

## CITOQUINAS REGULADORAS DE LA RESPUESTA AL TRASPLANTE RENAL ALOGENICO

RITA L. CARDONI<sup>1</sup>, NORMA PRIGOSHIN<sup>2</sup>, MONICA L. TAMBUTTI<sup>2</sup>, JORGE R. FERRARIS<sup>3</sup><sup>1</sup>Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fatała Chabén, ANLIS y Servicios de <sup>2</sup>Histocompatibilidad y<sup>3</sup>Nefrología Pediátrica, Hospital Italiano, Buenos Aires

**Resumen** La aceptación o el rechazo del riñón alogénico dependen principalmente de la respuesta inmune y de su compleja regulación en la cual la red de citoquinas y otros mediadores juegan un importante papel. Actualmente, la biopsia renal es, a pesar de lo invasor del procedimiento, la herramienta de mayor utilidad para el control del rechazo al trasplante y el diagnóstico de las nefropatías asociadas. Por ello, es de gran interés encontrar métodos alternativos para el diagnóstico. La evaluación de citoquinas reguladoras de la respuesta inmune es un procedimiento sencillo y de bajo costo que podría ser de utilidad para incrementar la sensibilidad de la detección de diferencias polimórficas, para pronosticar la aceptación del trasplante y para la detección precoz del rechazo. Los estudios recientes sugieren que la producción exagerada de mediadores proinflamatorios, incluyendo a citoquinas Th1, sería desventajosa para la supervivencia del trasplante, mientras que la producción de citoquinas reguladoras anti-inflamatorias, como la interleuquina (IL)-10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF)- $\beta$ , sería beneficiosa. En las primeras etapas, la respuesta Th1 puede incrementar la actividad citotóxica y la detección de moléculas citotóxicas está asociada al rechazo agudo. Luego podría ser más importante considerar el balance entre la producción de mediadores pro- y anti-inflamatorios y la regulación de sus niveles. Así, el TGF- $\beta$  es también fibrogénico y su excesiva producción local puede contribuir al daño renal. Por otro lado, el incremento de la producción de IL-10 en respuesta al estímulo alogénico sería, en la mayoría de los casos, un marcador importante para pronosticar la aceptación prolongada.

**Palabras clave:** citoquinas, inflamación, riñón, Th1, Th2, trasplante

**Abstract** *Regulatory cytokines in the response to the allogeneic renal transplant.* The outcome of the kidney allograft mainly depends on the immune response and on its complex regulation, where the cytokine network and other mediators play an important role. At present, kidney biopsy is the most useful tool for monitoring the transplant rejection and the diagnosis of the associated nephropathies, in spite of the invasiveness of the procedure. Thus, it is of great interest to find alternative tools for diagnosis. The evaluation of regulatory cytokines is a simple procedure of low cost that could be useful to increase the sensitivity of the detection of polymorphic differences, to predict the graft acceptance and for the early detection of rejection. Recent studies suggest that the high production of pro-inflammatory mediators, such as Th1 cytokines, could be detrimental, whereas the production of anti-inflammatory regulatory cytokines, such as interleukin (IL)-10 and tumor necrosis factor (TGF)- $\beta$ , could be beneficial for graft survival. In the early stages, the cellular cytotoxicity is activated by the Th1 response and the detection of cytotoxic molecules is associated to the acute rejection. Later, the balance between pro and anti-inflammatory mediators and the regulation of their levels could be more important. In this regard, TGF- $\beta$  is also fibrogenic and a high local production can contribute to kidney damage. On the other hand, the increased production of IL-10 in response to the allogeneic stimuli could be, in most cases, an important marker of long-term acceptance.

**Key word:** cytokines, inflammation, kidney, Th1, Th2, transplant

Actualmente, el trasplante renal es el mejor tratamiento disponible para muchos pacientes con fallas renales terminales. La supervivencia del injerto es de aproximadamente el 85% un año después del trasplante y los episodios de rechazo agudo, aunque ocurran en la mitad de los pacientes, ya no son la causa más frecuente para la pér-

didada del órgano<sup>1</sup>. En la mayoría de los casos el rechazo puede prevenirse seleccionando a donadores y receptores con las pruebas de histocompatibilidad y/o controlarse con la terapia inmunosupresora. Sin embargo, quedan muchos desafíos a afrontar. El principal problema es el deterioro crónico del trasplante más que el rechazo agudo, aunque los episodios tempranos, particularmente los graves y/o recurrentes, son el mayor factor de riesgo para la nefropatía crónica del aloinjerto (CAN), sugiriendo que el daño inicial pone en marcha una serie de procesos irreversibles, evidentes a largo plazo. En la mayoría de los casos la aceptación clínica del injerto depende total-

Recibido: 14-IV-2004

Aceptado: 25-VI-2004

**Dirección postal:** Dra. R.L. Cardoni, Instituto Dr. M. Fatała Chabén, ANLIS, Av. Paseo Colón 568, 1063 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4331-7142 e-mail: rlcardonit@yahoo.com

mente del uso de inmunosupresores inespecíficos. Esta inmunosupresión generalizada incrementa la susceptibilidad a las infecciones oportunistas y a ciertos tipos de proliferación maligna. Además, los inmunosupresores de mayor uso, como la ciclosporina A (CsA) y el tacrolimus (Tac), pueden causar toxicidad renal<sup>1</sup>.

En el post-operatorio inmediato se controla la función renal con una serie de estudios, como la creatinina sérica, el clearance de creatinina, la proteinuria, el sedimento urinario y la biopsia renal o el aspirado con aguja fina (FNAB). Estos estudios, principalmente la biopsia, permiten la detección precoz del rechazo, de la toxicidad del tratamiento u otras nefropatías asociadas al trasplante, para cuyo abordaje es fundamental la rapidez del diagnóstico. Luego, la biopsia es una herramienta valiosa que permite evaluar las alteraciones vasculares y glomerulares, la atrofia tubular, la fibrosis intersticial y los infiltrados de células mononucleares que caracterizan al CAN<sup>2</sup>. Sin embargo, la biopsia detecta el daño ya ocurrido que es precedido por cambios iniciales en la regulación de la respuesta aloinmune por la red de citoquinas y otros mediadores. Estos cambios tempranos, como la producción de citoquinas, han sido objeto de una gran cantidad de estudios en la última década. Si bien hasta el momento no se han encontrado respuestas sencillas, los hallazgos son promisorios, por lo que se realizó una revisión de los aportes de estos estudios para el diagnóstico y la comprensión de la fisiopatología del trasplante renal.

## Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas que intervienen en la comunicación intercelular. Tradicionalmente, se las considera de tipo Th1 o colaboradoras para la activación de macrófagos (mØs), o bien de tipo Th2 o colaboradoras para la generación de anticuerpos, que son producidas por células T CD4<sup>+</sup> Th1 o Th2. Por analogía, las células T CD8<sup>+</sup> se denominan Tc1 o Tc2 según produzcan citoquinas Th1 o Th2<sup>3</sup> (Fig. 1). Cada grupo de citoquinas, Th1 o Th2, estimula su propia producción e inhibe la generación de las citoquinas del otro grupo y este efecto cruzado puede polarizar la respuesta<sup>4</sup>. Además de las citoquinas producidas por los linfocitos T con receptor de antígeno (TCR)- $\alpha\beta$  y  $-\gamma\delta$ , otras células como las NK y NKT, las células presentadoras de antígeno (APC), incluyendo a las células B, dendríticas (DC) y monocitos/mØs, así como una gran variedad de otras células del organismo, son una fuente importante de citoquinas que influyen en el sesgo Th1/Th2 del conjunto del sistema inmune.

En la etapa de inducción de la respuesta, la presencia de IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$  llevan a un sesgo Th1 y, cuando esto no ocurre, la presencia de IL-4, IL-10 e IL-13

inducen un sesgo Th2. En los momentos iniciales, antes de la generación de células T efectoras, las citoquinas que inducen el sesgo Th1 o Th2 provienen principalmente de APC así como de células NK y NKT que tienen un importante papel regulador ya que intervienen en la producción de IL-4, IL-13 o de IFN- $\gamma$ .

Con estos elementos, el sesgo Th1 o Th2 de la respuesta inmune puede ser definido funcionalmente de acuerdo al perfil de las citoquinas producidas. Además, las citoquinas influyen en la expresión preferencial de distintos marcadores de superficie. La expresión de CD26 y LAG-3 (gen de activación linfocitaria), que aparecen con la proliferación y/o activación celular, así como de los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR3, acompañan a la respuesta Th1. Por otro lado, la influencia Th2 incrementa la expresión de CD62L y CD30 así como de los receptores de quimioquinas CCR3, CCR4, CCR8 y CXCR4<sup>5</sup> (Fig. 2). El CD62L o L-selectina se expresa en células *naïve* e interviene en la entrada a órganos linfáticos periféricos. Los receptores de quimioquinas son serpentina acoplada a proteína G. La expresión de estos receptores en los leucocitos tiene importancia para su tránsito entre los órganos linfáticos así como para su localización en los sitios de reconocimiento de los antígenos no propios, como los de los patógenos y eventualmente aloantígenos.

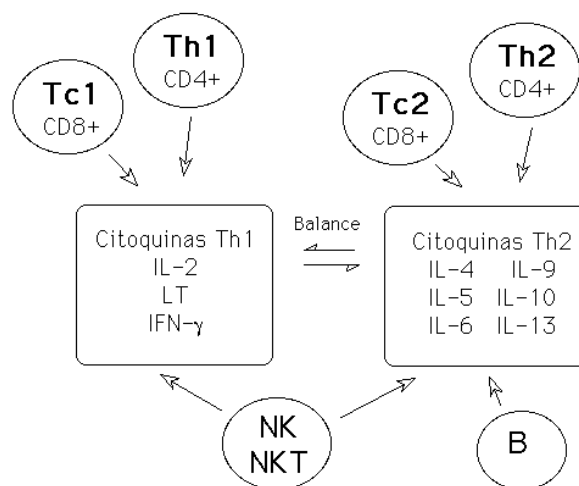


Fig.1.— Fuentes de liberación de citoquinas. Las células Th1 murinas secretan IL-2, linfotóxina (LT) e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), mientras que las Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13<sup>4</sup>. Se han generado clones de células T humanas con características similares, pero es difícil encontrar en ellos una dicotomía estricta que incluya a todas las citoquinas como en el ratón. Por ello, en humanos la dicotomía puede limitarse a la producción de IFN- $\gamma$  excluyendo a la de IL-4 (Th1) o de IL-4 excluyendo a la de IFN- $\gamma$  (Th2)<sup>4</sup>. Nk: *natural killer*.

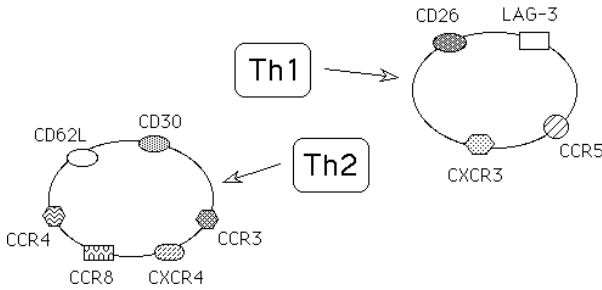


Fig. 2.- Expresión de marcadores de superficie estimulada por citoquinas Th1 y Th2. El CCR5 es el receptor de RANTES (Regulada por activación, expresada y secretada por células T normales), MIP-1 $\alpha$  y -1 $\beta$  (proteína inflamatoria de  $m\phi$ s), expresado en monocitos,  $m\phi$ s y células Th1. El CXCR3 es el receptor de IP-10 (Proteína inducida por IFN- $\gamma$ ), I-TAC (T  $\alpha$ -quimioattractante inducible por IFN- $\gamma$ ) y MIG (Monoquina inducida por IFN- $\gamma$ ), expresado en células Th1 activadas. El CCR3 es el receptor de eotaxina en eosinófilos. El CCR4 es el receptor de TARC (quimioquina del timo regulada por activación) y MDC (quimioquina derivada de  $m\phi$ s), expresado en células T, NK y DC. El CCR8 es el receptor de I-309 (del gen 3 de activación celular), expresado en células T y neutrófilos. El CXCR4 es el receptor de SDF-1 $\alpha/\beta$  (factor derivado del estroma), expresado en T-CD4 $^{+}$  activadas, DC y eosinófilos.

Las quimioquinas son una gran familia de péptidos quimiotácticos de 8-10 kDa que se unen a uno o más de sus receptores. Por su función pueden agruparse en inflamatorias, que se expresan en las áreas de inflamación tisular, u homeostáticas, que intervienen en el tránsito y balance de las poblaciones leucocitarias, como el SDF-1 $\alpha/\beta$ . Las principales quimioquinas inflamatorias son la IL-8, MIP-2, GRO- $\alpha$  (oncogén relacionado al crecimiento), MCP-1 (proteína quimiotáctica de  $m\phi$ s), que reclutan neutrófilos y  $m\phi$ s, y la MIG, IP-10 e I-TAC que atraen células T efectoras.

## Respuesta alógena

El sistema inmune detecta y reacciona ante diferencias con los componentes propios, limitando el implante de tejidos alógenos, y la red de citoquinas tiene gran importancia en la regulación de esta respuesta. Las diferencias son reconocidas en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El principal componente detectado en el tejido alógeno son las diferencias en las mismas moléculas del MHC que por su función son las proteínas de membrana más polimórficas del organismo. Las diferencias polimórficas en otras proteínas, denominadas antígenos menores de histocompatibilidad, también pueden iniciar el rechazo.

El polimorfismo en las proteínas del trasplante no compatible es reconocido directa o indirectamente por las

células T del receptor según que el reconocimiento ocurra en las APC del donante o del receptor<sup>6</sup>. El término indirecto no es el más afortunado, ya que el reconocimiento en las APC propias es el mecanismo normal para comenzar la respuesta inmune. Con ambos tipos de reconocimiento se pueden generar células que migran al trasplante y provocan el rechazo<sup>3</sup>. Un mecanismo importante de citotoxicidad es la unión directa de las células T efectoras al MHC clase I alógeno expresadas en el riñón trasplantado. El daño es producido principalmente por las células T CD8 $^{+}$  citotóxicas que pueden liberar a los tejidos perforinas y granzimas implicadas en el mecanismo citolítico<sup>7</sup>.

La vía indirecta de reconocimiento tiene mayor contribución que la directa en la inducción del rechazo. Después de por lo menos 8 años del trasplante, se compararon las respuestas al alorreconocimiento directo e indirecto en un grupo de pacientes con buena función renal y en otro con CAN. En ambos grupos disminuye la frecuencia de precursores T CD4 $^{+}$  así como la citotoxicidad linfocitaria (CTL) específica contra las células del donante, generada por el reconocimiento directo, en el cultivo mixto (MLC) unidireccional. El alorreconocimiento indirecto fue evaluado como la frecuencia de células T CD4 $^{+}$  del receptor que reconocen a los aloantígenos en sus propias APC preincubadas con membranas celulares del donante. En este ensayo, sólo los pacientes con CAN incrementan la reactividad contra el donante<sup>8</sup>.

## Producción de citoquinas en respuesta al riñón trasplantado

Los primeros infiltrados leucocitarios en el injerto son inducidos por el daño asociado a la cirugía y a la isquemia/reperfusión. En modelos experimentales, las células del endotelio y parénquima del injerto producen citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1, a los pocos minutos de la reperfusión. Estas citoquinas estimulan a las células endoteliales a liberar quimioquinas, como IL-8, GRO- $\alpha$ , MIP2 y MCP-1, que atraen a neutrófilos y  $m\phi$ s. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 también incrementan la expresión del MHC y de moléculas de adhesión en el endotelio vascular. Este proceso tiene mayor intensidad en órganos provenientes de cadáveres que de donantes vivos<sup>9</sup>. La reacción inflamatoria inicial, que depende de factores asociados a la cirugía, puede ser controlada o bien amplificarse en el caso que diferencias polimórficas fueran reconocidas por linfocitos T de estos infiltrados tempranos, en cuyo caso también se amplifica la producción de mediadores.

Tradicionalmente, se ha trabajado con la hipótesis de que las citoquinas Th1 tienen un papel en el rechazo a trasplantes, mientras que su aceptación requiere el predominio de citoquinas Th2. Sin embargo, la expansión de las poblaciones Th1 o Th2 no ocasionan inevitable-

mente el rechazo o la tolerancia<sup>10</sup>. En parte puede explicarse por la escasa delimitación de la dicotomía Th1/Th2 de las citoquinas humanas, aunque probablemente se deba a la falta de polarización de la respuesta que se observa tanto en humanos como en modelos experimentales. Ultimamente, las evidencias parecen indicar que el rechazo se acompaña de diversos componentes inflamatorios que incluyen a citoquinas pro-inflamatorias Th1. Así, la producción exagerada de citoquinas Th1 y mediadores pro-inflamatorios en respuesta al estímulo alógeno específico estaría generalmente asociada a una disminución de la sobrevida del injerto (Tabla 1). Por otro lado, la aceptación o el control del rechazo está relacionada con el incremento de expresión de mediadores anti-inflamatorios. En términos generales, esto es válido para el rechazo agudo y el crónico, aunque en ambos casos los procesos inflamatorios asociados parecen diferir en la cinética e intensidad así como en la composición celular.

En los episodios de rechazo agudo se ataca al injerto por varios mecanismos, incluyendo la citotoxicidad celular directa y el daño mediado por complemento<sup>2</sup>. Durante el rechazo predominan las citoquinas Th1 proinflamatorias<sup>11</sup>. La relación IFN- $\gamma$ /IL-5, en PBMC estimulados con mitógenos, incrementa con el rechazo y en menor medida también en otras disfunciones renales como las causadas por infecciones, toxicidad por drogas u obstrucciones<sup>12</sup>. El IFN- $\gamma$  parece tener un efecto dual; en el

trasplante experimental de riñón incrementa la expresión del MHC, facilitando la detección del polimorfismo, pero por otro lado disminuye la trombosis y necrosis inicial<sup>22</sup>. La síntesis de IFN- $\gamma$  requiere IL-2 o factores con actividad semejante, como la IL-15, que también activa a las células T-CD8<sup>+</sup>, NK y NKT. En el rechazo agudo puede incrementar la IL-15 sin modificaciones de IL-2<sup>13</sup>. Las células del epitelio tubular podrían jugar un importante papel en el daño renal ya que sintetizan IL-15 y esta producción es activada por IFN- $\gamma$ <sup>13</sup>.

Las células NK y NKT pueden intervenir en el rechazo, ya que son productoras de IFN- $\gamma$  o de IL-4. Sin embargo, también pueden colaborar con la inducción de tolerancia. Las células NK, CD56<sup>+</sup>, pueden ejercer una actividad citotóxica indiscriminada que es bloqueada por la presencia de componentes propios. Por su parte, las células NKT clásicas expresan el TCR- $\alpha\beta$  y CD56. A diferencia de los linfocitos tradicionales, su TCR reconoce antígenos glicolipídicos presentados por CD1, una molécula con estructura y función similar a las del MHC Clase I que no está codificada en el MHC<sup>23</sup>. El TCR de la mayoría de las NKT coexpresan la combinación V $\alpha$ -J $\alpha$  no variable, con V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 en el ratón y sus cadenas homólogas V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q en los humanos. En ratones deficientes en V $\alpha$ 14<sup>24</sup> o en CD1<sup>25</sup> se determinó que las células NKT inducen tolerancia a los órganos trasplantados.

Algunas citoquinas Th2, como la IL-6, pueden ser mediadoras de reacciones inflamatorias. La IL-6 secreta por las células mesangiales, interviene en el proceso inflamatorio glomerular e intersticial en el riñón trasplantado. En los procesos inflamatorios agudos la IL-6 puede disminuir la acumulación de neutrófilos favoreciendo la de monocitos. Cuando este proceso es inducido en focos infecciosos, el cambio resuelve el proceso inflamatorio e induce la respuesta inmune específica<sup>26</sup>. En el caso del trasplante el proceso continuaría, ya que no se elimina al inductor. En los procesos inflamatorios renales, aun en los causados por infecciones génito-urinarias, incrementa la excreción urinaria de IL-6<sup>27</sup>. Por ello, la detección de IL-6 en la orina de los trasplantados es un indicador inespecífico pero precoz de alteraciones renales<sup>15</sup>. La IL-4 también parece tener un papel en el daño al injerto renal, ya que los pacientes tratados con anticuerpos anti-IL-4 mejoran el cuadro clínico del rechazo tardío<sup>28</sup>.

Algunas infecciones estimulan la producción de mediadores inflamatorios con alteración de la función renal. La infección con citomegalovirus (CMV) es una de las principales complicaciones del trasplante, ya que la inmunodepresión facilita tanto la infección primaria como la reactivación de la infección latente, y en ambos casos se detectan antígenos de CMV plasmáticos. En los trasplantados con antigenemia incrementa IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, la molécula de adhesión vascular soluble (sVCAM)-1, la molécula de adhesión intercelular soluble (sICAM)-1 y s-L-selectina. Los niveles de estos media-

TABLA 1.— *Evaluación de mediadores en pacientes trasplantados y su relación con el rechazo agudo y crónico así como con la disfunción renal*

Incremento de:	Evaluado en:	Relacionado con:
IFN- $\gamma$	FNAB renal	Rechazo <sup>11</sup>
IFN- $\gamma$ /IL-5	PBMC	Rechazo agudo y disfunción renal <sup>12</sup>
IL-2/IL-15	Células epiteliales renales	Rechazo agudo <sup>13</sup>
Perforina/Granzima	Orina	Rechazo agudo <sup>7, 14</sup>
IL-6	Biopsia/orina	Disfunción renal <sup>15</sup>
sIL-6R	Orina	Disfunción renal <sup>16</sup>
sICAM-1	Suero/orina	Rechazo agudo <sup>17</sup>
sCD30	Suero	Disfunción renal <sup>18</sup>
TGF- $\beta$	Biopsia/orina	Presencia <sup>19</sup> o ausencia <sup>20</sup> de CAN
TGF- $\beta$	PBMC	Tolerancia <sup>21</sup>
IL-10	PBMC	Regulación de la respuesta anti-aloinjerto <sup>21</sup>

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica; CAN: Nefropatía crónica del aloinjerto; FNAB: Aspirado con aguja fina

dores inflamatorios correlacionan con la antigenemia y disminuyen con el tratamiento con ganciclovir. Con la antigenemia también incrementa el TNF- $\alpha$  y la IL-10, aunque en los enfermos la relación TNF- $\alpha$ /IL-10 es mayor que en los asintomáticos. Como resultado, en la infección con CMV hay infiltrados leucocitarios en varios órganos incluyendo el riñón<sup>29</sup>. Por otro lado, en la activación de células T periféricas<sup>29</sup> inducida por CMV se produce un tipo efector de fenotipo CD3<sup>+</sup>LFA-1<sup>brillante</sup> con alta capacidad inflamatoria pero bajo potencial citotóxico. Esta actividad inmune persistente es incapaz de eliminar al virus pero puede producir disfunción en el trasplante<sup>30</sup>.

Los mediadores inflamatorios contribuyen a incrementar la expresión de ICAM-1 en la pared endotelial, con la consiguiente acumulación leucocitaria. En el rechazo agudo hay además un aumento de sICAM-1 en suero y orina<sup>17</sup>.

La citoquinas Th2 también incrementan la expresión de algunos marcadores de superficie como el CD30 (o Ki-1), un miembro de la familia de receptores de TNF. La estimulación de CD30, que a su vez incrementa la expresión de ICAM-1, puede iniciar la localización de infiltrados inflamatorios<sup>31</sup>. Normalmente, el CD30 se expresa preferentemente en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activadas, secretoras de citoquinas Th2. El ligando de CD30 es el CD153, una glicoproteína de la familia del TNF expresado en células T activadas, B y monocitos. El CD30 es clivado enzimáticamente de la superficie celular con liberación a la circulación de una forma truncada soluble (sCD30). La interacción CD30-CD153 desencadena señales que llevan a la muerte celular y esta interacción es bloqueada por el sCD30. Los niveles séricos elevados de sCD30 anteriores al trasplante están relacionados con disminución de la supervivencia del riñón injertado<sup>18</sup>. Sin embargo, parte de este aumento puede ser inducido por la hemodiálisis, que por otro lado disminuye sCD26<sup>32</sup>. El sCD30 sérico incrementa, además, en las infecciones con el virus de la hepatitis B<sup>33</sup>.

En el rechazo al trasplante, los m $\phi$ s y DC intervienen en la etapa de presentación de aloantígenos así como en la fase efectora del rechazo. En la fase efectora, los monocitos/m $\phi$ s activados por citoquinas Th1 liberan TNF- $\alpha$  e incrementan la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible por IFN- $\gamma$  (iNOS), produciendo principalmente óxido nítrico, mientras que en un entorno de mediadores anti-inflamatorios los m $\phi$ s generan predominantemente arginasa e IL-10<sup>34</sup>.

Las citoquinas son liberadas por varios tipos celulares, además de las células del sistema inmune. Por ejemplo, las células mesangiales pueden producir IL-12 en el riñón y colaborar con el sesgo Th1<sup>35</sup>.

El daño a células endoteliales ocasionado por la reacción inflamatoria inducida por otros estímulos además del alogénico, como la infección con CMV, puede pro-

mover la síntesis de anticuerpos anti-endotelio en el trasplante renal<sup>36</sup>.

Las drogas inmunosupresoras utilizadas para impedir el rechazo afectan al sistema inmune y otros sistemas alterando la generación de citoquinas. En las semanas inmediatas luego del trasplante se administran dosis altas de glucocorticoides que bloquean la reacción inflamatoria y la inducción de citoquinas Th1<sup>37</sup>. La CsA inhibe la respuesta alogénica ya que bloquea la síntesis de IL-2 y la expresión de su receptor. Por otro lado, incrementa la producción de TGF- $\beta$  y la expresión de su receptor<sup>38</sup> potenciando la supresión que ejerce el tratamiento.

La administración prolongada de inhibidores de la calcineurina, especialmente la CsA, puede causar daño renal. Los efectos nocivos pueden mitigarse o evitarse al disminuir o suspender la administración de CsA y reemplazarla por otros inmunodepresores, como Tac (o FK506), mofetil micofenolato (MMF) o rapamicina. El Tac suprime preferentemente la producción de citoquinas Th1<sup>39</sup> e inhibe las funciones del receptor de TGF- $\beta$ <sup>40</sup>. En el rechazo crónico del trasplante renal el reemplazo total o parcial de CsA por otros fármacos mejora considerablemente la función renal. Luego de 3 meses de reemplazar a la CsA por Tac, se observó que el Tac es altamente efectivo para bloquear la expresión de ligandos coestimuladores y moléculas de adhesión de la respuesta Th1, como CD40L, CD28 e ICAM-1, así como la actividad de T CD4<sup>+</sup> colaboradora para la formación de anticuerpos<sup>41</sup>. Al evaluar la producción de citoquinas reguladoras en respuesta al estímulo alogénico se encontró que los pacientes con rechazo crónico del trasplante renal tratados con CsA o Tac fueron capaces de incrementar la producción de IL-10, mientras que los niveles de TGF- $\beta$  no se alteran con ambas terapias<sup>42</sup>.

El curso de la respuesta inmune puede ser también influenciado por la historia individual de la inmunidad adquirida. Algunas infecciones virales inducen células de memoria específicas para el patógeno capaces de reconocer moléculas del MHC alogénico. En modelos experimentales, esta población T de memoria inhibe la inducción de tolerancia. Por ello, los ratones expuestos previamente a ciertas infecciones virales son refractarios a la inducción de tolerancia y rechazan el aloinjerto<sup>43</sup>.

Factores no-inmunológicos pueden además contribuir al daño del tejido trasplantado al disparar procesos inflamatorios locales o sistémicos que amplifican a los elementos específicos del alorreconocimiento<sup>44</sup>.

## Expresión de quimioquinas y sus receptores

La localización de los infiltrados leucocitarios en el rechazo depende de varios agentes quimiotácticos, como componentes del complemento, leucotrienes, factor

TABLA 2.— *Quimioquinas y sus receptores en el trasplante renal*

- 
- Incremento de la expresión de ligandos de CCR5 en el rechazo agudo y crónico<sup>45</sup>.
  - El incremento de CCR5 y sus ligandos, así como de IP-10 (ligando de CXCR3), en ausencia de CCR3 y CCR8, indican rechazo renal por una respuesta tipo Th1<sup>46</sup>.
  - Disminución del rechazo en receptores de riñón con CCR $\Delta$ 32<sup>45</sup>.
  - El bloqueo de los receptores de RANTES disminuye el infiltrado de células mononucleares y su activación en el trasplante experimental de riñón<sup>47</sup>.
- 

activador de plaquetas, pero principalmente de algunas citoquinas quimiotácticas para leucocitos o quimioquinas. Recientemente se ha demostrado la patogenicidad de las quimioquinas en diferentes nefropatías así como en el rechazo agudo y crónico del trasplante renal. La liberación de quimioquinas sería responsable de los infiltrados inflamatorios Th1 en el riñón. La Tabla 2 resume algunos estudios de quimioquinas y sus receptores. La producción de quimioquinas podría ser estimulada por el TNF- $\alpha$  que es clave en el proceso inflamatorio que lleva al rechazo agudo. El TNF- $\alpha$  estimula la producción de MCP-4, así como la fractalquina (ligando de CX3CR1) en el epitelio tubular del riñón y podría provocar la localización de monocitos/m $\phi$ s<sup>48</sup>.

El CCR5 es el receptor de RANTES; MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  que se expresa en monocitos/m $\phi$ s y de células Th1. La expresión de ligandos de CCR5 incrementa tanto en el rechazo agudo como en el crónico<sup>45</sup>. Algunas personas tienen una variable inactiva por delección de 32 pares de bases del gen que codifica al CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32). Esta característica genética poco frecuente fue originalmente explorada en la infección con el virus de la inmunodeficiencia (HIV), donde la expresión de CCR5 $\Delta$ 32 impide la penetración viral e incrementa la resistencia a la infección. Luego se encontró que el rechazo es muy raro en los trasplantados renales con CCR5 $\Delta$ 32<sup>45</sup>. Actualmente se están desarrollando inhibidores de CCR5 para bloquear la infección con HIV<sup>49</sup> que también podrían ser de utilidad para facilitar la aceptación del trasplante alogénico.

### Mediadores anti-inflamatorios

En la inducción de toda respuesta inmune, incluyendo la alogénica, también se inducen mecanismos de control. Estos son de gran importancia ya que los mecanismos citotóxicos contra los componentes ajenos son capaces

de dañar a los tejidos propios. Así, el trasplante también puede generar células T tolerogénicas específicas que evitan el rechazo<sup>50</sup> y células Th2, productoras de IL-4 e IL-10, reguladoras de la respuesta aloinmune Th1<sup>51</sup>. En receptores estables de riñón no se inducen células T citotóxicas contra el donante, aunque se detecten células T citotóxicas contra células con otro HLA no relacionado<sup>52</sup>. Esta falta de respuesta específica en el ensayo de CTL contrasta con el incremento de la linfoproliferación con las células del donante observado en el MLC<sup>52</sup>. Además, en pacientes que abandonan la terapia inmunodepresora y permanecen estables se observa inhibición de la respuesta alorreactiva específica *in vitro* que depende de la presencia de TGF- $\beta$  y de IL-10<sup>21</sup>.

La IL-10 y el TGF- $\beta$  son los principales componentes anti-inflamatorios en la respuesta alogénica cuya producción estaría relacionada con la mayor sobrevida del riñón. Ambos disminuyen la respuesta Th1 y la liberación de mediadores inflamatorios. Los ratones que carecen del gen para IL-10 o para TGF- $\beta$  desarrollan espontáneamente un cuadro inflamatorio grave<sup>53</sup>.

La IL-10 fue descrita originalmente como un factor inhibitorio de la producción de citoquinas Th1. Es además un factor de gran importancia para la sobrevida y diferenciación de células B. Es producida principalmente por monocitos activados y células T, también por otros tipos celulares, como células B CD5<sup>+</sup> y queratinocitos. El tratamiento con IL-10 recombinante humana induce supresión generalizada, la disminución de los infiltrados de células T y m $\phi$ s, inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B así como disminución de la liberación de IL-12 y TNF- $\alpha$  en monocitos<sup>54</sup>. También inhibe la activación y adhesión leucocitaria así como la inducción de iNOS<sup>55</sup>.

En humanos, tanto la producción endógena como la administración de IL-10<sup>56</sup>, tiene un efecto predominantemente anti-inflamatorio, aunque en algunos casos puede ser pro-inflamatorio<sup>54</sup>. La administración de IL-10 puede incrementar la liberación de IFN- $\gamma$ , IP-10 y otras monoquinas estimuladas por el IFN- $\gamma$ , así como la actividad de CTL y NK y, por consiguiente, de los niveles de granzima B<sup>57</sup>. Esto podría explicar el incremento de IL-10 en algunos casos de rechazo agudo<sup>58</sup>.

El TGF- $\beta$  regula tanto la respuesta inmune como diversos procesos biológicos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular así como el depósito de matrix extracelular. Además de ser modulada por el sistema inmune, la producción de TGF- $\beta$  es estimulada por el sistema renina-angiotensina, por estímulos  $\beta$ -adrenérgicos y por la vitamina D3<sup>59</sup>. La angiotensina II induce la producción y secreción de TGF- $\beta$  en células mesangiales. Por ello, en el CAN, los antagonistas del receptor de angiotensina II, como el losartan, disminuyen el TGF- $\beta$  sin afectar la respuesta alogénica<sup>60</sup>.

El TGF- $\beta$  tendría un papel dual en la nefropatía crónica, ya que actúa como un inmunodepresor, pero tam-

bién puede causar daño renal. Su incremento, que puede detectarse en las biopsias, podría ser el resultado de la producción local de TGF- $\beta$  por varios tipos celulares, además del sintetizado por los leucocitos, como células T y monocitos, localizados en el riñón<sup>64</sup>. El TGF- $\beta$  puede ser producido por las células del músculo liso de la pared vascular, mesangiales, endoteliales, condrocitos, células endoteliales, fibroblastos intersticiales y tubulares, etc. Esto explicaría su incremento urinario sin variación de los niveles séricos observados en el CAN<sup>19</sup>. Sin embargo, no en todos los estudios se encontró que el incremento de TGF- $\beta$  en la biopsia fuera de mal pronóstico. En un análisis retrospectivo de biopsias tomadas durante el rechazo agudo en pacientes que progresaron o no hacia el CAN se observaron mayores niveles de TGF- $\beta$  en los que posteriormente no presentaron nefropatía<sup>20</sup>.

A fin de establecer la relación entre el daño renal y la producción de TGF- $\beta$  es de gran importancia la elección del material a evaluar. Su detección en biopsias y en orina estaría directamente relacionada con el daño renal, pero los niveles circulantes de TGF- $\beta$  varían con la activación plaquetaria<sup>65</sup>. Por otro lado, la liberación leucocitaria de TGF- $\beta$  en respuesta al estímulo alógeno estaría relacionada con la tolerancia y la regulación de la respuesta al trasplante<sup>21</sup>.

Tanto el TGF- $\beta$  como la IL-10 jugarían un papel en el control de la respuesta alógena Th1. En algunos modelos murinos, la aceptación espontánea del riñón alógeno depende del TGF- $\beta$  y no de la IL-10<sup>66</sup>. En otros casos, la administración de IL-10 disminuye el daño renal<sup>65</sup>. En humanos, la regulación de la respuesta anti-aloinjerto depende de la liberación de IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>21</sup>.

La mayor parte de lo descrito para citoquinas en el trasplante renal es válido para los trasplantes de otros órganos sólidos, como el hígado<sup>67, 68</sup>.

## Perspectivas

La capacidad para producir citoquinas varía entre individuos. Esta variabilidad depende del polimorfismo en la región reguladora de los genes que codifican a las citoquinas y puede estar asociada a la evolución del trasplante. Varios estudios corroboran la ventaja de la predisposición genética para producir altos niveles de IL-4 e IL-10<sup>69</sup> y la baja generación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ <sup>70, 71</sup> para la aceptación del trasplante. La capacidad de producir niveles altos de determinado grupo de citoquinas alertaría sobre la posibilidad de incrementar o disminuir las dosis de supresores. Considerando los efectos adversos del tratamiento supresor, la determinación de la capacidad de producir citoquinas podría emplearse para diseñar tratamientos adaptados a las necesidades individuales.

TABLA 3.- Métodos de estudio de las citoquinas empleados en el trasplante renal

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localización tisular de las proteínas por inmunohistoquímica</li> <li>• Determinación del mRNA de las citoquinas o del polimorfismo en el ADN de los genes que las codifican por varias técnicas de PCR</li> <li>• Recuento de células productoras de citoquinas por Citometría de flujo o ELISPOT</li> <li>• Medida de las proteínas por diferentes técnicas de ELISA</li> </ul>
Material biológico:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsias o FNAB</li> <li>• Sobrenadante del cultivo del FNAB</li> <li>• Plasma, suero</li> <li>• Orina</li> <li>• Sobrenadante del cultivo mixto donante-receptor</li> <li>• Sobrenadante de PBMC estimuladas por mitógenos inespecíficos o por antígenos alógenos, ya sea del donante o de un panel de controles</li> </ul>

*La inmunohistoquímica puede hacerse semi-cuantitativa con microscopía confocal. El estudio de las citoquinas en el sobrenadante de cultivos de FNAB puede ser considerado una variable del MLC (cultivo mixto).*

*PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.*

Las citoquinas u otros mediadores pueden ser detectados en diferentes fuentes por una gran variedad de métodos (Tabla 3) y tanto la fuente de las citoquinas como el ensayo para medirlas tienen gran importancia para la interpretación de los resultados. La determinación de citoquinas puede llegar a superar la sensibilidad del MLC para detectar diferencias polimórficas alógenas. Por ejemplo, se encontró que la evaluación de células productoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT puede detectar diferencias en antígenos menores entre donante y receptor, no halladas por el MLC ni por la determinación de la frecuencia de precursores de T colaboradoras o de CLT<sup>72</sup>.

En muchos casos el rechazo se detecta por el infiltrado de leucocitos mononucleares en las biopsias. Sin embargo, cuando los infiltrados son pequeños es difícil tomar una decisión ya que también se pueden presentar sin rechazo. En estos casos, la detección simultánea de perforina, granzima B y ligando de FAS indica rechazo agudo, inclusive en casos con muy poco infiltrado<sup>7</sup>. Además, en la mayoría de los casos la detección urinaria del mRNA de perforina y granzima permite realizar el diagnóstico de rechazo agudo<sup>14</sup>.

La determinación de la producción de citoquinas abre nuevos horizontes en los estudios de la fisiopatología renal y, de mayor utilidad a mediano plazo, para agilizar el diagnóstico no invasivo de la función renal.

## Bibliografía

1. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tokoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-90.
2. Jain S, Furness PN, Nicholson ML. The role of transforming growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. Overview. *Transplantation* 2000; 69: 1759-66.
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> ed. New York: Garland Publishing, 2001.
4. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996; 17: 138-46.
5. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, et al. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells *in vitro* and *in vivo*. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 691-9.
6. Gould DS, Auchincloss Jr H. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999; 20: 77-82.
7. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 695-700.
8. Baker RJ, Hernández Fuentes MP, Brookes PA, et al. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001; 167: 7199-206.
9. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Accelerated rejection of renal allograft from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000; 232: 263-71.
10. Dallman MJ. Cytokines and transplantation. Th1/Th2 regulation of the immune response to solid organ transplants in the adult. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 632-8.
11. Zuo XJ, Jordan SC, Wilkinson A, et al. Interleukin-12 mRNA levels in renal allograft fine-needle aspirates do not correlate with acute transplant rejection. *Transplantation* 1995; 60: 1360-2.
12. Tary Lehmann M, Hricik DE, Justice AC, Potter NS, Heeger PS. Enzyme-linked immunosorbent assay spot detection of interferon-gamma and interleukin 5-producing cells as a predictive marker for renal allograft failure. *Transplantation* 1998; 66: 219-24.
13. Weiler M, Rogashew B, Einbinder T, et al. Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1194-201.
14. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344: 947-54.
15. Waiser J, Budde K, Katalinic A, et al. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 753-9.
16. Sadeghi M, Daniel V, Wiesel M, Hergesell O, Opelz G. High urine sIL-6R as a predictor of late graft failure in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76: 1190-4.
17. Teppo AM, von Willebrand E, Honkanen E, Ahonen J, Gronhagen-Riska C. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation: the origin and role of urinary sICAM-1? *Transplantation* 2001; 71: 1113-9.
18. Pelzl S, Opelz G, Wiesel M, et al. Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation* 2002; 73: 3-6.
19. Boratynska M. Urine excretion of transforming growth factor-beta1 in chronic allograft nephropathy. *Ann Transplant* 1999; 4: 23-8.
20. Eikmans M, Sijpkens YW, Baelde HJ, et al. High transforming growth factor-beta and extracellular matrix mRNA response in renal allografts during early acute rejection is associated with absence of chronic rejection. *Transplantation* 2002; 73: 573-9.
21. Van Buskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska Gan E, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; 106: 145-55.
22. Halloran PF, Miller LW, Urmson J, et al. IFN-gamma alters the pathology of grafts rejection: protection from early necrosis. *J Immunol* 2001; 166: 7072-81.
23. Bendelac A, Rivera MN, Park S, Roark JH. Mouse CD1-specific NK 1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535-62.
24. Seino KI, Fukao K, Muramoto K, et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2577-81.
25. Higuchi M, Zeng D, Shizuru J, et al. Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NKT cells and clonal deletion. *J Immunol* 2002; 169: 5564-70.
26. Kaplanski G, Marin V, Montero JF, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003; 24: 25-9.
27. Kaden J, Priesterjahn R. Increasing urinary IL-6 levels announce kidney graft rejection. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1: S34-41.
28. Ode Hakim S, Docke WD, Kern F, et al. Delayed-type hypersensitivity-like mechanisms dominate late acute rejection episodes in renal allograft recipients. *Transplantation* 1996; 61: 1233-40.
29. Nordoy I, Muller F, Nordal KP, et al. Chemokines and soluble adhesion molecules in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 333-7.
30. Kern F, Ode hakim S, Nugel H, et al. Peripheral T cell activation in long-term renal transplant patients: concordant upregulation of adhesion molecules and cytokine gene transcription. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2476-82.
31. Nam SY, Cho KS, Heo YM, et al. Regulation of lymphocyte clustering by CD30-mediated ICAM-1 up-regulation. *Cell Immunol* 2002; 219: 38-47.
32. Nakao K, Nagake Y, Okamoto A, et al. Serum levels of soluble CD26 and CD30 in patients on hemodialysis. *Nephron* 2002; 91: 215-21.
33. De Lazzari F, Ravagnan P, Tenderini M, et al. Circulating soluble-CD30 (sCD30) in patients with HCV-related chronic hepatitis and in patients with alcoholic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 231-4.
34. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-55.
35. Timoshanko JR, Kitching AR, Holdsworth SR, Tipping PG. Interleukin-12 from intrinsic cells is an effector of renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 464-71.
36. Toyoda M, Galfayan K, Galera OA, et al. Cytomegalovirus infection induces anti-endothelial cell antibodies in cardiac and renal allograft recipients. *Transpl Immunol* 1997; 5: 104-11.
37. Fricke L, Kluter H, Feddersen A, et al. Preoperative application of glucocorticosteroids efficaciously reduces the primary immunological response in kidney transplantation. *Clin Transplant* 1996; 10: 432-6.
38. Ahuja SS, Shrivastav S, Danielpour D, Balow JE, Boumpas DT. Regulation of transforming growth factor-



- $\beta$ 1 and its receptor by cyclosporine in human T lymphocytes. *Transplantation* 1995; 60: 718-23.
39. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 584-91.
  40. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 1997; 54: 925-75.
  41. Weimer R, Melk A, Daniel V, et al. Switch from cyclosporine A to tacrolimus in renal transplant recipients: impact on Th1, Th2, and monokine responses. *Hum Immunol* 2000; 61: 884-97.
  42. Ferraris JR, Tambutti ML, Cardoni RL, Prigoshin N. Conversion from cyclosporine to tacrolimus in pediatric renal transplant recipients with chronic rejection: Changes in the immune response. *Transplantation* 2004; 77: 532-7.
  43. Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2003; 111: 1887-95.
  44. Halloran PF, Homik J, Goes N, et al. The "injury response": a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 1997; 29: 79-81.
  45. Fischereeder M, Luckow B, Hocher B, et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; 357: 1758-61.
  46. Segerer S, Cui Y, Eitner F, et al. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 518-31.
  47. Song E, Zou H, Yao Y, et al. Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2002; 61: 676-85.
  48. Chakravorty SJ, Howie AJ, Girdlestone J, Gentle D, Savage CO. Potential role of monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *J Pathol* 2001; 194: 239-46.
  49. Kazmierski w, Bifulco N, Yang H, et al. Recent progress in discovery of small-molecule CCR5 chemokine receptor ligands as HIV-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 2663-76.
  50. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-53.
  51. Kist van Holthe JE, Gasser M, Womer K, et al. Regulatory functions of alloreactive Th2 clones in human renal transplant recipients. *Kidney Int* 2002; 62: 627-31.
  52. Nakagawa K, Matsuno T, Iwagaki H, Fujiwara T, Tanaka N. Analysis of the immune status in the recipients with long-term well-functioning kidneys allografts. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 31-9.
  53. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-8.
  54. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trend Immunol* 2003; 24: 36-43.
  55. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60: 2118-28.
  56. Wissing KM, Morelon E, Legendre C, et al. A pilot trial of recombinant human interleukin-10 in kidney transplant recipients receiving OKT3 induction therapy. *Transplantation* 1997; 64: 999-1006.
  57. Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol* 2000; 165: 2783-9.
  58. Merville P, Lambert C, Durand I, et al. High frequency of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> graft-infiltrating T lymphocytes in promptly rejected kidney allografts. *Transplantation* 1995; 59: 1113-9.
  59. Aschenbrenner JK, Sollinger HW, Becker BN, Hullet DA. 1,25-(OH(2))D(3) alters the transforming growth factor beta signaling pathway in renal tissue. *J Surg Res* 2001; 100: 171-5.
  60. Inigo P, Campistol JM, Lario S, et al. Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF-beta(1) plasma levels in a crossover trial in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 822-7.
  61. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent Immunosuppression by CD4(+)/Cd25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629-44.
  62. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. *J Immunol* 2001; 166: 3789-96.
  63. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation *ex vivo* of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> precursors. *J Immunol* 2002; 169: 4183-9.
  64. Pascual M, Swinford RD, Ingelfinger JR, et al. Chronic rejection and chronic cyclosporin toxicity in renal allografts. *Immunol Today* 1998; 19: 514-9.
  65. Coupes BM, Williams S, Roberts IS, Short CD, Brenchley PE. Plasma transforming growth factor beta (1) and platelet activation: implications for studies in transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 361-7.
  66. Bickerstaff AA, Wang JJ, Pelletier RP, Orosz CG. Murine renal allografts: spontaneous acceptance is associated with regulated T cell-mediated immunity. *J Immunol* 2001; 167: 4821-7.
  67. Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999; 20: 27-32.
  68. Ferraris JR, Duca P, Prigoshin N, et al. Mycophenolate mofetil and reduced doses of cyclosporine in pediatric liver transplantation with chronic renal dysfunction: Changes in the immune response. *Pediatric Transp.* 2004; 8: 16-21.
  69. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patients and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol* 2001; 8: 259-65.
  70. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 674-7.
  71. Hahn AB, Kasten Jolly JC, Constantino DM, et al. TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: Effects on renal allograft outcome. *Transplantation* 2001; 72: 660-5.
  72. van Besouw NM, Vaessen LM, Zuijderwijk JM, et al. The frequency of interferon-gamma producing cells reflects alloreactivity against minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 2003; 75: 1400-4.