

## INMUNOSUPRESIÓN EN DONANTES RENALES EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

FEDERICO CICORA<sup>1, 2, 3</sup>, JAVIER ROBERTI<sup>4</sup>, NATALIA LAUSADA<sup>1</sup>, PEDRO GONZÁLEZ<sup>6</sup>,  
DIEGO GUERRIERI<sup>3, 5</sup>, PABLO STRINGA<sup>1</sup>, CLEMENTE RAIMONDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio/Programa de Trasplante de Órganos y Tejidos, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, <sup>2</sup>Unidad de Trasplante Renal, Hospital Alemán, Buenos Aires, <sup>3</sup>Fundación para la Investigación y Asistencia de la Enfermedad Renal (FINAER), La Plata, <sup>4</sup>Universidad de Belgrano, Buenos Aires, <sup>5</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, <sup>6</sup>Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Buenos Aires

**Resumen** La lesión por isquemia y reperfusión (IRI) es uno de los principales problemas en el trasplante.

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del pre - acondicionamiento al donante con rapamicina y tacrolimus para prevenir la lesión por IRI. Las ratas Wistar donantes, 12 horas antes de la nefrectomía, recibieron fármacos inmunosupresores. La muestra se dividió en cuatro grupos experimentales: un grupo con intervención simulada (*sham*), un grupo control sin tratamiento, otro tratado con rapamicina (2 mg/kg) y el restante tratado con tacrolimus (0.3 mg/kg). Se retiró el riñón izquierdo y después de tres horas de isquemia fría, se lo trasplantó. Veinticuatro horas después, el órgano trasplantado se recuperó para el análisis histológico y la evaluación de la expresión de citoquinas. El tratamiento de pre-acondicionamiento con rapamicina o con tacrolimus redujo significativamente el nitrógeno ureico en sangre y los niveles de creatinina en comparación con el control (BUN:  $p < 0.001$ ; creatinina:  $p < 0.001$ ). La necrosis tubular aguda fue significativamente menor en las ratas donantes tratadas con inmunosupresores en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$ ). Finalmente, las citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 y rIL-21, mostraron niveles más bajos en el injerto de los animales que recibieron tratamiento. Este estudio experimental exploratorio muestra que el pre-acondicionamiento en donantes con rapamicina y tacrolimus en dos grupos distintos mejora los resultados clínicos y anatomopatológicos en receptores, con una reducción *in situ* de citoquinas pro-inflamatorias relacionadas con la diferenciación Th17, y de este modo crea un ambiente favorable para la diferenciación de células T regulatorias (Tregs).

**Palabras clave:** pre-acondicionamiento, rapamicina, tacrolimus, Th17, Tregs

**Abstract** *Immunosuppression in kidney donors with rapamycin and tacrolimus. Proinflammatory cytokine expression.* The ischemia-reperfusion injury (IRI) remains a major problem in transplantation. The

objective of this study was to evaluate the effects of preconditioning a donor group with rapamycin and another donor group with tacrolimus to prevent IRI. Twelve hours before nephrectomy, donor Wistar rats received immunosuppressive drugs. The sample was divided into four experimental groups: a *sham* group, an untreated control group, a group treated with rapamycin (2 mg/kg) and a group treated with tacrolimus (0.3 mg/kg). Left kidneys were removed and, after three hours of cold ischemia, grafts were transplanted. Twenty-four hours later, the transplanted organs were recovered for histological analysis and evaluation of cytokine expression. The pre-conditioning treatment with rapamycin or tacrolimus significantly reduced donor blood urea nitrogen and creatinine levels compared with control group (BUN:  $p < 0.001$  vs. control and creatinine:  $p < 0.001$  vs. control). Acute tubular necrosis was significantly lower in donors treated with immunosuppressant drugs compared with the control group ( $p < 0.001$ ). Finally, inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and rIL-21 showed lower levels in the graft of pre-treated animals. This exploratory experimental study shows that preconditioning donors with rapamycin and tacrolimus in different groups improves clinical outcome and pathology in recipients and reduces *in situ* pro-inflammatory cytokines associated with Th17 differentiation, creating a favorable environment for the differentiation of regulatory T cells (Tregs).

**Key words:** preconditioning, rapamycin, tacrolimus, Th17, Treg

La injuria por isquemia y reperfusión (IRI) durante el trasplante renal representa la principal causa de dis-

función temprana del injerto que predispone al rechazo agudo y disminuye la supervivencia del injerto a largo plazo<sup>1</sup>. La IRI es un proceso inflamatorio multifactorial, antígeno independiente, con consecuencias mediatas e inmediatas para el injerto<sup>2</sup>. Durante la IRI tienen lugar varios fenómenos relacionados con la extravasación de leucocitos al tejido inflamado. Intervienen allí múltiples moléculas de adhesión, citoquinas, quemoquinas y re-

Recibido: 15-VII-2011

Aceptado: 12-XII-2011

**Dirección postal:** Dr. Federico Cicora, Unidad de Trasplante Renal, Hospital Alemán, Av. Pueyrredón 1640, 1118 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4771-4165 e-mail:fcicora5@gmail.com

ceptores de quemoquinas. Esta secuencia de eventos tiene un gran impacto en la función del injerto en el postrasplante inmediato. El comienzo de un proceso inflamatorio inespecífico inicia y modula una respuesta antígeno específica postrasplante<sup>3</sup>. El IRI es el determinante no inmunológico más significativo de retardo en la función del injerto en el postrasplante inmediato. El proceso inflamatorio disparado por el IRI origina una gran cantidad de citoquinas que podrían ser producidas *in situ* desde el injerto o por linfocitos y macrófagos que infiltran el mismo ya en el donante, antes de que se realice la ablación del órgano. Este microambiente de citoquinas es el que va a determinar la diferenciación de los *subsets* de células T en el receptor, tales como Th1, Th2, Th17 y células T regulatorias (Tregs). Los *subsets* más comúnmente asociados al rechazo celular son Th1 y Th17. Además, la célula Th17 tiene la propiedad de reclutar neutrófilos y estimular la colaboración de linfocitos T con linfocitos B. Asimismo, el microambiente inflamatorio debe estar compuesto por diversas citoquinas tales como IL-6, IL-21, IL-17 o TGF- $\beta$  para poder diferenciarse en Th17 o Tregs.

En los últimos años, en diversas líneas de investigación, se intentó atenuar el IRI<sup>3,4</sup> con distintas estrategias como el tratamiento del donante o del receptor o, por otro lado, la modificación de las soluciones de preservación del órgano. En trabajos realizados por nuestro equipo se ha demostrado que el pre-acondicionamiento con drogas inmunosupresoras mejora clínica e histológicamente el proceso de IRI en un modelo animal de autotrasplante<sup>5</sup>. Está demostrado que, previamente a la ablación, el riñón contiene linfocitos T y macrófagos del donante<sup>6</sup>. En un modelo de autotrasplante, hemos investigado el proceso inflamatorio disparado por la IRI con la administración de MMF, rapamicina y tacrolimus en el donante, antes de la ablación del órgano. En dicho trabajo sólo se evaluaron los mecanismos de daño antígeno independiente. En el modelo singénico que se presenta en este trabajo se administraron drogas inmunosupresoras a los donantes y se evaluaron los mediadores inflamatorios en el receptor 24 h pos trasplante. El fenómeno inflamatorio disparado por la IRI debido a la isquemia fría y a la muerte cerebral puede explicarse por dos fenómenos: por mediadores inflamatorios liberados desde linfocitos T y macrófagos o por cambios generados en el parénquima renal. Es por ello que una de las estrategias para prevenir el fenómeno inflamatorio podría centrarse en la administración de drogas inmunosupresoras con propiedades antiinflamatorias en el donante. Dichas drogas habitualmente se administran a los receptores de trasplantes. Se observó que cuando se administra tacrolimus, un inhibidor de la calcineurina, a los donantes se atenúa el IRI<sup>7</sup>. Otra droga administrada comúnmente a los receptores es la rapamicina. La rapamicina, un inhibidor de la mTOR, ha demostrado ser efectiva como pre-acondicionamiento en un modelo de autotrasplante renal en ratas<sup>5</sup>. Ambas

drogas poseen propiedades antiinflamatorias capaces de modificar el microambiente inflamatorio generado por el IRI. Debido a que este microambiente determina la diferenciación de linfocitos Th *naïve* a Th17, la modificación podría generar la diferenciación a linfocitos Tregs con propiedades supresoras.

## Materiales y métodos

Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 280 a 350 g (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata). Todos los experimentos con animales se realizaron según las directrices establecidas por *National Institutes of Health* (NIH publicación N° 28 revisada en 1996).

Donantes: los animales donantes fueron anestesiados con atropina 0.01 mg/kg, buprenorfina 0.04 mg/kg, diazepam 10 mg/kg y, diez minutos más tarde, con ketamina 100 mg/kg de peso corporal i.p. Los vasos sanguíneos y el uréter se separaron por completo. Posteriormente, el riñón se lavó a través de la aorta con 3 ml de solución Ringer lactato a 4 °C hasta que se volvió homogéneamente pálido. Después se retiró el riñón izquierdo con sus pedículos vascular y ureteral y se lo almacenó durante 180  $\pm$  15 minutos en una solución de Ringer lactato frío a 4 °C.

Receptores: los animales fueron anestesiados como se indica arriba y después de realizar la nefrectomía bilateral, se disecaron los vasos abdominales infrarrenales para implantar el riñón con una técnica término-lateral, entre vena renal y vena cava abdominal y entre aorta del donante y receptor respectivamente. El uréter fue anastomosado por técnica término-terminal. Los animales se sacrificaron a las 24 horas pos-trasplante y se obtuvieron muestras de tejido renal.

Se administró una dosis de fármaco inmunosupresor a los animales donantes 12 horas antes de la nefrectomía. Se evaluaron 24 animales donantes y se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales más un grupo *sham*:

Grupo 1 (n = 6): Grupo *sham*

Grupo 2 (n = 6): no se administró inmunosupresión.

Grupo 3 (n = 6): se administró rapamicina (2 mg/kg) PO por sonda.

Grupo 4 (n = 6): se administró tacrolimus (0.3 mg / kg) PO por sonda.

A ninguno de los animales receptores se le administró fármacos inmunosupresores después del trasplante. Las muestras de sangre se tomaron en forma basal y antes del sacrificio de los animales. En el grupo *sham* se observaron valores normales de urea y creatinina pre y post trasplante.

Un patólogo que desconocía los tratamientos realizados analizó las muestras anatomopatológicas. Los riñones utilizados en los análisis histopatológicos se fijaron en una solución al 10% de formalina neutra tamponada y se embebieron en parafina. Se realizó la desparafinación de cortes de 4  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina - eosina. En las secciones renales se examinó de modo ciego el grado de necrosis cortical en células epiteliales tubulares. Las lecturas se realizaron en diez campos de 1 mm<sup>2</sup> y se realizó la asignación de la gravedad de la necrosis mediante puntuaciones en una escala de 1 (< 5%), 2 (5-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%) y 5 (> 75%).

El ensayo de TUNEL se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Apoptag: Oncor, Gaithersburg, MD, EE.UU.*). Se trataron secciones de tejido de 4  $\mu$ m de grosor desparafinadas con 20  $\mu$ l / ml de proteinasa K (*Dako, Glostrup, Dinamarca*) durante 30 minutos a 37 °C. Después del lavado, las secciones se incubaron con digoxigenina-trifosfato (dUTP) marcada con desoxiuridina en presencia de deoxynucleotidyl-transferasa-terminal. Después del bloqueo de la reacción

enzimática, las secciones se incubaron con un anticuerpo específico para digoxina marcado con peroxidasa. La peroxidasa se redujo en un 0.05 diaminobencidina (*Sigma*, St.Luis, MO, EE.UU.) en 0.1 ml/l de solución salina de *buffer* fosfato, pH 7.6 con 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después del lavado, las secciones se tiñeron ligeramente con hematoxilina. Se realizaron para cada paso de la reacción total reacciones negativas de control. Las mismas se obtuvieron por omisión de la transferasa terminal deoxynucleotidyl, anticuerpos antidigoxina y sustrato de peroxidasa. Para los controles positivos se incluyeron secciones de linfoma de origen humano en parafina. Se examinó la región medular externa y se cuantificó el número total de núcleos marcados. Se examinaron diez campos de 1 mm<sup>2</sup> por medio de una lente reticulada.

Se montaron secciones de 4 µm de espesor en portaobjetos recubiertos de poli-2-lisina. Las secciones se desparafinaron en xileno, deshidratadas en pasos por una sucesión de alcoholes y agua. Finalmente se sumergieron en una solución 0.3% vol/vol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 30 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Los antígenos se redujeron en un microondas de 750 W durante 15 min en 0.01 mol/l de *buffer* de citrato trisódico, pH 6.0, luego se lavaron con PBS y la unión inespecífica se bloqueó con suero equino 10% en PBS. Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios policlonales de cabra contra TNF-α, IL-6, rIL-21 e IL-17 (Santa Cruz de Biotecnología, Santa Cruz, CA, EE.UU.). Después de lavarse con PBS, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados. A continuación, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el complejo peroxidasa avidina-biotina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Vectastain kits; Vector Laboratories Ltd.*, Peterborough, Reino Unido). Se visualizaron peróxidos mediante la incubación de las secciones en el punto 3.3' diaminobenzidina (*Sigma Chemical Co.*, Poole, Reino Unido) y peróxido de hidrógeno. Los controles negativos se realizaron a través de la omisión de la incubación con los anticuerpos primarios. Se evaluaron en diez campos consecutivos en la corteza y médula renal. La extensión, en lugar de la intensidad de estos marcadores, se evaluó con una puntuación semicuantitativa. De acuerdo con el porcentaje de área túbulo-intersticial afectada, la escala se presenta de la siguiente manera: 1 (< 5%), 2 (6-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%), 5 (> 75%).

Todos los valores se expresan como media ± desviación estándar de la media (DE). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias de grupo. En los casos en que el ANOVA tuvo resultado significativo, las comparaciones múltiples se realizaron mediante la prueba *post hoc* de Bonferroni para localizar las fuentes de las diferencias. Las variables no paramétricas se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis no paramétrica de ANOVA. Se consideró p < 0.05 para indicar una diferencia estadísticamente significativa.

## Resultados

Las determinaciones en plasma se realizaron en muestras obtenidas 24 horas después del procedimiento de trasplante. En comparación con el grupo control, los valores de nitrógeno ureico en sangre en los grupos de tratamiento inmunosupresor se redujeron significativamente (BUN: control: 2.2 ± 0.15 mg/dl; rapamicina 1.8 ± 0.15 mg/dl; tacrolimus 1.6 ± 0.15 mg/dl; p < 0.001 frente a control) (Fig. 1A). El nivel de nitrógeno ureico en sangre fue menor con tacrolimus que con rapamicina (p < 0.01). En el caso de creatinina, si se compara con los valores

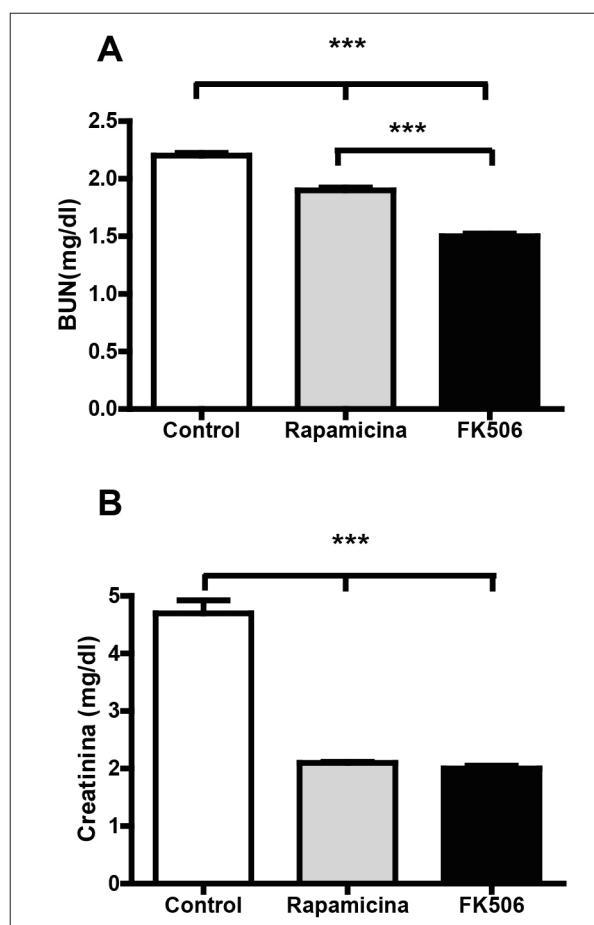


Fig. 1.- Niveles de BUN y creatinina en plasma después del trasplante. Veinticuatro horas después de trasplante se obtuvieron muestras de sangre y se determinaron los parámetros séricos (A) BUN y (B) de creatinina. Los valores se expresan como la diferencia entre el pre-trasplante y trasplantados para cada grupo. Los valores son media ± DE (n = 6). \* P < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* P < 0.001 para la comparación entre los grupos. No se observaron diferencias entre los animales *Sham*.

de control, los grupos de tratamiento inmunosupresor se redujeron significativamente (control: 4.7 ± 1,34 mg/dl; rapamicina 2.1 ± 0.1 mg/dl; FK506 2 ± 0.31 mg/d; p < 0.001 frente a control) (Fig. 1B). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos inmunosupresores sobre los niveles de creatinina (p > 0.05). En el grupo *sham*, no hubo diferencias en la urea y la creatinina plasmática entre las dos mediciones (BUN pre: 0.43 ± 0.01 mg/dl y post: 0.43 ± 0.03 mg/dl, p > 0.05; creatinina pre: 0.88 ± 0.06 mg/dl y post: 0.89 ± 0.05 mg/dl; p > 0.05).

Los niveles de necrosis y daño renal se evaluaron por hematoxilina - eosina en el riñón 24 horas después del trasplante (Fig. 2A). El *score* de necrosis tubular aguda (NTA) se redujo significativamente en los grupos de tratamiento con inmunosupresores en comparación

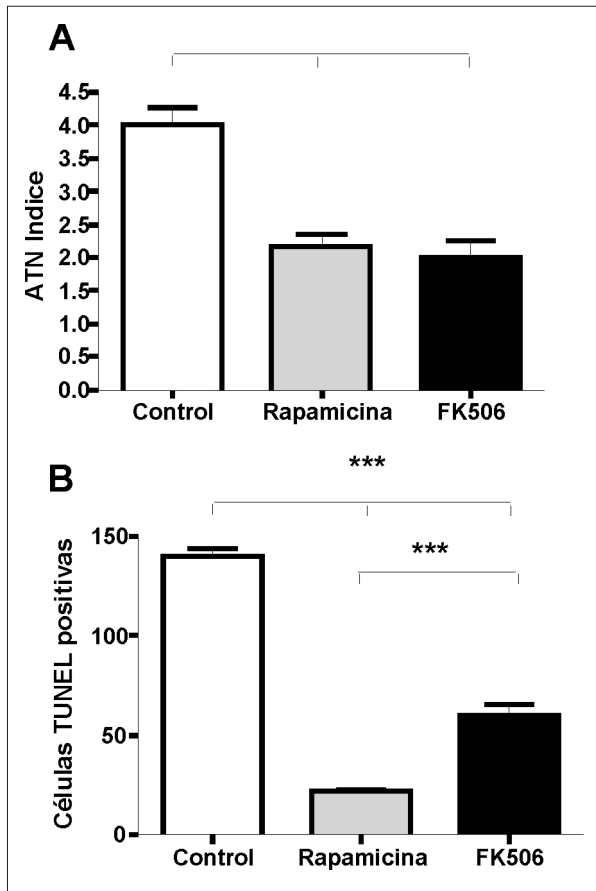


Fig. 2.– Daño tubular renal después del trasplante. (A) La puntuación de necrosis tubular aguda se clasificó en la corteza con tinción de H&E de acuerdo con los hallazgos histológicos, en particular 1 a 5. (B) La determinación de células apoptóticas se realizó por el método de TUNEL en la médula externa e interna. El número total de núcleos marcados se contó en diez campos de 1 mm<sup>2</sup>. Los valores son media ± DE (n = 6). \*P < 0.05 y \*\*\*P < 0.001 para la comparación entre los grupos.

con el grupo control ( $4 \pm 0.63$  en el control;  $2.2 \pm 0.41$  en rapamicina y  $2 \pm 0.63$  en tacrolimus;  $p < 0.001$  frente a control, Fig.2). Ninguna diferencia estadística surge de la comparación de rapamicina con tacrolimus. Asimismo, se determinó el número de núcleos apoptóticos en la médula renal (Fig. 2B). En el grupo de control, el número de células TUNEL-positivas fue mayor en comparación con los grupos de tratamiento inmunosupresor (control:  $138.7 \pm 24.8$ ; rapamicina:  $22.3 \pm 4.5$ ; tacrolimus:  $54.8 \pm 8.3$ ;  $p < 0.001$  frente a control, las Figuras 3A y 3B). El uso de rapamicina generó un menor número de células apoptóticas con respecto al tratamiento con tacrolimus ( $p < 0.01$ ).

Por último, la expresión local de TNF- $\alpha$ , IL-6 y rIL-21 IL17 se analizó mediante técnicas de inmunohistoquímica en el tejido renal de 24 horas después del trasplante (Fig.

3). Se observaron niveles más altos de TNF- $\alpha$  (Control:  $4.8 \pm 0.41$ ; rapamicina:  $1.5 \pm 0.55$ ; tacrolimus:  $1.5 \pm 0.55$ ,  $p < 0.001$  frente a control), IL-6 (control:  $3.3 \pm 0.52$ ; rapamicina:  $1 \pm 0.89$ ; tacrolimus:  $1.2 \pm 0.98$ ;  $p < 0.001$  frente a control) y rIL-21 (control:  $3.3 \pm 0.57$ ; rapamicina:  $2 \pm 1$ ; tacrolimus:  $1.66 \pm 0.57$ ;  $p < 0.001$  frente a control) en el grupo control en comparación con los grupos de tratamiento inmunosupresor. Sin embargo, parecería no existir diferencias entre los grupos de tratamiento ( $p > 0.05$ ). Los niveles de IL-17 no mostraron diferencias entre los grupos con inmunosupresión y el grupo control (datos no mostrados).

## Discusión

Nuestro trabajo experimental en injuria por isquemia y reperusión tuvo como objetivo determinar el comportamiento de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y rIL-21 relacionadas con la diferenciación de Th17, y examinar los niveles de urea y creatinina como así también la necrosis tubular aguda y apoptosis en ratas, cuando se administra tacrolimus en un grupo y rapamicina a otro grupo de donantes. El daño que se genera en el injerto en el post trasplante inmediato puede ser de causa inmunológica y no inmunológica. El daño tisular producido por el IRI es uno de los factores predisponentes al retardo en la función del injerto, al aumento en la tasa de rechazo agudo, a la disminución de la supervivencia del injerto a largo plazo y al aumento en los costos del trasplante. El modelo utilizado de ratas singénicas es libre de estimulación específica antigénica y permite evaluar en modo puro el proceso de IRI<sup>8-11</sup>.

En el postrasplante inmediato, uno de los objetivos es prevenir el rechazo agudo y una de las vías por las que éste es generado es la de las células Th17<sup>12</sup>. El equilibrio entre Th17 y Tregs es crucial para la homeostasis de la respuesta inmune. El TGF- $\beta$  es requerido para la diferenciación de Th17 y Treg ya que es necesario para inducir ambos tipos celulares<sup>13, 14</sup>. La sola presencia de TGF- $\beta$  e IL-2 induce la diferenciación de células Treg; pero en presencia de IL-6, el TGF- $\beta$  inicia la diferenciación hacia células Th17<sup>13, 15, 16</sup>. La IL-6 es un mediador que se encuentra aumentado durante el IRI renal y es un factor necesario para la diferenciación hacia células Th17. En ausencia de IL-6, la proteína FoxP3 se expresa y se establece un fenotipo Treg. Sin embargo, cuando la IL-6 está presente, los niveles de FoxP3 se reducen y se incrementa la expresión de ROR $\gamma$ t que, a su vez, conduce a un fenotipo Th17. Por lo tanto, la IL6 actúa como una potente citoquina proinflamatoria en las células T a través de la diferenciación a Th17.

En estudios anteriores se publicó que las células Tregs y las células Th17 pueden desarrollarse desde los mismos precursores, dependiendo del microambiente de citoquinas al momento de su activación<sup>17</sup>. Los resul-

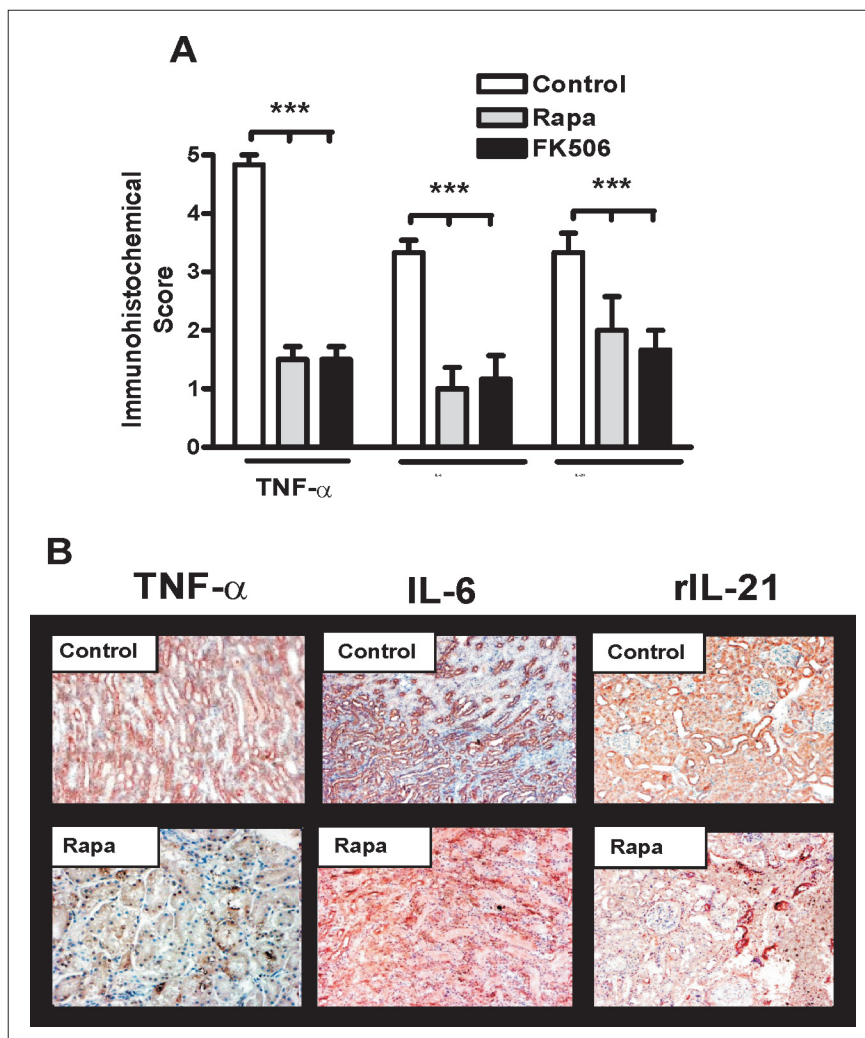


Fig. 3.– Expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 y rIL-21 después del trasplante. TNF- $\alpha$ , IL-6 e rIL-21 se calificaron en una escala de 1 a 5 mediante criterios microscópicos como se describen en Materiales y Métodos. Los valores son media  $\pm$  DE (n = 6). \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 para la comparación al grupo control. FK506: tacrolimus.

tados de nuestro estudio apoyarían la hipótesis de que el bloqueo de la citoquina IL-6 podría ser un tratamiento innovador para la disminución del rechazo agudo al inhibir la diferenciación hacia Th17. Asimismo, se ha demostrado que en injertos cardíacos vascularizados se produce un pico temprano de IL-6 y TNF- $\alpha$  por el mero procedimiento del trasplante<sup>18</sup>. Este proceso puede ser el detonante para la conversión de un fenotipo regulatorio hacia un perfil proinflamatorio que favorecería la diferenciación de células Th17 en el microambiente inflamatorio. En la actualidad existe consenso acerca de que la citoquina IL-6 induce la diferenciación hacia Th17 junto con TGF- $\beta$ <sup>19</sup>. Asimismo, existen estudios en los que se observa que la IL-21, similar a la IL-6, puede iniciar la diferenciación a Th17 junto con TGF- $\beta$ <sup>20, 21</sup>. La IL-21 y su receptor rIL-21 pertenecen a la familia de citoquinas que están involu-

cradas en la regulación del sistema inmune<sup>22</sup>. La IL21 es producida por células Th17 o por las células del epitelio tubular renal. Es un regulador crítico de la diferenciación de TH17 y posee efectos supresores sobre las células Tregs<sup>23</sup>. El conocimiento sobre el rol de IL-21/rIL-21 sistémico o en el injerto es limitado en la actualidad. Baan y col. informaron acerca de la *up* regulación de IL-21 y rIL-21 durante el rechazo en biopsias de trasplante cardíaco humano<sup>24</sup>. A diferencia de esto, Brandt y col. observaron que la IL-21 inhibe la maduración de células dendríticas *in vitro*<sup>25</sup>. Cuando las células dendríticas se diferencian *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea en presencia de IL-4 y factor estimulante de colonias de macrófagos – granulocitos, la suma de IL-21 en el cultivo lleva al desarrollo de células dendríticas inmaduras. Por tal, la IL-21 podría tener efectos anti inflamatorios sobre

las células dendríticas. En nuestro trabajo observamos una disminución de la expresión *in situ* de rIL-21 en ambos grupos de tratamiento, lo que podría tener efectos beneficiosos en el receptor. La retroalimentación positiva que produce la IL-21 para la diferenciación de Th17 podría estar disminuida, por lo que la vía de generación de rechazo celular vía este *subset* celular estaría atenuada.

En el presente trabajo exploratorio se observó que la administración de tacrolimus en un grupo y rapamicina en otro grupo, siempre a los animales donantes en un modelo de trasplante renal, disminuiría el daño renal histológico y mejoraría la función renal a las 24 horas post trasplante en el receptor del riñón. Esta mejor evolución del IRI podría ser el efecto de una disminución de señales proinflamatorias necesarias para la diferenciación de las células Th17. De esta manera, se favorecería la creación de un ambiente desfavorable para las células Th17 y favorable para la generación de Tregs. Por otro lado, creemos que los niveles de IL-17 no sufren cambios respecto al grupo control porque, a las 24 horas de trasplante, aún no se produjo la diferenciación de este *subset* de células Th17, productoras de IL-17. Por otro lado, el microclima proinflamatorio generado por la IRI no sería una fuente de IL-17 producida por células del epitelio tubular renal. Además, en los resultados del presente estudio, se observó una disminución de los niveles de rIL-21 en el grupo tratado con rapamicina y en el grupo tratado con tacrolimus. Como se mencionó previamente, la IL-21 es una citoquina que participa en la diferenciación de la Th17. Aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual estas drogas disminuyen la expresión *in situ* de las citoquinas relacionadas con la diferenciación de Th17 tales como IL-6 e IL-21.

En nuestros resultados se observaron menores porcentajes de necrosis tubular aguda y de apoptosis cuando se administraron las drogas a los donantes respecto al grupo control. En trabajos previos hemos observado que existiría un aumento en la expresión de genes antiapoptóticos como el Bcl-2 debido a la administración de rapamicina a los donantes<sup>26</sup>. Un trabajo previo de nuestro grupo en ratas singénicas observó que la rapamicina *up* regula *in situ* en mayor proporción respecto a tacrolimus, un gen antiapoptótico por excelencia como es el BCL-2<sup>26</sup>. Con respecto a dicha investigación, la administración de drogas inmunosupresoras a los donantes disminuyó aquellas señales pro inflamatorias. Este proceso podría crear un ambiente favorable para la diferenciación de Tregs durante la injuria isquémica producida por el IRI en trasplante renal.

El modelo utilizado es adecuado para evaluar injuria por isquemia y reperfusión en animales, pero se debe mencionar que el modelo no incluye muerte cerebral. La muerte cerebral constituye otro determinante de injuria no inmunológica en trasplante renal debido a la mayor infiltración del injerto por células tales como macrófagos

y linfocitos T y a la activación de células endoteliales y del epitelio tubular que aumentan la capacidad de todas ellas de generar mediadores inflamatorios. Es por ello que la administración de drogas inmunosupresoras y anti inflamatorias durante la muerte cerebral constituye otra línea de investigación a ser explorada. Por otro lado, también podría investigarse la interacción de drogas con propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias durante la muerte cerebral para disminuir la carga inflamatoria del donante.

Como conclusión, en nuestro trabajo experimental (exploratorio) se observó que la administración de rapamicina y tacrolimus al donante en grupos diferentes atenuaría el proceso de injuria por isquemia y reperfusión en trasplante renal. La disminución de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e rIL-21 en células del epitelio tubular renal podría generar un ambiente inadecuado para el desarrollo de Th17 y estimularía la creación de un ambiente favorable para la generación de Tregs.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Bibliografía

1. Diethelm AG, Blackstone EH, Naftel DC, et al. Important risk factors of allograft survival in cadaveric renal transplantation. A study of 426 patients. *Ann Surg* 1988; 207: 538-48.
2. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996; 155: 1831-40.
3. Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2006; 6: 652-8.
4. Halloran P, Aprile M. Factors influencing early renal function in cadaver kidney transplants. A case-control study. *Transplantation* 1988; 45: 122-7.
5. Cicora F, Lausada N, Vasquez DN, et al. Protective effect of immunosuppressive treatment before orthotopic kidney autotransplantation. *Transpl Immunol* 2011; 24: 107-12.
6. de Vries DK, Lindeman JH, Ringers J, Reinders ME, Rabenlink TJ, Schaapherder AF. Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 1064-70.
7. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, et al. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 2001; 72: 1753-9.
8. Lin A, Sekhon C, Sekhon B, et al. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 654-9.
9. Richer JP, Gibelin H, Planet M, et al. Ischemia-reperfusion injury is associated with inflammatory cell infiltration: evaluation in a pig kidney autotransplant model. *Transplant Proc* 2000; 32: 482-3.
10. Tahara M, Nakayama M, Jin MB, et al. A radical scavenger, edaravone, protects canine kidneys from ischemia-reperfusion injury after 72 hours of cold preservation and autotransplantation. *Transplantation* 2005; 80: 213-21.
11. Zhang Y, Ma Q. The enhancement of cellular cAMP with olprinone protects autotransplanted rat kidney against

- cold ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2006; 38: 1580-3.
12. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28:454-67.
  13. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 2008; 9: 641-9.
  14. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004; 172: 5149-53.
  15. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al.: IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008, 454: 350-352.
  16. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; 9: 650-7.
  17. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1830-5.
  18. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 1990; 79: 161-5.
  19. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950-7.
  20. Niu X, He D, Zhang X, et al. IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2010, 71: 334-41.
  21. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, et al. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3155-63.
  22. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 2002, 298: 1630-4.
  23. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79.
  24. Baan CC, Balk AH, Dijke IE, et al. Interleukin-21: an interleukin-2 dependent player in rejection processes. *Transplantation* 2007; 83: 1485-92.
  25. Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC, Ruckert R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 2003; 102: 4090-8.
  26. Cicora F, Lausada N, Vasquez DN, et al. Sirolimus in kidney transplant donors and clinical and histologic improvement in recipients: rat model. *Transplant Proc* 2010; 42: 365-70.

----

*“Do you know, Watson,” said he [Holmes], “that it is one of the curses of a mind with a turn like mine that I must look at everything with reference to my own special subject. You look at these scattered houses, and you are impressed by their beauty. I look at them, and the only thought which comes to me is a feeling of their isolation, and the impunity with which crime may be committed there.”*

“Usted sabe, Watson”, dijo [Holmes], “que una de las maldiciones de una mente cerrada como la mía es que yo debo ver todo con referencia a mi propio y especial tema. Usted ve esas casas dispersas y le impresionan por su belleza. Yo las veo y el único pensamiento que acude a mi mente es la sensación de su aislamiento y la impunidad con la cual se puede cometer allí un crimen.”

Arthur Conan Doyle (1859-1930)

*Adventures of Sherlock Holmes (1892). XII.-THE ADVENTURE OF THE COPPER BEACHES. The Original Illustrated “STRAND” Sherlock Holmes. The Complete Facsimile Edition. Ware, Hertfordshire (UK); Wordsworth, 1989, p 277*