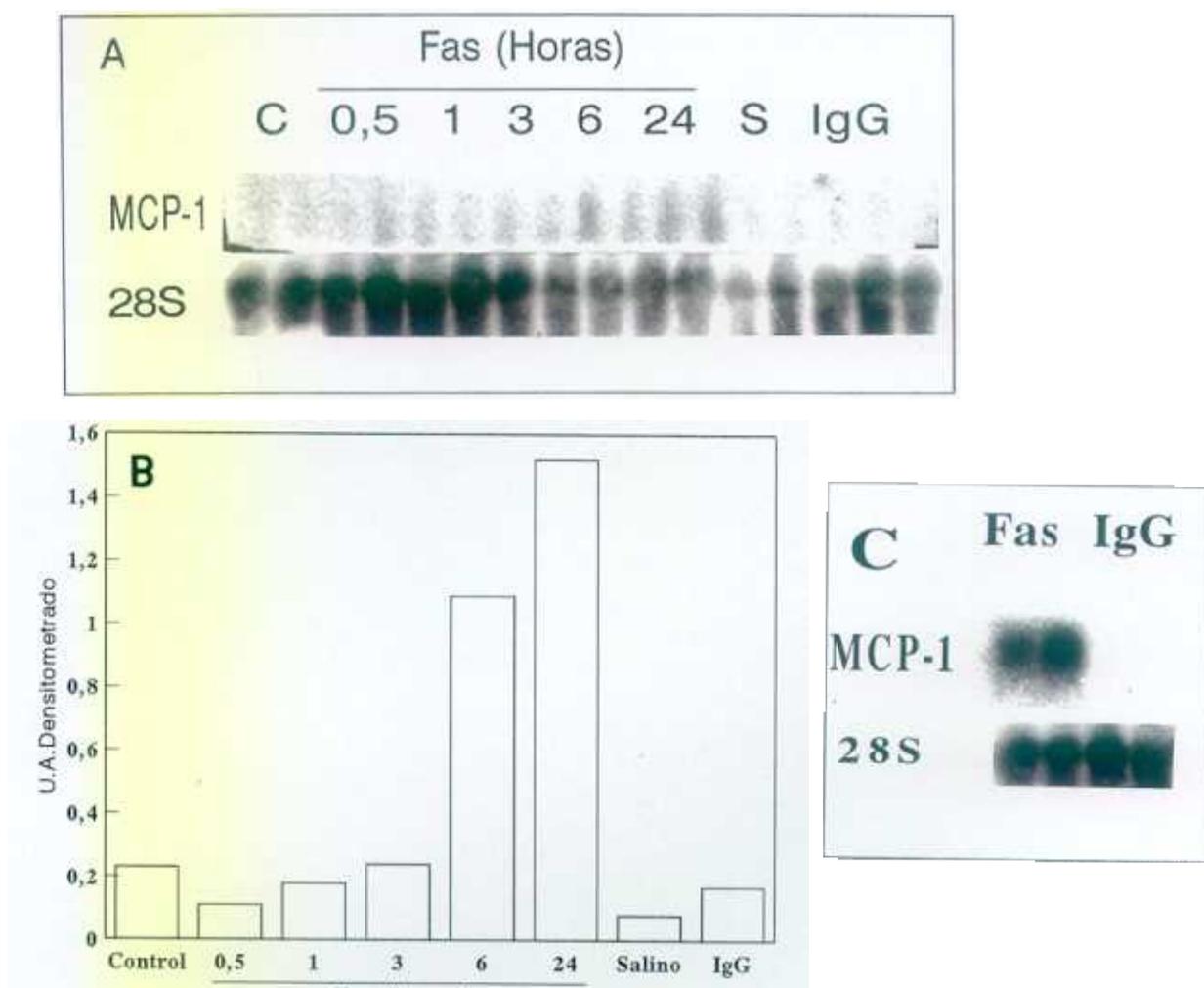
A fin de poner de manifiesto una posible relación de la lesión tisular causada por Fas con los distintos procesos que regulan la celularidad, estudiamos la expresión de genes que regulan la quimiotaxis (MCP-1), la supervivencia celular (bclxL) y la proliferación y muerte celular (c-fos y c-myc)

### 3.4.1. Aumento de la expresión génica de un factor quimiotáctico: MCP-1

El mecanismo por el que los monocitos infiltran el glomérulo en enfermedades inmunes no está muy claro, pero se cree que incluye una combinación de moléculas de adhesión y quimioattractantes. Una de estas es la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1) que es un péptido con un alto grado de especificidad para monocitos y tiene un papel muy importante en el reclutamiento de monocitos/macrófagos en el tejido dañado.

Estudiamos si la inyección de anticuerpos anti-Fas originaba una elevación en la expresión génica de esta citoquina, la cual podría producir una acumulación de células macrofágicas que eliminarían las células apoptóticas.

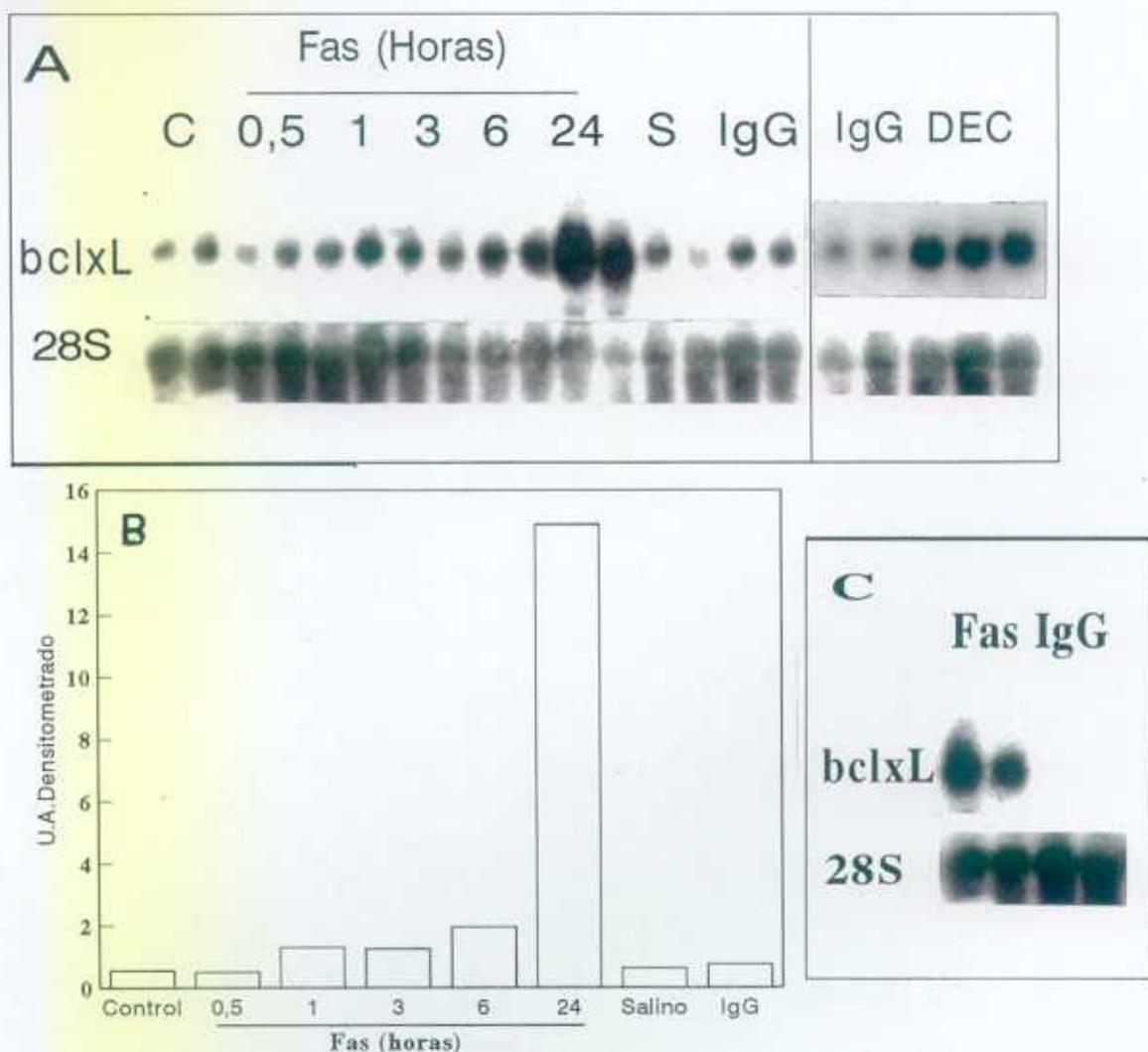
La inyección de anti-Fas incrementó la expresión renal y hepática de RNAm de MCP-1 (Figura 37). Este efecto fue evidente a las 6 horas, y aumentó a las 24 horas (aumento de 9.5 veces sobre el control en el riñón). Ni la inyección de vehículo (NaCl 0.9%) ni de IgG control modificaron la expresión de MCP-1.



**Figura 37: Anti-Fas aumenta la expresión de RNAm de MCP-1 in vivo.** (A) Northern-blot de MCP-1 en riñón. Se rehibridó con 28S. C- control sin inyectar; S- salino; IgG- IgG control. (B) Cuantificación del blot anterior. (C) Northern-blot de MCP-1 de hígados inyectados con IgG control y con anticuerpos anti-Fas 24 horas antes.

### 3.4.2. Aumento de la expresión de un gen regulador de la apoptosis: bclx-L

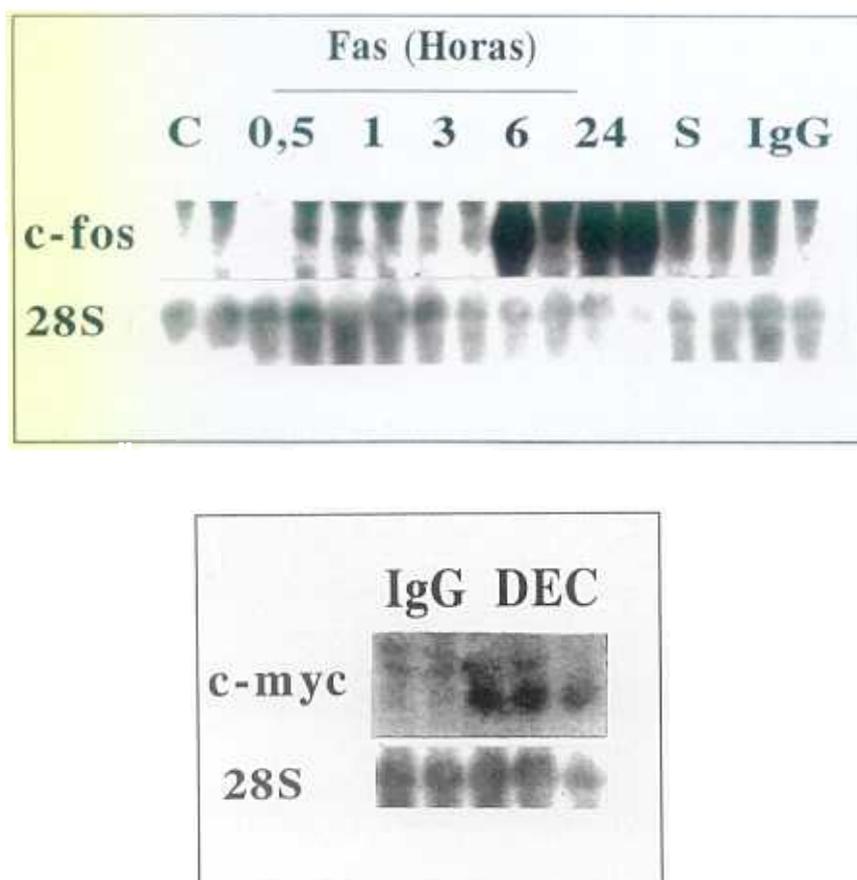
Cuando hibridamos los blots con bcl-xL, un gen protector de la apoptosis, comprobamos que una hora después de la inyección de anti-Fas aumentaba la expresión renal y hepática de bclxL, alcanzando un pico máximo a las 24 horas, siendo este incremento 26 veces superior a los controles (**Figura 38**). La deplementación no modificó este fenómeno (**Figura 38**) y ni la inyección de vehículo (NaCl 0.9%) ni de IgG control de hamster lo reprodujeron.



**Figura 38: Anti-Fas aumenta la expresión de RNAm de bclxL in vivo.** (A) Northern-blot de bclxL en riñón. Se rehibridó con 28S. C- control sin inyectar; S- salino; IgG- IgG control. (B) Cuantificación del blot anterior. (C) Northern-blot de bclxL de hígados inyectados con IgG control y con anticuerpos anti-Fas 24 horas antes.

### 3.4.3. Aumento de la expresión génica de factores de transcripción implicados en la proliferación y muerte celular: c-fos y c-myc

El efecto estimulador de la administración in vivo de anticuerpos anti-Fas no se limitó a bclxL. También observamos un incremento en la expresión renal de c-fos y c-myc, otros genes que codifican factores de transcripción relacionados tanto con la apoptosis como con la mitosis (**Figura 39**).



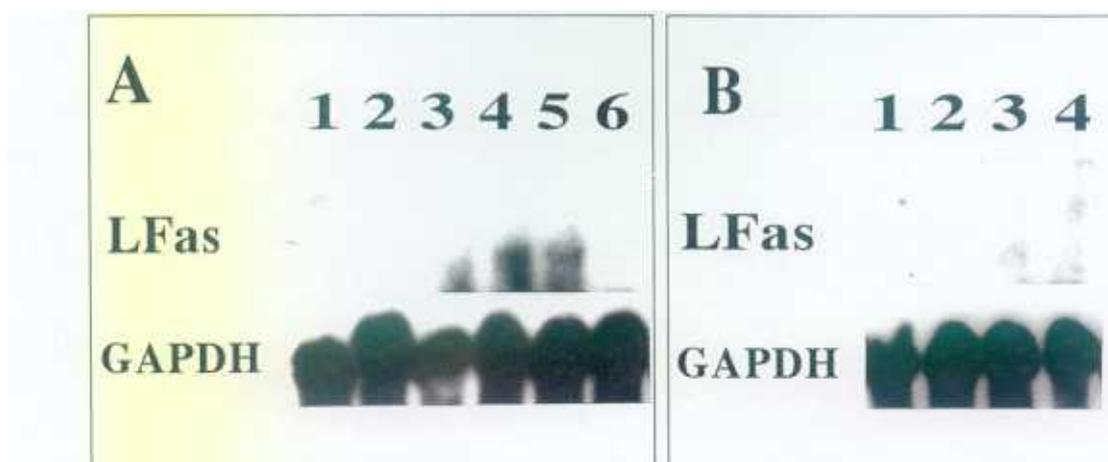
**Figura 39: Anti-Fas aumenta la expresión de RNAm de c-fos y c-myc en riñones.** Northern blot de RNAm de riñones inyectados con anticuerpos anti-Fas, hibridado con c-fos y c-myc y corregido por 28S. n=2 por cada punto. n=3 ratones de complementados. Se representa la hibridación para la sonda de c-fos de los ratones sin de complementados inyectados con anti-Fas a distintos tiempos, los ratones de complementados dieron el mismo patrón de expresión. Para c-myc se representa los ratones de complementados previamente a la inyección de los anticuerpos. Los ratones sin de complementados dieron el mismo patrón de expresión.

#### 4. EXPRESION DE FAS-LIGANDO DE FAS DURANTE EL DAÑO RENAL: ENDOTOXEMIA

Hasta ahora habíamos comprobado que las células renales expresan Fas y que la actuación de Fas es letal para células renales in vitro e in vivo. Decidimos estudiar la expresión de Fas y de su ligando durante el daño renal in vivo.

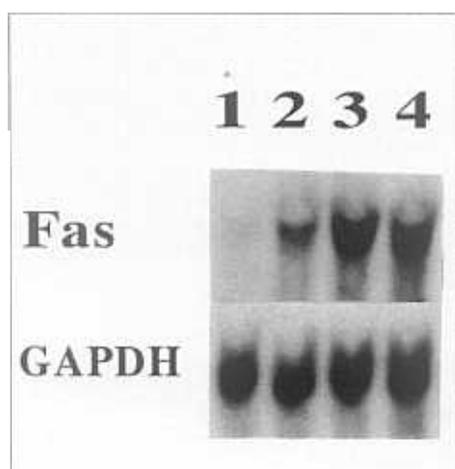
Ya hemos observado que el LPS es capaz de inducir la expresión de Fas en células renales. Además el LPS sensibilizaba a las células tubulares a la acción letal de Fas. Por otra parte, el TNF, una citoquina producida durante la endotoxemia, induce la expresión del ligando de Fas. En vista de estos resultados, quisimos comprobar si en un modelo de endotoxemia se observaban cambios en la expresión renal de Fas y de su ligando y si existían evidencias de apoptosis.

La inyección intraperitoneal de 500  $\mu$ g de LPS en ratas Wistar y 200  $\mu$ g de LPS en ratones balb-c aumentó la expresión renal de ligando de Fas. La endotoxemia indujo en riñón de rata la expresión del ligando de Fas con un patrón temporal similar al observado en células mesangiales en cultivo (**Figura 40A**). En riñones murinos el RNAm del ligando de Fas se encuentra ya elevado a las tres horas, alcanzando valores 2 veces superiores a los controles al cabo de 24 horas (**Figura 40B**).



**Figura 40:** La expresión renal del RNAm del ligando de Fas está elevada durante la endotoxemia. (A) Northern blot de riñones de rata hibridados con el ligando de Fas y con GAPDH como control de carga. 1- control, 2- 30 minutos, 3- 1 hora, 4- 3 horas, 5- 4,5 horas, 6- 24 horas tras la inyección de LPS. (B) Northern blot de riñones murinos hibridados con el ligando de Fas y con GAPDH como control de carga. 1- control, 2- 3 horas, 3- 8 horas, 4- 24 horas, después de la inyección de LPS.

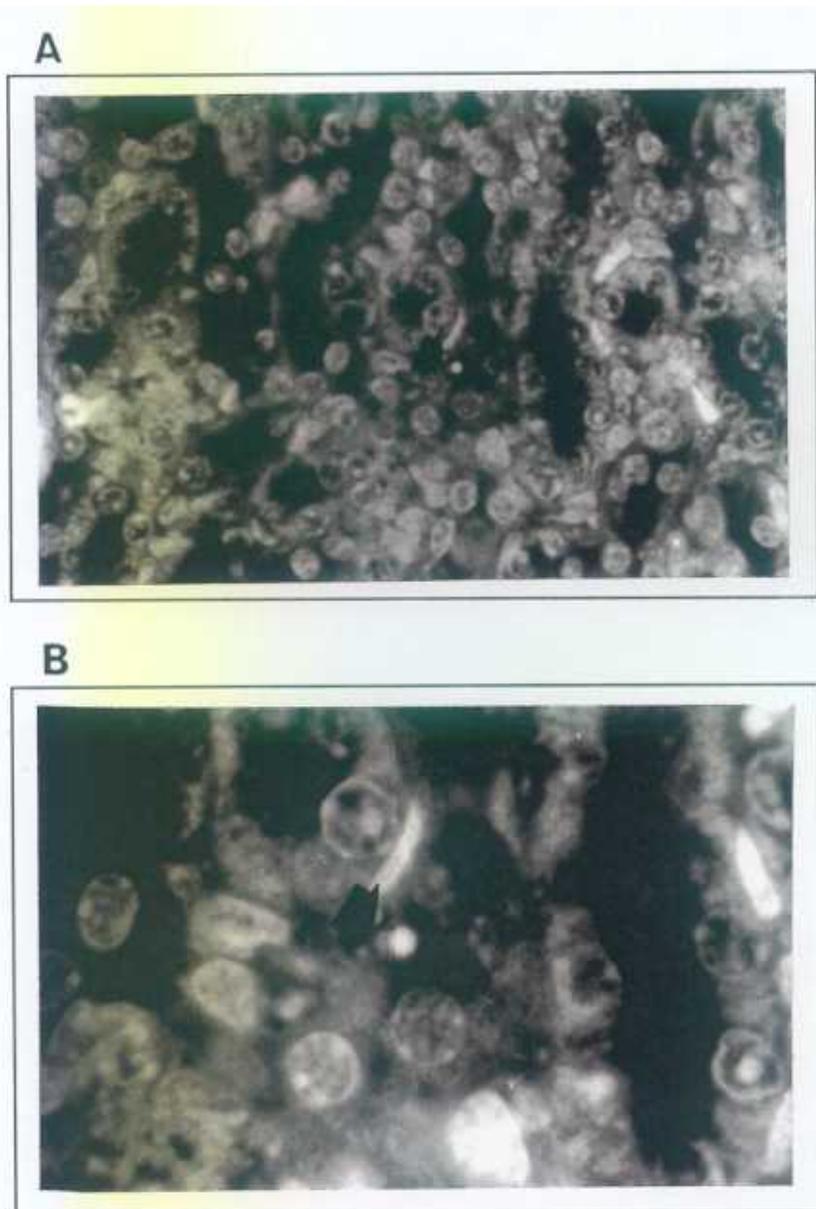
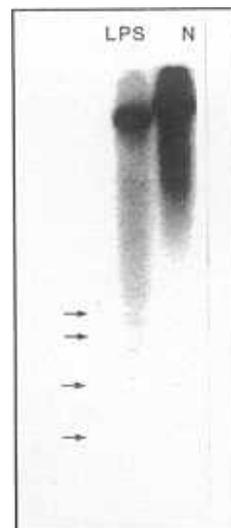
Durante la endotoxemia también observamos un aumento del RNAm de Fas en el riñón. Este aumento se notó a las 3 horas después de la inyección de LPS y persistió al menos hasta 48 horas después (**Figura 41**). Esta dosis no fue letal en estas primeras 48 horas.



**Figura 41:** Aumento de la expresión renal de RNAm de Fas inducido por LPS. En la parte superior se muestran las bandas correspondientes a la expresión de Fas del control y a las 3, 8 y 24 horas después de la inyección de LPS. Debajo están las bandas correspondientes a GAPDH que se utilizan como control de que se ha cargado lo mismo en todos los pocillos.

Durante la endotoxemia se ha comprobado que existe apoptosis en diversos órganos como el timo [Wang et al., 1993] y se ha observado la presencia de núcleos picnóticos en el riñón. Nosotros hemos comprobado que en ratones con endotoxemia existe un patrón de degradación internucleosomal del DNA renal (**Figura 42**) y la tinción con propidio de iodo puso de manifiesto en los glomérulos la presencia de los típicos cuerpos apoptóticos aunque en escaso número (**Figura 43**)

**Figura 42: Degradación internucleosomal del DNA renal de ratones inyectados con LPS.** Se muestra el DNA genómico de ratones inyectados con 200  $\mu$ g de LPS (LPS) o salino (N) 24 horas antes. Podemos ver la presencia de fragmentos múltiples de 200 pb en los ratones inyectados con LPS.



**Figura 43: Tinción con propidio de iodo de riñones de ratones inyectados con 200  $\mu$ g de LPS 24 horas antes.** Por microscopía de fluorescencia se observaron escasos núcleos apoptóticos (flecha) en los ratones inyectados con LPS (A) que no se ven en los controles. (B): Detalle de A.

## **V. DISCUSSION**

El sistema ligando de Fas-Fas está recibiendo considerable atención en los últimos meses, sobre todo en su relación con la regulación de la respuesta inmune y con su posible papel en la terapéutica oncológica y en la lesión hepática [Nagata et al., 1995b]. Sin embargo, apenas se ha estudiado su hipotética participación en patología renal. El primer trabajo que se interesó por la expresión renal de RNAm de Fas no fue capaz de demostrar su presencia en este órgano [Watanabe-Fukunaga et al., 1992b]. Cuando más adelante se describió la capacidad de los anticuerpos anti-Fas para inducir apoptosis en el hígado in vivo, no se prestó atención a sus posibles efectos en el riñón [Ogasawara et al., 1993]. En esta tesis hemos abordado la hipótesis de que Fas juega un papel en la patogenia del daño renal. Con este fin hemos seguido cuatro de las cinco líneas de evidencia propuestas por Johnson y cols [Johnson et al., 1993] para que una citoquina y su receptor se puedan considerar implicadas en patología renal: 1) la citoquina y su receptor deben estar presentes en el riñón, 2) la activación del receptor origina respuestas biológicas en células renales, 3) la activación del receptor in vivo causa o agrava la lesión renal, 4) durante el daño renal está aumentada la expresión de la citoquina y/o el receptor y 5) el antagonismo específico de la citoquina mejora la evolución de la nefropatía.

### **1. Durante el daño renal tanto las células renales intrínsecas como los leucocitos infiltrantes son fuentes potenciales de ligando de Fas**

Hemos abordado el posible origen del factor endógeno que activa Fas, el ligando de Fas, una citoquina similar al TNF, durante la lesión renal. Existen varias vías por las que el ligando de Fas podría llegar al riñón: sistémica, paracrina y autocrina.

El ligando de Fas podría ser secretado a la circulación sistémica, al igual que ocurre con el TNF. Sin embargo, la expresión local de citoquinas parece jugar un papel más importante en el daño renal. Hasta ahora los linfocitos T eran la única fuente conocida de ligando de Fas [Nagata et al., 1995b]. La citotoxicidad de los linfocitos T está

mediada, en parte, por la activación del receptor Fas de la célula diana por el ligando de Fas de la membrana del linfocito T [Rouvier et al., 1993; Stalder et al., 1994]. Los linfocitos T que infiltran el glomérulo y el intersticio [D'Amico, 1988; Kelly et al., 1991], tienen capacidad para matar células renales [Weiss et al., 1993], y esto podría estar mediado por el ligando de Fas. En este caso una sola célula podría expresar Fas y ligando de Fas, pero también sería posible que unas poblaciones de células T expresen solo ligando de Fas y sean capaces de matar a células que expresen Fas mientras ellas quedan intactas [Nagata et al., 1995b].

Otro aspecto novedoso de nuestro trabajo es la constatación de que células no linfoides, como los macrófagos y las células renales glomerulares, tubulares y fibroblastos del intersticio renal, son capaces de expresar el gen del ligando de Fas.

La expresión de ligando de Fas por células mesangiales, sobre todo en presencia de otras citoquinas que participan en el daño glomerular, como el TNF, podría colaborar en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria a nivel glomerular. En linfocitos T la activación de Fas puede inducir proliferación, cuando existe un microambiente de citoquinas adecuado [Alderson et al., 1993]. Durante la fase activa de las glomerulonefritis el microambiente de citoquinas podría favorecer la activación y proliferación de macrófagos y linfocitos T por el ligando de Fas de las células mesangiales [Mangan et al., 1991a, 1991b]. Asimismo, esta citoquina podría estimular la secreción de factores quimiotácticos por macrófagos, lo que amplificaría la respuesta inflamatoria. No podemos descartar que el ligando de Fas de células renales actúe de forma autocrina. Sin embargo, durante la resolución de las glomerulonefritis el microambiente de citoquinas podría favorecer el efecto letal de Fas y colaborar así el aclaramiento de leucocitos del glomérulo.

En el espacio tubulointersticial, tanto las células tubulares como los fibroblastos podrían expresar ligando de Fas, y así interactuar con linfocitos y macrófagos. Previamente se ha demostrado que las células tubulares expresan otras moléculas coestimuladoras de linfocitos, como B7, y que pueden participar en la presentación de antígeno y activación de linfocitos [Hagerty et al., 1994].

## 2. Las células renales expresan un receptor Fas funcional que causa muerte celular

En esta tesis hemos demostrado que diversas células renales murinas en cultivo (mesangiales, tubulares, fibroblastos) expresan tanto RNA de Fas, como el propio receptor. Hemos comprobado que el receptor Fas de las células renales es funcional, y es capaz de transducir una señal que desencadena la muerte celular al ser activado mediante anticuerpos monoclonales anti-Fas. Esta muerte celular tiene características funcionales y morfológicas de apoptosis. La muerte celular inducida por Fas podría jugar un papel en la regulación del número de células mesangiales durante las glomerulonefritis, en la muerte de células tubulares durante el fracaso renal agudo y la atrofia tubular crónica, y en la regulación del número de fibroblastos intersticiales en la fibrosis renal.

El interés último de los estudios aquí presentados radica en su eventual aplicación al desarrollo de nuevos tratamientos para las nefropatías clínicas. Concretamente, y en lo que respecta a las glomerulonefritis, existe evidencia de que las células mesangiales pueden tener fenotipos que son específicos de especie [Abbott et al., 1992]. En este sentido, hemos comprobado que las células mesangiales humanas también poseen un receptor Fas que transduce una señal de muerte celular, y que está regulado por citoquinas. Esto permite especular que gran parte de los resultados obtenidos en modelos murinos podrían ser también extrapolados al ser humano.

Existe un porcentaje de células renales cultivadas que sobreviven tras el estímulo con anticuerpos anti-Fas. La razón de que estas células sobrevivan no es la carencia de receptores Fas, ya que un inhibidor de la síntesis de RNA, la actinomicina D las sensibiliza a la acción letal de la activación de Fas. Hemos de recordar que no todas las estirpes celulares que poseen el receptor Fas responden con apoptosis a la activación de éste [Miyawaki et al., 1992; Mapara et al., 1993]. La susceptibilidad a la muerte celular de las células extrarrenales que poseen el receptor Fas depende de factores intracelulares, de que posean la maquinaria necesaria para cumplir el programa genético del suicidio celular y de que posean niveles insuficientes de factores protectores [Takayama et al., 1995; Sato et al., 1995].

El hecho de que un porcentaje de las células mesangiales se apoptosen tras la activación del receptor Fas indica que expresan la maquinaria genética necesaria para suicidarse. Por otra parte, el hecho de que la actinomicina D aumente la letalidad de los

anticuerpos anti-Fas, sugiere que existen factores intracelulares que, de forma más o menos efectiva, protegen a las células renales frente a la acción letal de Fas. Al impedir la síntesis de estas moléculas protectoras con actinomicina D, la célula quedaría desprotegida frente a la letalidad de Fas y se suicidaría. Esta evidencia experimental que hemos recogido concuerda con estudios recientes en células no renales, según los cuales, el equilibrio dinámico de varias moléculas determinaría la sensibilidad de la célula a la apoptosis en general y a la muerte inducida por Fas en particular [Steller, 1995]. Estos trabajos han demostrado que Bcl2 protege, parcialmente, de la muerte por Fas. La expresión de altos niveles de Bag-1, una proteína que interacciona con Bcl2, convierte la protección otorgada por Bcl2 en casi absoluta [Takayama et al., 1995]. Por el contrario, la elevada expresión de Bax, otra proteína que se une a Bcl2 e inhibe su acción, sensibilizaría las células a la muerte inducida por Fas [Boise et al., 1993]. Recientemente se ha clonado otro regulador negativo de la señal de muerte celular inducida por Fas, FAP-1, que implica la existencia de una proteína tirosina quinasa en algunos aspectos de la citotoxicidad mediada por Fas [Sato et al., 1995]. Existen, además, proteínas que son imprescindibles para que Fas sea letal. Así se ha demostrado que las células de ratones que carecen de ICE (ratones "knock-out") son resistentes a la muerte por Fas, a pesar de expresar este receptor [Kuida et al., 1995].

### **2.1. Las células mesangiales expresan constitutivamente los factores que regulan la apoptosis**

En este trabajo hemos demostrado que las células mesangiales cultivadas expresan constitutivamente los genes que codifican las distintas proteínas, tanto protectoras como letales, que regulan la supervivencia celular. También comprobamos que el riñón de ratones sanos expresa estos genes (datos no presentados). Los niveles de expresión relativos de los distintos factores podrían determinar la baja sensibilidad a la muerte inducida por Fas de las células mesangiales cultivadas en condiciones basales. Así, mientras la expresión de bcl2, bclxL y bax era fácilmente detectable por Northern blot, la expresión del gen letal ICE no pudo ser detectada por este método, y requirió una técnica más sensible, la RT-PCR, lo que sugiere que sus niveles de expresión en células mesangiales son bajos. Sin embargo, la expresión de ICE es detectable por Northern blot

en monocitos y macrófagos (datos no publicados), que son más sensibles a la acción letal de Fas.

## **2.2. Fas tiene acciones distintas a la muerte celular: MCP-1**

Tanto en las células mesangiales como en los monocitos Fas induce la expresión de la quemoquina MCP-1. La activación de Fas tiene efectos aditivos con otras citoquinas como el TNF y con la endotoxina bacteriana (LPS) sobre la expresión de MCP-1, por lo que Fas podría participar en el reclutamiento de macrófagos en diversas situaciones fisiopatológicas, incluida la sepsis. Queda por aclarar si éste es un efecto directo de Fas o si depende de la inducción de apoptosis. En este último caso, los nuevos determinantes de membrana de las células apoptóticas activarían receptores específicos en las células sanas [Trials et al., 1995], y desencadenarían la expresión de factores quimiotácticos.

## **2.3. Interacción de citoquinas y Fas**

Los factores que regulan la expresión de Fas y de su ligando son mal conocidos. En este trabajo hemos observado que una citoquina cuya participación en el daño glomerular está ampliamente demostrada, el TNF [Ortiz et al., 1995], aumenta la expresión de ligando de Fas en células mesangiales, y de Fas en distintas estirpes de células renales. El TNF incrementa la expresión de RNAm de Fas al cabo de una hora y durante, al menos, 48h. El número de receptores Fas en la superficie de las células mesangiales aumentó progresivamente con los días de estimulación. Este mismo patrón temporal se observó tras el estímulo con LPS, y recuerda al de los timocitos activados [Drappa et al., 1993]. El incremento en la expresión de Fas inducido por TNF parece tener una traducción funcional, puesto que las células mesangiales preestimuladas con TNF resultaron más sensibles a la acción letal de Fas. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que han demostrado que el número de receptores Fas es proporcional a la letalidad inducida por la activación del receptor [Clement et al., 1994]. Sin embargo, existe también la posibilidad de que el TNF altere el equilibrio del sistema intracelular regulador de la apoptosis. De hecho, el TNF modula la expresión de genes reguladores de la apoptosis en células tubulares renales [Ortiz et al., 1993]. Estos datos sugieren que el efecto nocivo del

TNF en patología glomerular podría estar mediado, en parte, por la activación del sistema Fas.

Otras citoquinas implicadas en el daño renal como la IL-1 $\beta$  y el IFN $\gamma$  [Ortiz et al., 1994a] también inducen la expresión de Fas. Hasta ahora el IFN $\gamma$  era la única citoquina cuya capacidad para estimular la expresión de Fas en células no linfoides había sido demostrada [Watanabe-Fukunaga et al., 1992a]. En nuestro trabajo hemos observado que el IFN $\gamma$  aumenta la expresión de Fas y sensibiliza a las células mesangiales a la acción citotóxica de anti-Fas. En otros estudios [Yonehara et al., 1989] ya se había visto que la actividad citolítica del TNF y de anti-Fas está aumentada en células no renales cuando se pretratan con IFN $\gamma$ .

### **3. Activación de Fas como factor desencadenante de daño glomerular**

Una vez demostrado *in vitro* que las células renales poseen receptores Fas funcionales, decidimos comprobar si la activación *in vivo* de Fas era capaz de desencadenar patología renal. Recientemente se ha descrito que la inyección intraperitoneal de anticuerpos anti-Fas induce apoptosis de hepatocitos *in vivo* [Ogasawara et al., 1993]. Además, la muerte celular ocurría tan rápida y extensamente que a los macrófagos no les daba tiempo a fagocitar a las células apoptóticas resultando en la progresión de los hepatocitos a una necrosis secundaria liberando componentes tóxicos y letales. Decidimos utilizar el mismo sistema experimental para estudiar un posible efecto de la activación de Fas sobre las células mesangiales *in vivo*. Comprobamos que lo habíamos reproducido ya que la inyección de anticuerpos anti-Fas indujo apoptosis del hígado [Ogasawara et al., 1993]. Además, estudiamos detenidamente la patología renal ocasionada por anti-Fas y observamos que existían lesiones en los glomérulos, concretamente en el mesangio, lo que confirma que las células mesangiales expresan Fas *in vivo*.

La lesión glomerular se caracterizó por mesangiolisis, con una depleción celular y un aumento relativo de la matriz extracelular. Este efecto fue rápido, a las 3 horas ya se observaban algunos núcleos fragmentados, y aumentó progresivamente a lo largo de 24 horas. Este patrón temporal concuerda con el de la mortalidad observada en células mesangiales cultivadas tratadas con anti-Fas. La muerte celular glomerular tenía características de apoptosis. Este es el primer estudio que indica que la apoptosis puede

causar daño glomerular. Es de destacar que el número de núcleos con morfología apoptótica (entre 1 y 2 por glomérulo) supera la magnitud de la apoptosis observada en el otro modelo experimental de nefritis en que se ha sugerido un papel de la apoptosis, la resolución de la glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-Thy-1 en la rata [Baker et al., 1994]. De hecho, la tasa máxima de apoptosis en este modelo fue de una célula apoptótica por cada 5 glomérulos [Baker et al., 1994]. Teniendo en cuenta que la vida media de una célula apoptótica in vivo es de alrededor de una hora [Steller, 1995], la tasa de apoptosis observada en nuestro modelo justifica la intensa depleción celular observada en los glomérulos al cabo de 24 horas.

No observamos patología tubular en ratones inyectados con anti-Fas, a pesar de que las células tubulares cultivadas son sensibles a la acción letal de Fas. Sin embargo, cuando las células cultivadas no han sido previamente estimuladas con factores que aumentan la expresión de Fas, la letalidad es baja. Tan solo podemos especular sobre los motivos de la ausencia de lesión tubular. Es posible que, dada la dificultad para objetivar bajas tasas de apoptosis in vivo, la lesión haya ocurrido y no hayamos sido capaces de observarla. Es posible que una mayor dosis o mayor tiempo de seguimiento pusiera en evidencia la lesión tubular. También es posible que las células tubulares expresen pocos receptores Fas in vivo, o que expresen altos niveles de factores protectores.

Nos planteamos la posibilidad de que el daño renal fuera mediado por complemento, ya que existe la posibilidad teórica de que los anticuerpos anti-Fas se unan a la membrana celular y fijen complemento que lise la célula. Para ello comprobamos que tanto la lesión renal como los cambios en la expresión de genes se producían también en animales de complementación. Además, no pudimos ver depósitos glomerulares de C3, ni de clusterina en ratones inyectados con anti-Fas. La clusterina es una glicoproteína que se une al complejo de ataque a la membrana [Tschopp et al., 1993] y que se encuentra depositada en el glomérulo, junto al complemento, en distintas glomerulonefritis experimentales y humanas [Murphy et al., 1988].

### **3.1 ¿Por qué los ratones MRL-lpr/lpr, que tienen un defecto en la expresión de Fas, sufren una glomerulonefritis grave?**

Los resultados de este trabajo sugieren que Fas puede jugar un papel en la génesis de, al menos, algunas formas de daño glomerular. No podemos dejar de discutir la aparente contradicción de que el lupus de ratones MRL-lpr/lpr esté causado por la inserción de un endotransposon en el gen Fas [Adachi et al., 1993], que dificulta la producción de RNAm de Fas y que, a pesar de esto, estos ratones tengan una glomerulonefritis autoinmune grave [Boswell et al., 1988]. La falta de expresión de Fas en linfocitos es la responsable del desarrollo de autoinmunidad en estos ratones [Nagata et al., 1995b]. Hay varias posibles explicaciones para esta aparente contradicción. En primer lugar, Fas es solo uno de varios mediadores implicados en el daño renal, por lo que su ausencia no impediría por completo la lesión renal, sobre todo cuando el defecto es congénito, lo que permite el desarrollo de mecanismos compensadores del déficit, tal y como se ha demostrado repetidamente en ratones "knock-out". Esto no excluye un posible papel terapéutico de estrategias destinadas a antagonizar el efecto de Fas. En segundo lugar, el defecto en la expresión de Fas en estos ratones no es absoluto [Nagata et al., 1995a]. La expresión de Fas está disminuida un 90% en los órganos linfoides y el hígado [Chu et al., 1993]. Además, nosotros hemos comprobado que el riñón de los ratones MRL-lpr/lpr posee RNAm de Fas, que es inducible in vivo mediante la inyección de endotoxina (no publicado).

### **3.2. Durante el daño renal causado por Fas se activan genes que regulan la supervivencia y muerte celular, la mitosis y la quimiotaxis**

Una vez comprobado que Fas era capaz de desencadenar una lesión glomerular caracterizada por una depleción intensa de la celularidad in vivo, decidimos estudiar la influencia de este hecho sobre los mecanismos que regulan el número de células de un órgano: supervivencia y muerte celular, proliferación y quimiotaxis. Para ello elegimos un gen representativo de cada uno de estos procesos.

### 3.2.1 Genes reguladores de la supervivencia celular: bclxL

Observamos que la inyección de anticuerpos anti-Fas induce cambios en la expresión de genes que regulan la apoptosis. En concreto, la expresión de RNAm de bclxL está aumentada en el riñón e hígado de ratones inyectados con anti-Fas. Sin embargo, no pudimos reproducir el incremento de bclxL in vitro ni en células mesangiales ni en monocitos tratados con anti-Fas. Esto sugiere que los cambios en la expresión de bclxL observados in vivo se deben a algún otro factor que es producido en respuesta a la lesión inducida por Fas in vivo, o que el efecto de Fas necesita la colaboración de otras moléculas. En este sentido, observamos que la asociación del TNF y la activación de Fas incrementaban la expresión de bclxL en monocitos, pero no vimos este efecto cuando ambos se añadían por separado.

BclxL es la isoforma de bclx que protege de la apoptosis, con una eficacia similar e incluso superior a bcl-2. El incremento en la expresión de bclxL podría ser un fenómeno compensatorio, que tendiera a aumentar la resistencia frente a la muerte celular de las células que habían sobrevivido a la agresión inicial.

### 3.2.2 Genes implicados en la muerte y proliferación celular: c-myc y c-fos

c-myc y c-fos son dos factores de transcripción que participan tanto en el ciclo celular como en la apoptosis. El efecto final de la sobreexpresión de estos genes depende en parte del microambiente de citoquinas. En un microambiente propicio favorecen la proliferación celular, pero en un microambiente adverso promueven la muerte celular por apoptosis [Collata et al., 1992; Evan et al., 1992]. En este sentido, pueden colaborar en la regulación del número de células adaptando la respuesta de la célula a la disponibilidad de factores de supervivencia. En el modelo que hemos estudiado, el aumento de c-fos y c-myc fue tardío, lo que sugiere que no participarían directamente en la muerte celular observada y que podría señalar el comienzo de la proliferación compensadora que cabría esperar después de una depleción masiva de células.

### **3.2.3. Expresión de un gen que codifica una proteína quimiotáctica: MCP-1**

El MCP-1 es una citoquina quimiotáctica específica de monocitos que puede ser producida por varios tipos celulares, incluyendo células mesangiales glomerulares, y puede ser estimulada por citoquinas y complejos inmunes [Hora et al., 1992]. Juega además un papel muy importante en el reclutamiento de monocitos/macrófagos dentro del tejido dañado [Yoshimura et al., 1991].

Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por células adyacentes y macrófagos. Durante el desarrollo fetal existe una alta tasa de apoptosis, acompañada de un infiltrado de macrófagos [Woolf et al., 1994; Lang et al., 1993]. Los macrófagos forman parte de la celularidad local en otros sistemas en los que se considera que la muerte celular tiene lugar por apoptosis, como la atrofia tubular renal crónica [Gobe et al., 1991]. ICE, uno de los genes que causa apoptosis, también puede activar el reclutamiento de células inflamatorias, ya que promueve la secreción de citoquinas [Kuida et al., 1995]. Es más, en el hígado de los ratones inyectados con anti-Fas observamos infiltrados inflamatorios focales. A fin de intentar aclarar los factores que promueven el acúmulo de leucocitos tanto en los ejemplos citados como en los ratones inyectados con anti-Fas, estudiamos la expresión génica de MCP-1 [Brown et al., 1992]. La expresión de MCP-1 aumentó en los riñones e hígados de ratones inyectados con anti-Fas. Como ya hemos comentado, in vitro logramos reproducir la inducción de MCP-1 en células mesangiales y monocitos.

## **4. Incremento de la expresión local de ligando de Fas y Fas durante el daño renal. El ejemplo de la sepsis**

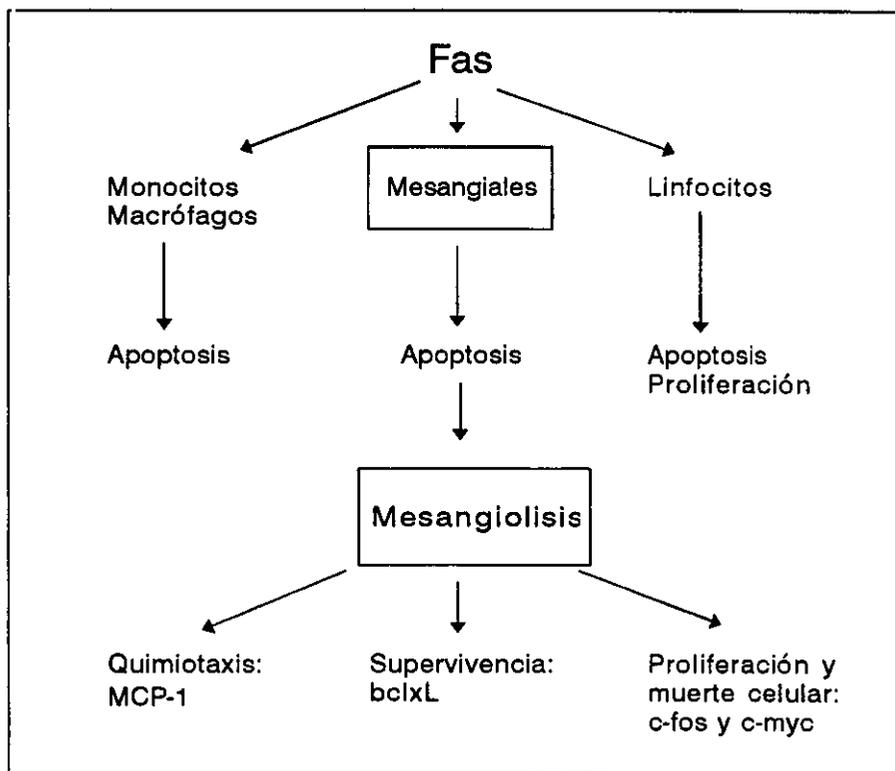
La sepsis, al igual que su complicación letal, el shock séptico, es una de las principales causas de mortalidad en infecciones clínicas bacterianas [Natanson et al., 1994]. El lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas es el principal factor responsable del shock séptico. Los mamíferos responden a la presencia de LPS produciendo una gran variedad de mediadores celulares inmunes, entre los cuales se encuentra el TNF y otras citoquinas [Natanson et al., 1994]. El antagonismo específico del TNF es un tratamiento eficaz de la endotoxemia en animales de experimentación [revisado en Natanson et al 1994]. Sin embargo, ni esta ni otras estrategias anticitoquinas o basadas en los más

recientes conocimientos sobre los mecanismos de esta complicación han resultado eficaces en el ser humano [Natanson et al., 1994]. Esto sugiere que existen grandes lagunas en el conocimiento de la patogenia de la sepsis. Recientemente se ha identificado la ocurrencia de apoptosis en la endotoxemia [Wang et al., 1994]. La apoptosis podría colaborar a la disfunción de distintos órganos, y sería preciso determinar qué citoquinas liberadas durante la endotoxemia son capaces de producirla. En este sentido, el ligando de Fas, una citoquina similar al TNF es un candidato obvio. Nosotros hemos demostrado, por primera vez, que durante la endotoxemia experimental en ratones y ratas está elevada la expresión renal tanto del ligando de Fas como del receptor Fas. La inyección de anti-Fas en ratones reproduce algunas manifestaciones de la endotoxemia, como letargia, lesión hepática, insuficiencia renal y leucopenia [Ogasawara et al., 1993], aunque en las primeras 24 horas no hemos observado lesión tubular renal. Si bien nuestros resultados no demuestran de un manera concluyente que la activación de Fas participe en el daño tisular de la endotoxemia, hemos de resaltar que el LPS induce in vitro la expresión de Fas en células renales y que la apoptosis inducida por la activación de Fas en células tubulares (la célula renal más dañada durante la sepsis) se ve multiplicada cuando estas células han sido activadas con LPS. Además hemos observado que durante la endotoxemia también aumenta la expresión de Fas en el timo, un órgano donde existe apoptosis durante la sepsis [Wang et al., 1994], y en otros órganos dañados en la sepsis como hígado y pulmón. Por otra parte, y aunque no hemos profundizado en el tema, hemos encontrado evidencia morfológica y funcional de apoptosis de células tubulares durante la endotoxemia, que confirman los hallazgos de otros autores [Harel et al., 1993; Terada et al., 1994].

Los datos aquí mostrados pueden servir de base para un mejor conocimiento de la patogenia de la sepsis y sugieren que se deben ensayar estrategias tendentes a antagonizar Fas en esta enfermedad.

En resumen, podemos concluir que el ligando de Fas es una citoquina que induce muerte celular en algunas de las células que expresan el receptor Fas. Nosotros hemos podido demostrar que el receptor Fas y su ligando se expresa en células renales en cultivo bajo la regulación de factores que participan en el daño renal. También sabemos que linfocitos y macrófagos expresan la citoquina y el receptor. La activación de Fas induce

muerte celular y apoptosis de células glomerulares y tubulointersticiales cultivadas. Es más, la inyección de anticuerpos anti-Fas in vivo produce una mesangiólisis, así como la activación de una serie de genes quimiotácticos y de supervivencia y proliferación celular relacionando así a Fas con los distintos procesos que regulan la celularidad renal. Finalmente, la elevada expresión de Fas y de su ligando durante la endotoxemia, así como la presencia de apoptosis en el riñón de estos animales, y la sensibilidad de las células tubulares cultivadas estimuladas con LPS a la muerte inducida por Fas, sugieren que este nuevo sistema citoquina-receptor podría jugar un papel en la sepsis. Este trabajo sienta las bases teóricas para el ensayo de antagonistas de Fas en las glomerulonefritis y en la sepsis.



## **VI. CONCLUSIONES**

En esta tesis hemos abordado la hipótesis de que el sistema ligando de Fas-Fas juega un papel en la patogenia del daño renal. Hemos comprobado que:

1. **Las células renales** (células mesangiales glomerulares, células tubulares proximales y fibroblastos intersticiales) **expresan Fas y su ligando bajo la regulación de citoquinas y LPS**. En concreto, el  $TNF\alpha$ , la  $IL-1\beta$  y el  $IFN\gamma$  aumentan la expresión de Fas. *Estudiamos detalladamente el efecto del  $TNF\alpha$  y del LPS*. Ambos indujeron una respuesta dosis y tiempo dependiente. Entre los leucocitos, los monocitos macrófagos pueden ser fuentes de ligando de Fas durante el daño renal.

2. **La activación de Fas induce varias respuestas biológicas en células renales murinas y humanas** que incluyen muerte celular por apoptosis y expresión del factor quimiotáctico MCP-1. Las citoquinas que aumentan la expresión del receptor Fas, como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , también aumentan la respuesta de las células renales al estímulo de los anticuerpos anti-Fas.

3. **La activación de Fas causa una lesión glomerular caracterizada por mesangiolisis, proteinuria y hematuria, y por un incremento en la expresión renal de genes implicados en la quimiotaxis (MCP-1), supervivencia (bclx-L), y proliferación y muerte (c-myc, c-fos) celular.**

4. **La expresión renal de Fas y de su ligando está incrementada en un modelo de daño renal, la endotoxemia.** Además, durante la endotoxemia existe evidencia morfológica y funcional de apoptosis renal.

En conjunto, estos datos nos permiten concluir que es altamente probable que Fas juegue un papel en patología renal. La confirmación definitiva de esta hipótesis vendrá determinada por la comprobación de un efecto beneficioso del antagonismo específico de Fas sobre la evolución de nefropatías glomerulares o tubulares.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

Abbott F, Tam FWK, Ryan JJ, Rees AJ. Human mesangial cells synthesize IL-1 $\alpha$  but not IL-1 $\beta$ , IL-1RA or TNF. **Nephrol Dial Transplant** 1992; 10:997-1001.

Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen in lpr mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:1756-1760.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. **J Exp Med.** 1993; 178:2231-2235.

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.

Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang SN, Chisari V. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. **J Exp Med.** 1993; 178:1541-54.

Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. **Int Rev Exp Pathol** 1991; 32:223-253.

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.

Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. **Cell** 1992; 70:31-46.

Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of cell death. **Cell** 1993; 74:597-608.

Boswell JM, Yui MA, Burt DW, Kelley VE. Increased tumor necrosis factor and IL-1 gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis. **J Immunol** 1988; 141:3050-3054.

Brown Z, Strieter RM, Neild GH. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. **Kidney Int** 1992; 42:95-101.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JC, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. **Science** 1994; 263: 1759-1762.

Chiu VK, Walsh CM, Liu CC, Reed JC, Clark WR. Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. **J Immunol** 1995; 154:2023-2032 .

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 1987; 162:156-159.

Chu JL, Drappa J, Parnassa A, Elkon KB. The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon ETn. **J Exp Med** 1993; 178:723-730.

Clement MV, Stamenkovic I. Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. **J Exp Med** 1994; 180: 557-567.

Coles HSR, Burne JF, Raff MC. Large scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. **Development** 1993; 118: 777-784.

Collata F, Polentarutti N, Siboni N, Mantovani A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. **J Biol Chem** 1992; 267:18278-18283.

D'Amico. Role of interstitial infiltration of leukocytes in glomerular diseases. **Nephrol Dial Transplant** 1988; 3:596-600.

Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children [letter]. **Blood**. 1994; 83:3101-3.

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.

Evan GI, Wyllie AH, Gilbert C, Littlewood T, Land H, Brooks M, Waters C, Penn L, Hancock D. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc. **Cell** 1992; 69:119-128.

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.

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.

Gobe GC, Axelsen RA. The role of apoptosis in the development of renal cortical tubular atrophy associated with healed experimental renal papillary necrosis. **Pathology** 1991; 23:

213-23.

Gómez-Guerrero C, González E, Egado J. Evidence for a specific IgA receptor in rat and human mesangial cells. **J Immunol** 1993; 151:7172-7181.

Gómez-Chiarri M, Ortíz A, Lerma JL, Mampaso F, González E, Egado E. Involvement of tumor necrosis factor and platelet activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. **Lab Invest** 1994; 70:449-459.

Gottschall AR, Boise LH, Thompson CB, Quintans J. Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91:7350-7354.

Gresser J, Woodrow D, Moss J, Maury C, Tavernier J, Fiers W. Toxic effects of recombinant tumor necrosis factor in suckling mice. Comparisons with interferon  $\alpha/\beta$ . **Am J Pathol** 1987; 128:13-18.

Hagerty DT. Kidney tubule cells demonstrate tissue-specific regulation of costimulator expression. **JASN** 1994; 5:750.

Harel Y, Silva M, Giroir B, Weinberg A, Cleary TB, Beutler B. A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. **J Clin Invest** 1993; 92:2110-2116.

Harrison DJ. Cell death in the diseased glomerulus. **Histopathology** 1988; 12: 679-683.

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.

Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. **Hepatology** 1994; 19:1354-9.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell** 1993; 75:241-251.

Hora K, Satriano J, Santiago A, Mori T, Stanley ER, Shan Z, Schlondorff D. Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. **Proc Natl Acad Sci** 1992, 89:1745-1749.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell** 1991; 66: 233-243.

Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. **J Immunol** 1993a; 151:621-627.

Itoh N, Nagata S. A novel domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **J Biol Chem** 1993b; 268:10932-10937.

Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. **EMBO J.** 1994; 13:1899-910.

Johnson RJ, Floege J, Couser WG, Alpers CE. Role of platelet-derived growth factor in glomerular disease. **J Am Soc Nephrol** 1993; 4:119-128.

Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262:1274-1277.

Kelly CJ, Roth DA, Meyers CM. Immune recognition and response to the renal interstitium. *Kidney Int* 1991; 31:518-530.

Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105:13-20.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* 1995; 267:2000-2003.

Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362:786-788.

Lang RA, Bishop JM. Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell* 1993; 74:453-62.

Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2830-4.

Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 1994; 367:281-284.

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.

Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha and IL-1

beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood lymphocytes. **J Immunol** 1991a; 146:1541-1546.

Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and proinflammatory cytokines. **J Immunol** 1991b; 147:3408-3412.

Mapara MY, Bargou R, Zugack C, Dohner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH, Dorken B. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. **Eur J Immunol** 1993; 23: 702-708.

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.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. **Cell** 1993; 75:653-660.

Miyashita t, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell** 1995; 80:293-299

Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S, Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. **J Immunol** 1992; 149:3753-3758.

Moller P, Henne C, Leithauser F, Eichelmann A, Schmidt A, Bruderlein S, et al. Coregulation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule-1 (CD40) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center B cells and in follicle center and

mediastinal B-cell lymphomas. **Blood** 1993; 81:2067-2075.

Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, D'Apice AJF. SP-40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. **J Clin Invest** 1988; 81:1858-1864.

Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. **Immunol Today** 1995a; 16:39-43.

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. **Science** 1995b; 267:1449-1456.

Natanson C, Hoffman WD, Sufferdini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. **Ann Intern Med** 1994; 120:771-783.

Negrini M, Silini E, Kozak C, Tsujimoto Y, Croce CM. Molecular analysis of *mbcl2*: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. **Cell** 1987; 49:455-463.

Ni R, Tomita Y, Matsuda K, Ichihara A, Ishimura K, Ogasawara J, Nagata S. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. **Exp Cell Res** 1995; 215:332

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. **Science** 1993; 259:1769-1771.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **J Biol Chem** 1992; 267: 10709-10715.

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: 806-9.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell** 1993; 74:609-619.

Ortiz A, Karp SL, Danoff TM, Neilson EG. Expression of survival promoting bcl2 oncogene by renal cells and whole kidney. **J Am Soc Nephrol** 1993; 4:742 (abstract).

Ortiz A, Gomez-Chiarri M, Bustos C, et al. The potential role of inflammatory mediators and fibrogenic cytokines in the pathogenesis of glomerular diseases. **J Lipid Med** 1994a; 9:55-74.

Ortiz A, Neilson E. Expression of bax and bcl-x, members of the bcl-2 gene family, in murine tubular cells and acute renal failure. **J Am Soc Nephrol** 1994b; 5:906.

Ortiz-Arduan A, Neilson E. Apoptotic cell death in renal disease. **Nefrologia** 1994c; 14:391-407.

Ortiz A, Gómez-Chiarri M, Bustos C, Alonso J, Gómez-Guerrero C, Gómez-Garre D, López-Armada MJ, Egido J. Involvement of tumor necrosis factor alfa in the pathogenesis of experimental and human glomerulonephritis. **Adv Nephrol** 1995; 24:53-78.

Perry ME, Levine AJ. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. **Current Opinion in Genetics and Development** 1993; 3:50-54.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. **Nature** 1992; 356:397-400.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death

and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262:695-700.

Rawson CL, Loo DT, Duimstra JR, Hedstrom OR, Schmidt EE, Barnes DW. Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1991; 113:123-132.

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.

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.

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.

Rodriguez TG, Collins MK, Garcia I, Lopez RA. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *J Immunol* 1992; 149:535-540.

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.

Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: A protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 1995; 268:411-414.

Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlondorff. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 1993; 150:1971-1978.

Savill J. Apoptosis and the kidney. **J Am Soc Nephrol** 1994; 5:12-21.

Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, Otoole 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.

Schmid DS, Tite JP, Ruddle NH. DNA fragmentación: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986; ,83:1881.

Schwartz LM, Kosz L, Kay BK.: Gene activation is required for developmentally programmed cell death: **Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.** 1990; 87:6594-8.

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.

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.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science** 1995; 267:1445-1449.

Strasser A, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. Enforced bcl2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:8661-8665.

Strutz F, Caron R, Tomaszewski J, Fumo P, Ziyadeh F, Neilson EG. Transdifferentiation: a new concept in renal fibrogenesis. **J Am Soc Nephrol** 1994; 5:819.

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.

Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; 179:873-879.

Sylvestre DL, Ravetch JV. Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* 1994; 265:1095-1098.

Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76:969-976.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995; 80:279-284.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goedel DV. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; 74:845-853.

Terada Y, Tomita K, Yamada T, Nonoguchi H, Marumo M. Apoptosis-related genes ICE, Bcl-2, Fas and FasL are expressed in microdissected rat nephron segments and changed in renal damage. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:911(abstract).

Thompson EB, Nazabeth LV, Thulasi R, Ashraf J, Harbour D, Johnson BH. Glucocorticoids in malignant lymphoid cells: gene regulation and the minimal requirement fragment required for lysis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; 41:273-283.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.

Trauth BC, Klas C, Peters AMJ. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245:301-305.

Trial JA, Birdsall HH, Hallum JA, Crane ML, Rossen RD, et al. Phenotypic and functional changes in peripheral blood monocytes during progression of human immunodeficiency virus infection. Effect of soluble immune complexes, cytokines, subcellular particulates from apoptotic cells, and HIV-encoded proteins on monocyte phagocytic function, oxidative burst, transendothelial migration, and cell surface phenotype. *J Clin Invest* 1995; 95:1690-1701.

Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8b and the b domain of C9. *J Immunol* 1993; 151:2159-2165.

Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *C. Elegans* by human bcl-2. *Science* 1992;258:1955-1959

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76:777-779.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75:229-240.

Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J. Ich-1, an ICE/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 1994; 78:739-750.

Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1993; 152:5014-5021.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan C, Copeland N, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992a; 356:314-317.

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* 1992b; 148:1274-1279.

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 (abstract).

Wolf G, Haberstroh U, Neislon EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 1992; 140: 95-107.

Woolf AS, Neuhaus TJ, Kolatsi M, Winyard PJ, Klein NJ. Nephron formation is inhibited by LPS and by TNF. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:641.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80:285-291

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.

Yoshimura T, Yuhki N. Neutrophil attractant/activation protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit. cDNA cloning and their expression in spleen cells. *J Immunol* 1991; 146:3483-3488.

---

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 1993; 75:641-652.

Zychlinsky A, Zheng LM, Liu C, Young JD. Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. *J Immunol* 1991; 146:393-400.