

# Interferón gama y factor necrosante de tumores/linfotoxina en el cultivo mixto de linfocitos de candidatos y donadores de trasplante renal

Martín Correa, Jorge Ossa, Miguel Builes, Mario Arbeláez

**Basados en el papel central que ejercen el interferón gama (INF- $\gamma$ ) y el factor necrosante de tumores (FNT) en los procesos de activación e inflamación y en los efectos antivirales de éstos, nos propusimos determinar sus niveles en cultivos mixtos de linfocitos (CML) de parejas de candidatos receptores/donadores de trasplante renal. Mediante radioinmunoanálisis y ensayo biológico correlacionamos estos niveles con la presencia de episodios de rechazo e infección por citomegalovirus (CMV) en el período postrasplante.**

## INTRODUCCION

Las citoquinas comprenden una amplia clase de proteínas celulares que controlan la amplitud y duración de la respuesta inmune. Se caracterizan porque a menudo son glicosiladas, y por bajo peso molecular (80 kd); ejercen su efecto en forma paracrina o autocrina en el microambiente donde se producen, interactúan con receptores de superficie celular y regulan la transcripción de un sinnúmero de genes por mecanismos de segundos mensajeros poco comprendidos.

El número de citoquinas ha aumentado en forma considerable en los últimos años y consecuentemente la nomenclatura de estos factores se

ha hecho más compleja. Se dividen en monoquinas o linfoquinas, según la célula productora principal (monocitos o linfocitos, respectivamente); el término interleuquina se reserva para aquellas citoquinas cuyos genes y estructura proteica ya han sido determinadas (1).

El interferón gama (IFN- $\gamma$ ) es una interleuquina de composición glicoproteica, que es secretada por los linfocitos T, principalmente, luego de la inducción por un estímulo antigénico o mitogénico. El IFN- $\gamma$  pertenece al grupo de interferones descubiertos inicialmente por su efecto antiviral. Existe también el interferón  $\alpha$  y  $\beta$  que son producidos, principalmente, por macrófagos y fibroblastos, respectivamente.

Además de su actividad antiviral, el IFN- $\gamma$  ejerce una plétora de efectos biológicos que incluyen diversas actividades inmunomoduladoras: es un elemento esencial en la activación de macrófagos, es un poderoso inductor de antígenos de superficie, principalmente antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y aparentemente cumple también un papel importante en la producción de anticuerpos (1-3).

El factor necrosante de tumores (FNT)/caquectina es una proteína liberada por los macrófagos activados, en respuesta principalmente a estimulación por endotoxina. Esta sustancia fue originalmente descrita en el suero de ratones inoculados con bacilos de calmette-guerin y endotoxina bacteriana; su característico efecto *in vivo* es la producción de necrosis de tumores. La similitud biológica y funcional de esta molécula con la

Dr. Martín R. Correa: Profesor Facultad de Medicina Universidad de Cartagena; Dres. Jorge K. Ossa, Miguel Builes y Mario Arbeláez: Profesores Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Solicitud de separatas al Dr. Correa.

caquectina, descubierta en conejos infectados con tripanosoma y responsable de la caquexia, llevó a la conclusión de que se trataba de una misma sustancia, mediadora de diferentes efectos biológicos. Además de la endotoxina se ha demostrado que otros agentes tienen la capacidad o propiedad de inducir esta citoquina, entre los cuales se encuentran ciertas partículas virales (1, 4-6).

Es importante decir que el FNT comparte numerosas actividades biológicas con la interleuquina 1 (propiedades inflamatorias, efectos en el endotelio vascular, adhesión de leucocitos, activación de linfocitos), pero tienen diferentes receptores celulares. Hay considerable evidencia que los efectos inducidos *in vitro* también ocurren *in vivo* y pueden jugar papeles importantes en la evolución de la respuesta inflamatoria y en la injuria vascular. El FNT producido por los macrófagos es también denominado FNT- $\alpha$  para distinguirlo de la linfotoxina (LT), producto linfocitario estrechamente relacionado, al cual se le llama FNT- $\beta$ . Los linfocitos además de producir FNT- $\beta$  producen FNT- $\alpha$ , al ser estimulados con ésteres de forbol simultáneamente con un ionóforo de calcio como A23187; sin embargo en los macrófagos sólo se ha detectado producción de FNT- $\alpha$  (1,4-7).

Los genes de la LT y el FNT/caquectina se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma seis humano, separados por cerca de 1100 pb. A pesar de la limitada homología genética, la LT ejerce un rango de actividades biológicas que son concordantes con las de FNT/caquectina, tanto *in vivo* como *in vitro*.

El FNT/caquectina tiene diversos efectos biológicos que comprenden: muerte de células tumorales *in vitro*, regresión de tumores *in vivo*, inhibición de actividad de proteína lipasa (actividad de caquectina), mediador de algunos de los efectos letales de la endotoxina en animales, estimulación de granulocitos y aumento de su adhesividad, daño a las células endoteliales, resorción ósea, actividad antiviral y efectos citotóxicos contra parásitos de la malaria (4-6).

El IFN- $\gamma$  también aumenta la producción de

FNT y sensibiliza las células al FNT porque incrementa la expresión de receptores para esta citoquina (2).

La reacción de rechazo y la infección por citomegalovirus (CMV) son las dos principales dificultades en el área de los trasplantes. Y el mayor agente infeccioso en este grupo es el CMV, denominado "el gnomo de los trasplantes".

El rechazo de los trasplantes y la infección por CMV son fenómenos estrechamente relacionados entre sí y dependientes ambos del grado de histocompatibilidad entre donador y receptor y de la inmunosupresión terapéutica (8).

El propósito del presente trabajo fue hacer una primera aproximación a la posibilidad de utilizar estas sustancias como predictores del éxito del trasplante renal en el marco de nuestros estudios relacionados con CMV y trasplante.

En estudios tendientes a lograr la reactivación del CMV *in vitro* en trasplantados (9), decidimos medir los niveles de estas linfotoxinas y correlacionar estos niveles con la presencia de episodios de rechazo e infección por CMV en el período postrasplante.

#### MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron candidatos a trasplante renal y sus respectivos donadores, apareados por el grupo de Trasplantes del Hospital Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP). A estas parejas se les hizo estudio serológico para CMV y se les practicó CML pretrasplante, en el momento de la determinación de anticuerpos citotóxicos (una a dos semanas antes del trasplante). Los cultivos se incubaron por cinco días, con adición de 3H- timidina para obtener resultados de proliferación; simultáneamente se hicieron CML en idénticas condiciones, excepto la adición de timidina. El sobrenadante de los CML se congeló a 70 grados C, a las 24 horas para la medición del FNT, y a los cinco días para IFN- $\gamma$ .

Los pacientes trasplantados fueron estudiados clínicamente por el grupo de trasplantes durante un año y cuando se presentó un síndrome febril, se practicó análisis citológico en orina en búsqueda de células de inclusión compatible con CMV.

También se utilizaron combinaciones de individuos normales histocompatibles (haploidénticos) para determinar la cinética de producción de estos factores *in vitro*.

### Bioensayo en células L-929

Se utilizó la prueba biológica con células L-929 susceptibles a FNT/LT (10), en la siguiente forma: se sembraron 0.2 ml con  $2 \times 10^4$  células L-929 en RPMI-1640 (Difco) + 5% SBF en platos estériles de 96 pozos (Nunc) fondo plano y se incubaron por 24 horas a 37 grados C en cámara humidificada. Posteriormente se tomaron los sobrenadantes de los CML, se hicieron diluciones dobles en RPMI-1640 (con actinomicina D,  $\mu\text{g/ml}$ ), se sembró cada dilución (200  $\mu\text{l}$  de volumen final) por cuadruplicado sobre la monocapa de células L-929 y se reincubó por 20 horas.

Luego se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de solución de rojo neutro (0.033% en PBS p/v), se incubó por una hora, se removió el medio y se lavó dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS a 37 grados C. Posteriormente se lisaron las células con 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla 50% v/v de etanol y 0.1 M de fosfato sódico monobásico. La lectura de la absorbancia se realizó en un microlector de ELISA a 550 nm.

El título resulta de la más alta dilución de la muestra que cause 50% de citotoxicidad comparado con el control de células (100%). Esta técnica detecta la actividad conjunta de FNT y LT sin distinguir entre uno y otro.

### Radioinmunoensayo (RIA)

Por este método se determinaron el IFN- $\gamma$  y el FNT- $\alpha$ .

El sistema RIA (IFN- $\gamma$  o FNT- $\alpha$ ) es un radioinmunoensayo de fase sólida en una configuración de "emparedado". Las esferas de poliestireno cubiertas con anticuerpo de ratón, monoclonal específico, para IFN- $\gamma$  o FNT- $\alpha$  humano, son incubadas con los especímenes y con los estándares apropiados. El anticuerpo trazador específico que reconoce un epítipo diferente al monoclonal inicial, está marcado con  $^{125}\text{I}$ .

Se generó una curva estándar (concentración de IFN- $\gamma$   $\mu\text{g/ml}$  o FNT- $\alpha$   $\text{pg/ml}$ ) contra la

radiactividad específica (cpm), determinada en un contador gama.

Se probaron las muestras de sobrenadantes de CML, siguiendo las instrucciones del laboratorio productor (Centocor, Great Valley Parkway).

### Análisis estadístico

Se calcularon las medias aritméticas y se utilizó ANOVA para establecer diferencias entre pacientes con rechazo e infección por CMV y pacientes sin rechazo.

### RESULTADOS

En dos pruebas diferentes para la determinación de IFN- $\gamma$  y FNT, la curva de controles estándar arrojó un coeficiente de correlación de 0.99.

Se analizó la cinética de producción de FNT- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en el CML mediante el RIA entre dos individuos normales (Tabla 1). Los mayores nive-

**Tabla 1.** Cinética de producción de factor necrosante de tumores (FNT) e interferon gama (IFN-Gama) en el cultivo mixto de linfocitos.

	FNT (pm/ml)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
A + B	1467	437.5	474.7	225
A X B	1678	801	189	73
A X B*	1307	151.7	473	26
B X A*	1259	155	262	10
A X P*	1219	324	258	0
B X P*	898.5	425	189	58

	IFN-Gama	
	24 h	120 h
A + B	2.2	0.96
A X B	NR	42
A X B*	4.6	66
B X A*	1.5	29
A X P*	2.3	52
B X P*	NR	NR

A= Individuo normal

B= Otro individuo normal

\*= Células irradiadas con 2500 rads.

\*P= Mezcla de células de tres personas no relacionadas.

NR= No realizado

les del FNT- $\alpha$  se pudieron detectar a las 24 horas, desapareciendo progresivamente en los días subsiguientes. Por su parte el IFN- $\alpha$  presentó niveles mínimos a las 24 horas y mayores a las 120 horas (quinto día).

En los sobrenadantes de CML de las 12 parejas estudiadas (receptor/donador) (AxB\*), se obtuvo un promedio de IFN- $\gamma$  mayor (9 u/ml) en los pacientes que presentaron rechazo al comparar con aquellos que no presentaron rechazo (5.8 u/ml) (Tabla 2). De igual forma el promedio de los niveles de IFN- $\gamma$  en los pacientes que presentaron enfermedad por CMV fue más elevado (5.8 u/ml) (Tabla 2). Sin embargo en ninguno de los dos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas.

En ocho parejas se pudieron obtener resultados de la reactividad del receptor contra la mezcla de

**Tabla 2.** Determinación de niveles de interferón gama en sobrenadantes de cultivos mixtos de linfocitos entre receptor/donador de trasplante renal (AxB\*) y relación con rechazo, infección por citomegalovirus y linfoproliferación (XRR).

No.	IFN-Gama U/ml	%RR	Rechazo	CMV
1	20.3	92	+	+
2	9.6	90	-	-
3	13	30	-	-
4	1.5	78	-	-
5	1.5	14	-	-
6	5.6	35	+	+
7	13	41	+	+
8	1.5	17	+	-
9	3.2	35	-	-
10	9	60	-	-
11	3	73	-	-
12	4.7	20	+	+

No.= Número asignado al candidato  
 AxB\*- Células del candidato por las del donador irradiadas (2500 rads)  
 Promedio de IFN-gama en pacientes con rechazo= 9 U/ml.  
 Promedio de IFN-gama en pacientes con citomegalovirus= 8.96 U/ml.  
 Promedio de IFN-gama en pacientes sin rechazo= 5.8 U/ml.  
 Promedio de IFN-gama en pacientes sin citomegalovirus= 5.8 U/ml.

células de personas no relacionadas; como lo muestra la Tabla 3 se encontró que la producción de IFN- $\gamma$  es también mayor en los pacientes que presentaron rechazo (23.6 u/ml), que en aquellos que no lo presentaron (12.5 u/ml). Igualmente, en los pacientes que sufrieron enfermedad por CMV fueron más elevados los niveles promedio de IFN- $\gamma$  (25 u/ml) que en los pacientes que no la presentaron (13.6 u/ml). Tampoco, en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En células L-929 se sembraron 56 muestras de sobrenadantes de CML por cuadruplicado, pero no se detectó ningún efecto sobre este sistema.

DISCUSION

A pesar de que los progresos en el área de la tipificación HLA han hecho posible el avance de los trasplantes de órganos, el rechazo sigue siendo la mayor limitante de la eficiencia de este procedimiento. Para afinar la tipificación se dispone en la actualidad del análisis de fragmentos longitudinales de restricción (RFLP) y más

**Tabla 3.** Determinación de niveles de interferón gama en sobrenadantes de cultivos mixtos de linfocitos de candidatos de trasplante renal (A x P\*) y relación con rechazo, infección por citomegalovirus y linfoproliferación (% RR).

No.	IFN-gama	Rechazo	CMV	%RR
1	47	+	+	92
2	5	-	-	90
7	13	+	+	41
8	19	+	-	17
9	11	-	-	35
10	32.6	-	-	60
11	0.4	-	-	73
12	15.7	+	+	20

(A x P\*)= Cédulas del candidato contra una mezcla de células de tres personas no relacionadas, irradiadas (2.500 rads)  
 Promedio de INF-gama de pacientes con rechazos 23.6 U/ml.  
 Promedio de INF-gama de pacientes sin rechazo= 12.25 U/ml.  
 Promedio de INF-gama de pacientes con CMV= 25 U/ ml.  
 Promedio de INF-gama de pacientes sin CMV= 13.6 U/ml.

novedoso aún, la amplificación de los genes específicos mediante "indicadores" conocidos por la reacción de polimerasa en cadena (PCR). A pesar de lo anterior, sería importante disponer también de pruebas funcionales como la producción de citoquinas que son al fin y al cabo los factores que van a modular la respuesta (11, 12).

En este estudio se intentó correlacionar los niveles de interferón gama con la presentación de rechazo, de enfermedad por CMV, grado de compatibilidad HLA (A+B,DR) y respuesta proliferativa (CPM y %RR), pero dada la amplia variabilidad de la respuesta entre los pacientes no se pudo determinar ninguna diferencia estadística significativa.

Los pacientes que presentaron episodios de rechazo produjeron mayores niveles de IFN- $\gamma$  tanto en respuesta a su donador, como frente a la mezcla de personas no relacionadas. En la misma forma, aquellos pacientes que presentaron enfermedad de CMV, presentaron mayores concentraciones de IFN- $\gamma$  en las dos condiciones analizadas.

La infección por CMV *in vitro* produce incremento en la expresión de antígenos HLA de clase I y  $\beta$ 2-microglobulina, pero no induce el aumento de antígenos de clases II. Sin embargo, si se agrega IFN- $\gamma$  a las células infectadas, se encuentra que la infección viral no inhibe la expresión de clase II inducida por la linfoquina. Esto concuerda con los hallazgos y postulados de Von Willebrand, relacionados con una mayor expresión de antígenos de clase II en los pacientes infectados por CMV; esto se daría por la simultaneidad de la infección y la producción de IFN- $\gamma$  y podría ser el evento central de la asociación patogénica entre CMV y rechazo (13-18). Adicionalmente, en relación con la patogénesis del rechazo y la infección, se ha demostrado que la expresión de antígenos de histocompatibilidad por el injerto es requisito indispensable pero no suficiente para la reacción de rechazo (15).

La determinación seriada de algunas citoquinas en el curso de un trasplante renal para ayudar al diagnóstico precoz del rechazo ha sido desalentadora (19-21); sin embargo, las posibilidades de

utilizarlas como pruebas pronósticas no se han agotado. Conjuntamente con otras variables como HLA, serología para CMV, edad, relación con el donador, y %RR, podría eventualmente formarse un algoritmo para la predicción del éxito del trasplante.

Si la significancia estadística de las tendencias observadas en este trabajo se llegara a demostrar, podríamos elucubrar sobre si la potencialidad de sufrir un rechazo es innata y que constitutivamente el individuo que rechaza sería un alto productor de citoquinas. La aplicación práctica inmediata sería la medición de niveles de IFN- $\gamma$  como prueba predictiva y para ajustar el esquema inmunosupresor en cada situación.

Sería importante, debido a los altos costos del RIA y teniendo en cuenta la importancia del FNT/LT en la reacción alógena, en la replicación de algunos retrovirus y en la reacción con el IFN- $\gamma$  (22-24), tratar de aumentar la sensibilidad de la prueba biológica con células L-929 y recurrir también a la prueba biológica del INF. Finalmente, basados en el impacto científico y la trascendencia clínica de pruebas predictivas para el éxito del trasplante, sugerimos la necesidad de continuar esta línea de investigación.

#### SUMMARY

This study reports the levels of Tumor Necrosis Factor (TNF) and Gamma Interferon (INF- $\gamma$ ) produced in Mixed Lymphocyte Cultures (MLC) from recipient and donor of kidney transplants. The cytokines were tested by radioimmunoassay; the TNF was also measured by using a biologic test with L-929 cells. The results were correlated with HLA typing, alloproliferation, rejection episodes and incidence of Clinical Cytomegalovirus (CMV) infection. In those couples with rejection there was a non statistically significant tendency to produce greater concentrations of both TNF and INF- $\gamma$ ; this finding was also true for those that developed CMV infection. If these non significant tendencies become significant in further studies, they could open new perspectives to the study and therapeutic approach of rejection.

## AGRADECIMIENTOS

A Colcincias por su aporte económico a través del proyecto 1115-05-088-85.

## REFERENCIAS

1. **Balwill F.** Cytokines-soluble factors in immune responses. *Curr Op Immunol* 1988; **1**:241-249.
2. **Dijmans R, Billau A.** Interferon- $\gamma$ : a master key in the immune system. *Curr Op Immunol* 1988; **1**: 269-274.
3. **Grossberg SE, Taylor JL, Kushnaryov VM.** Interferon receptors and their role in interferon action. *Experientia* 1989; **45**: 508- 513.
4. **Beutler B, Cerami A.** The biology of cachectin/TNF- $\alpha$ : a primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989; **7**: 625-655.
5. **Selby P, Hobbs S, Viner C, Jackson E, Jones A, Newell, et al.** Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer* 1987; **56**: 803-808.
6. **Beutler B, Cerami A.** Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987; **316**: 379-385.
7. **Ito M, O'Malley J A.** Antiviral effects of recombinant human tumor necrosis factor. *Lymphokine Res* 1987; **6**: 309-318.
8. **Glenn J.** Cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Rev Infec Dis* 1981; **3**: 1151-1178.
9. **Correa MR, Ossa JE, García LF, Arbeláez M.** Histocompatibilidad, Cytomegalovirus y Trasplante Renal. *Acta Med Colomb* 1991;**16**: 234-243.
10. **Kramer SM, Carver M.** Bioassay for the detection o tumor necrosis factor. *J Immunol Meth* 1986; **6**: 309-318.
11. **Halloran P, Cockfield SM, Madrenas J.** The molecular immunology of transplantation and graft rejection. *Immunol Alter Clin North Am* 1989; **9**:1-18.
12. **Hayri P, Von Willebrand E, Parthenaise M, Nemlander A, Soots A, Lautenschanlager I, et al.** The inflammatory mechanisms of allograft rejection. *Immunol Rev* 1984; **77**: 85-142.
13. **Van Dorp W, Jonges E, Bruggeman C, Daha M, Van Es L, Van Der Woude J.** Direct induction of MHC class I, but not class II, expresión on endothelial cells by cytomegalovirus infection. *Transplantation* 1989; **48**: 469-472.
14. **Von Willebrand E, Paterson E, Ahjhone J, Havry P.** Cytomegalovirus infection, class II expression and rejection during the course of cytomegalovirus. *Transplant Proc* 1986; **18**: 32-34.
15. **Koene RA.** Major histocompatibility antigen expression in rejection: cause or consequence? *Transplant Proc* 1989; **21**: 1430- 1432.
16. **Simmons RL, Weil R, Tallent MB, Kjellstrand CM, Najarian JS.** Do mild infections trigger the rejection of renal allografts? *Transplant Proc* 1970; **2**:419-423.
17. **Rubin RH, Tolkoff-Rubin NE.** Infection: the new problems. *Transplant Proc* 1989; **21**: 1440-1445.
18. **Preiksaitis JK.** Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Immunol Aller Clin North Am* 1989; **9**: 137-151.
19. **Mackena R, Rush D, Bakkestad-Legare P, Jeffery JR.** Interleukin-2, interferon, and lymphotoxin in renal transplant recipients. *J Immunol* 1988; **45**:76-81.
20. **Monaco AP.** Lymphokine determinations for monitoring the renal allograft. *Transplant Proc* 1989; **21**: 3571-3573.
21. **Lin L, Shann TY, Lui WY, Peng FR.** Combined measurements of urinary neopterin, Beta-2 microglobulin and serum gamma interferon for early detection of renal graft rejection following change from cyclosporin A to immunosuppressive combination therapy. *Transplant Proc* 1989; **21**: 1874-1877.
22. **Yagi M, Holland JF, Bekesi JG.** Tumor necrosis factor enhances murine SL-3 retrovirus replication. *J Clin Immunol* 1987; **24**: 129- 134.
23. **Doherty PC, Allan JE, Clark IA.** Tumor necrosis factor inhibits the development of viraimen ingitis or induces rapid death depending on the severity of inflammation at time of administration. *J Immunol* 1989; **142**: 3576-3580.
24. **Shalaby M, Espevik T, Rice G, Ammann A, Figari I, Ranges G, et al.** The involvement of human tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* 1988; **141**: 499-503.