

EDITORIAL

PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β , ANGIOTENSINA II, ENDOTELINAS Y GLICOPROTEÍNA P EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA NEFROPATÍA CRÓNICA DEL INJERTO

O'Valle F., Aguilar M., Olmo A., Gómez-Morales M., Espigares B., del Moral RG.
Departamento de Anatomía Patológica, facultad de Medicina y Hospital Universitario "San Cecilio", Granada (Spain)

La esclerosis glomerular e intersticial progresiva por depósito de matriz extracelular y fibras de colágena constituye la lesión fundamental que conduce al fracaso del injerto renal (1).

Los mecanismos responsables de estos fenómenos no se conocen completamente en la actualidad. En general, las distintas evidencias clínicas y experimentales confirman que el componente inflamatorio a través de la secreción de citocinas y la lesión vascular crónica con arteriosclerosis progresiva juegan un papel fundamental en la progresión de las lesiones (2). Sin embargo no debe olvidarse que otros mecanismos de base no inmunológica como la hipertensión mantenida postrasplante (3), la hiperfiltración glomerular (4), el propio tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A (5) y el desarrollo de fenómenos de resistencia a dicho tratamiento a través de la inducción excesiva del sistema detoxicante de la P-glicoproteína en la superficie de los linfocitos (6-9) también juegan un papel relevante.

En los diez últimos años se ha profundizado progresivamente en el conocimiento de determinadas moléculas peptídicas, conocidas de forma genérica como factores de crecimiento. Estas moléculas ejercen una acción fundamental en la regulación del desarrollo celular, así como en la modulación de su funcionalidad, en particular en lo que respecta a la síntesis y degradación de proteínas de matriz, cuya participación en la pérdida crónica del injerto renal ha sido revisada recientemente (2).

De todas ellas, la que ha recibido una atención más detallada ha sido el factor de crecimiento transformante β (TGFB) (10-13). Pero junto a las mismas, también se ha ido comprobando que otros moduladores bien conocidos de la función renal y considerados únicamente hace años como simples hormonas vasoactivas, caso de las endotelinas (14, 15) y los polipéptidos implicados en el sistema renina-angiotensina (16) también podían jugar un papel muy significativo como moduladores del crecimiento celular y de la síntesis de matriz.

En relación con la síntesis de los posibles mediadores de la esclerosis glomérulo-intersticial, desde muy antiguo se ha enfatizado el papel del infiltrado inflamatorio asociado como agente productor de mediadores profibróticos, un hecho que parece absolutamente demostrado en el caso del macrófago que es capaz de sintetizar tanto endotelina (17) como factor de crecimiento transformante β (18-20), posiblemente el más potente factor de crecimiento inductor de fibrosis intersticial (18, 19).

Menos conocido es el papel que las endotelinas llevan a cabo en el conjunto de los procesos reparativos y fibrosantes que provocan el fracaso crónico de los injertos ya sea de forma directa activando la síntesis colágena o indirecta a través de su acción vascular (21).

Mediadores de lesión en la nefropatía crónica del injerto

La progresión del fracaso crónico del trasplante renal está caracterizada desde el punto de vista histológico por glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial progresiva que se acompaña de hialinosis y esclerosis de las paredes vasculares y un patente infiltrado inflamatorio por células mononucleadas (1) cuyos patrones de lesión han sido estandarizados recientemente (22, 23).

Título abreviado: Factores moduladores de la NCI

Dirección para correspondencia:

DR. RAIMUNDO G. DEL MORAL

Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina

Avda. de Madrid 11, E-18012

Granada (SPAIN)

Telefono: 958-243509 • Telefax: 958-243510

e-mail: rgarcia@goliat.ugr.es

Las células inflamatorias, esencialmente linfocitos T y macrófagos (6, 24, 25) y a través de la producción de interferón gamma, mediatizan la inducción de la expresión de antígenos mayores de histocompatibilidad de clase II por parte de las células tubulares de riñón y la liberación de multitud de mediadores bioquímicos y factores de crecimiento productores de lesión y fibrosis (20, 26).

En el caso de los linfocitos T, es bien conocido que estas células juegan un papel dominante en la orquestación de la respuesta inflamatoria ya que participan tanto en el reconocimiento de los antígenos y el reclutamiento de otras subpoblaciones leucocitarias participantes en el proceso inflamatorio (esencialmente macrófagos, linfocitos B y T CD8+ y células NK a través de la producción de linfocinas específicas (27) como mediante la producción de otras interleucinas (IL-4), que actúa como factor mitogénico directo inductor de proliferación fibroblástica así como agente quimiotáctico para inducir la movilización de fibroblastos sobre la matriz extracelular (28).

Además recientemente se ha publicado que el bloqueo mediante proteínas de fusión de la vía CD28/B7 necesaria para la coestimulación de los linfocitos T, que inicia el reconocimiento alógeno previene el desarrollo de rechazo crónico del injerto renal en modelos experimentales y podría constituir una buena alternativa terapéutica en el futuro (29).

Los macrófagos con el paso del tiempo se han erigido en los auténticos protagonistas del proceso reparativo (20) debido por una parte, a la secreción de diversas linfocinas susceptibles de influir en el mismo pero sobre todo, por su papel en la producción de algunas de los factores de crecimiento fibrogénicos de mayor importancia como el factor de crecimiento transformante β (18, 19, 20, 30) y su participación en la secreción de sustancias de la matriz intersticial como la fibronectina (31).

El TGF- β es un compuesto del que se conocen tres isotipos ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) con múltiples acciones y del cual se ha descrito un considerable incremento a lo largo de la reacción de rechazo del injerto renal (10, 11, 32), así como una relación directa con la fibrosis intersticial que caracteriza a este proceso (33).

En lo que se refiere a la actuación del TGF- β , se le han atribuido múltiples funciones, algunas de ellas contrapuestas entre sí. De este modo, el TGF- β es un factor estimulante del crecimiento de células mesangiales, mientras que sobre células epiteliales es inhibidor del crecimiento; tiene acciones angiogénicas "in vivo" pero es un potente inhibidor de la neoangiogénesis in vitro (34).

En el caso del TGF- β de tipo 1, tres laboratorios diferentes han descrito la existencia de lugares específicos de unión en el colágeno (35), la fibronectina (36) y los proteoglicanos (37). Esta unión es independiente de los receptores que los fibroblastos presentan para este factor de crecimiento aunque su afinidad por el mismo es similar.

En cuanto a sus acciones biológicas, el TGF- $\beta 1$ (Fig.1):

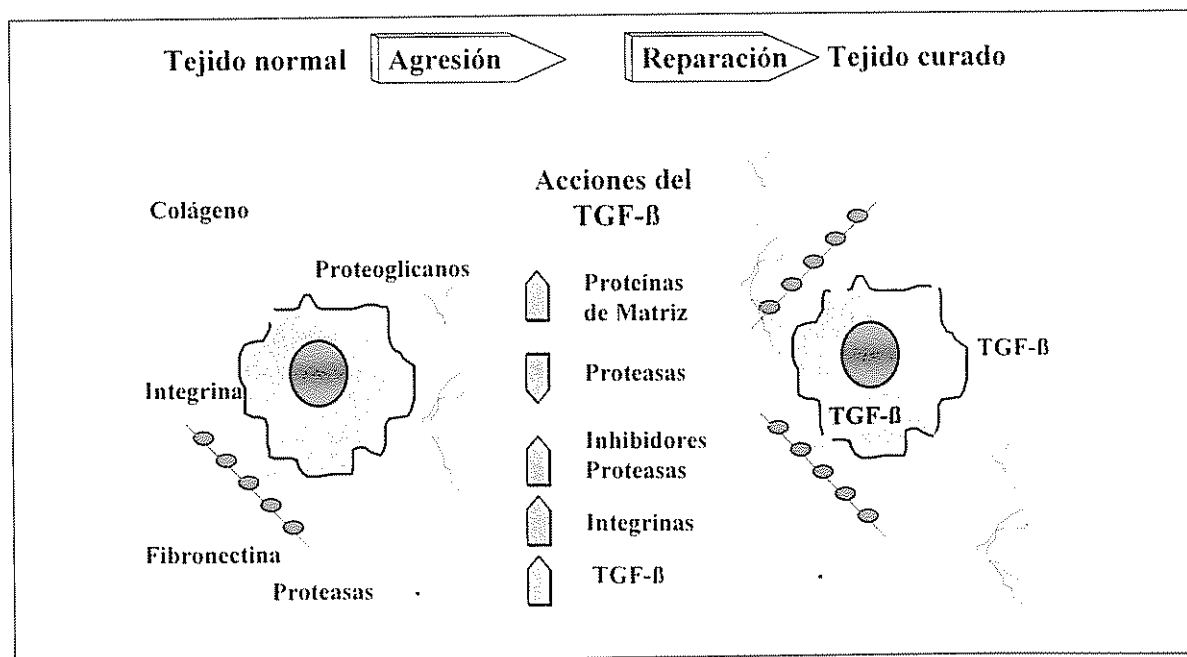


Figura 1. Papel del TGF- β secretado por los macrófagos tras la agresión tisular. El TGF- β induce la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Proteoglicanos, fibronectina, colágeno), de moléculas de adhesión (integrinas); reduce la síntesis de proteasas a la vez que incrementa la síntesis de inhibidores de estas enzimas y por último estimula la producción de más TGF- β de forma autocrina, todo con el fin de reparar la lesión producida.

- a) en general bloquea el crecimiento de las células (38), aunque en el caso de los fibroblastos, su proliferación puede ser estimulada o inhibida dependiendo de su tipo (39). Este efecto antiproliferativo parece deberse a que el TGF- β mantiene los niveles de fosforilación de la proteína Rb por debajo de lo normal e inhibe la transcripción del ARNm de la oncoproteína c-Myc, todo lo cual afecta a la neosíntesis de ADN y de otras proteínas necesarias para la división celular (40).
- b) estimula la transcripción de los genes y la producción de colágeno I, III, V y VI, fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopontina, trombospondina y glicosaminoglicanos de la matriz todo ello mediado por su unión al factor nuclear I (NF-1) (41).
- c) provoca el ensamblaje de las fibras, la fibronectina y los proteoglicanos para producir el estroma intersticial (42).
- d) inhibe la transcripción de la colagenasa y de la estromalisina (43).
- e) estimula la síntesis del inhibidor de las metaloproteinasas (44).
- f) posee fuerte acción inmunosupresora local disminuyendo la actividad de los linfocitos T (19, 38) y reduciendo la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B salvo en el caso de la IgA, cuya síntesis estimula (45).
- g) induce la síntesis de endotelina por parte del endotelio, lo cual parece ser el mecanismo fundamental por el que la activación plaquetaria y la subsiguiente secreción de TGF- β por parte de las mismas provoca la vasoconstricción transitoria que acompaña a todo daño vascular (46).

Uno de los aspectos más novedosos en el estudio del papel que el tratamiento inmunosupresor con CsA puede jugar en la progresión de la fibrosis intersticial de los pacientes con trasplante renal ya que se ha descrito que la CsA por sí misma, produce un incremento de la secreción de TGF β en las células mononucleadas de sangre periférica (40, 47) así como una estrecha relación entre la expresión tubular incrementada de este mediador y las lesiones de nefrotoxicidad inducidas por CsA (10, 11, 48) y FK506 (49)

La esclerosis vascular que se advierte en las biopsias renales postrasplante (fundamentalmente engrosamiento e hialinosis de paredes arteriolas) no cabe duda que contribuye de manera importante a la progresión de la fibrosis intersticial, tanto por los fenómenos de isquemia que provoca (50), como por la participación en el reclutamiento de los pericitos de la pared del vaso para su transformación en miofibroblastos por acción de factores de crecimiento como el TGF- β segregado a nivel perivascular (51).

La demostración de que en trasplante cardíaco, las lesiones vasculares del rechazo crónico y arteriosclerosis asociadas al mismo están asociadas a una secreción incrementada de endotelina 1 (21, 52, 53) así como la descripción de importantes modificaciones en la distribución glomerular, vascular y tubular de este mediador en biopsias renales postrasplante frente a los controles normales (54) constituye un buen motivo para analizar su papel en la reacción de rechazo crónico del injerto renal.

En este sentido y por adición de endotelina a cultivos celulares se ha comprobado que este mediador vasoactivo:

- a) induce proliferación celular (55), promoviendo la síntesis de ADN en ausencia de otros factores y estimulando la transcripción de genes reguladores del crecimiento lo cual justifica su actuación como mitógeno fibroblástico (56).
- b) estimula los fenómenos de adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, vía asociación de integrinas de superficie celular (57) y podría promover la infiltración inflamatoria que acompaña a la nefrotoxicidad farmacológica por CsA (58) además de contribuir al mantenimiento de los infiltrados celulares que se observan en los riñones trasplantados con función renal estable (59).
- c) promueve la remodelación tisular, incluyendo la acumulación del colágeno fibrilar (60).

En cuanto al papel fibrogénico de la endotelina en modelos clínicos, se ha demostrado un aumento significativo de los niveles plasmáticos de endotelina en el suero de pacientes con esclerodermia (61), pacientes afectos de fibrosis pulmonar idiopática (62) y sobre todo pacientes sometidos a trasplantes orgánicos (63).

En un estudio experimental propio, la estimulación de la línea fibroblástica VERO de estroma renal de mono con endotelina demostró un efecto activador de la proliferación celular e incorporación de prolina tritiada con excreción de precursores colágenos al medio a partir de las 24 horas de cultivo (64).

En experiencias in vivo, un elegante trabajo experimental en ratas (65), ha demostrado que la fibrosis intersticial que acompaña a la nefrotoxicidad crónica por CsA está vinculada a un desbalance del sistema renina-angiotensina, mientras que la endotelina sería más bien responsable del efecto funcional de vasoconstricción que indefectiblemente se asocia a esta lesión, lo cual ha abierto importantes interrogantes sobre el papel fibrogénico directo de la endotelina I.

Pese a ello no debe olvidarse que los vínculos funcionales tan importantes que mantienen la angiotensina II y el sistema de las endotelinas (66) hace difícil separar la acción de ambos mediadores por lo cual al cobrar la endotelina principal protagonismo como agente vasoconstrictor, la isquemia postcapilar mantenida podría desempeñar su efecto en la progresión de la fibrosis a largo plazo, mientras que como parece demostrado a corto plazo sería la angiotensina II el principal factor. En este sentido recientemente se ha publicado que la hipertensión diastólica postrasplante es el resultado de una secreción incrementada de endotelina inducido por TGF- β a través de la activación del RAS (67).

Papel de la glicoproteína P en el desarrollo de resistencia a la terapia inmunosupresora

Uno de los principales problemas en el tratamiento quimioterápico de las neoplasias es el desarrollo por parte de las células tumorales de fenómenos de resistencia cruzada frente a fármacos de estructura química muy distinta. Este fenómeno ha sido clásicamente llamado "multidrug resistance" o fenómeno MDR (68).

Aunque los mecanismos celulares y moleculares implicados en el mismo son muy variables incluyendo la activación de los sistemas enzimáticos relacionados con la glutatión-S-transferasa y topoisomerasa II, un factor domina sobre todos ellos, el papel que juega la expresión incrementada de una glicoproteína de 170 kD de masa molecular denominada glicoproteína P (Gp-P) y otras glicoproteínas asociadas (MRP y LRP).

La Gp-P en humanos está codificada por el gen MDR1 (69) que está relacionado con otros de similar estructura que codifican para proteínas como las adenilicinas, el regulador transmembrana de la fibrosis quística y otras proteínas de transporte iónico. Estos genes se han encontrado en multitud de organismos vivos que incluyen esponjas marinas, plantas, peces, nematodos, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* y *Tripanosoma cruzi*, bacterias y otras especies. Esta amplia presencia ha dado origen a la unificación de todos estos genes en una superfamilia de transportadores de membrana dependientes de ATP o superfamilia ABC (70).

Aspectos funcionales y distribución de la glicoproteína-P en humanos

La Gp-P actúa funcionalmente como una bomba de eflujo que expelle sustancias hidrofóbicas desde el citoplasma celular. En términos fisiológicos, Gp-P funciona de acuerdo al modelo propuesto por Gottesman et al. (Fig. 2), quienes la han denominado "aspirador de moléculas hidrofóbicas" (71).

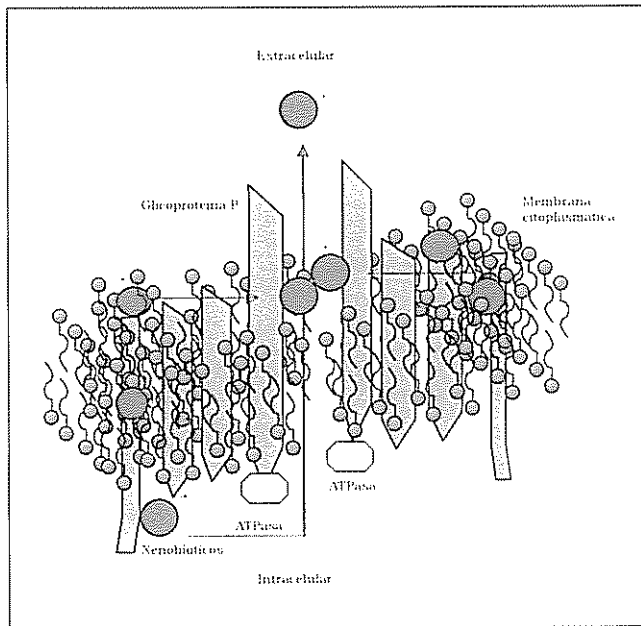


Figura 2. Esquema del modelo propuesto por Gottesman y colaboradores denominado "aspirador de moléculas hidrofóbicas" para explicar la función fisiológica de la glicoproteína P. Esta molécula actúa como una bomba de eflujo para expeler sustancias hidrofóbicas situadas en la superficie celular, en la membrana citoplasmática y principalmente en el interior celular.

Los fármacos susceptibles de interactuar con Gp-P son compuestos hidrofóbicos como actinomicina D, daunorrubicina, doxorubicina, colchicina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, mitomicina y mitramicina. Sin embargo, el espectro de sustancias que pueden ser vehiculadas por la Gp-P se ha incrementado de forma progresiva y actualmente incluye digoxina, hormonas esteroideas como cortisol, dexametasona y mineralocorticoides como aldosterona (72). Además, muchos fármacos como los antagonistas de los canales de calcio, FK506, rapamicina y ciclosporina A se ha demostrado que interfieren la expresión y función de la Gp-P, generalmente a través de un mecanismo de inhibición competitiva (73).

La trascendencia de la Gp-P en la eliminación de fármacos distintos a los quimioterápicos antineoplásicos ha sido puesta de manifiesto recientemente al describirse las graves alteraciones que muestra la distribución intratistular de fármacos como la dexametasona, la digoxina y la ciclosporina A en el ratón "knockout" para el gen *mdr1a* (74).

Además de las neoplasias que se han hecho resistentes a la quimioterapia, los tejidos normales con mayor abundancia de Gp-P son los epitelios secretores como el túbulo proximal del riñón (9) así como células mesangiales, asa de Henle y túbulos colectores (75), la corteza suprarrenal y los conductillos biliares (76), de forma que la presencia de Gp-P puede ser demostrada por métodos inmunohistoquímicos en las membranas celulares (Fig. 3).

Adicionalmente, se ha demostrado la presencia de Gp-P en varias líneas células neoplásicas y transformadas así como en linfocitos normales (77).

Entre estos últimos, su capacidad para eliminar del citoplasma celular diversas sustancias fluorescentes como por ejemplo, la rodamina 123 se ha vinculado a la presencia de Gp-P y además se ha demostrado que las distintas subpoblaciones leucocitarias difieren en su expresión de Gp-P y por tanto, en su capacidad para ejercitar su función antitóxica, que se ha comunicado es progresivamente mayor en las células CD57, CD8 y CD4 que en los linfocitos B CD20 positivos si bien en sujetos no sometidos a tratamiento farmacológico se ha demostrado que la proporción de linfocitos que contienen acúmulos detectables de Gp-P no supera el 15% (78).

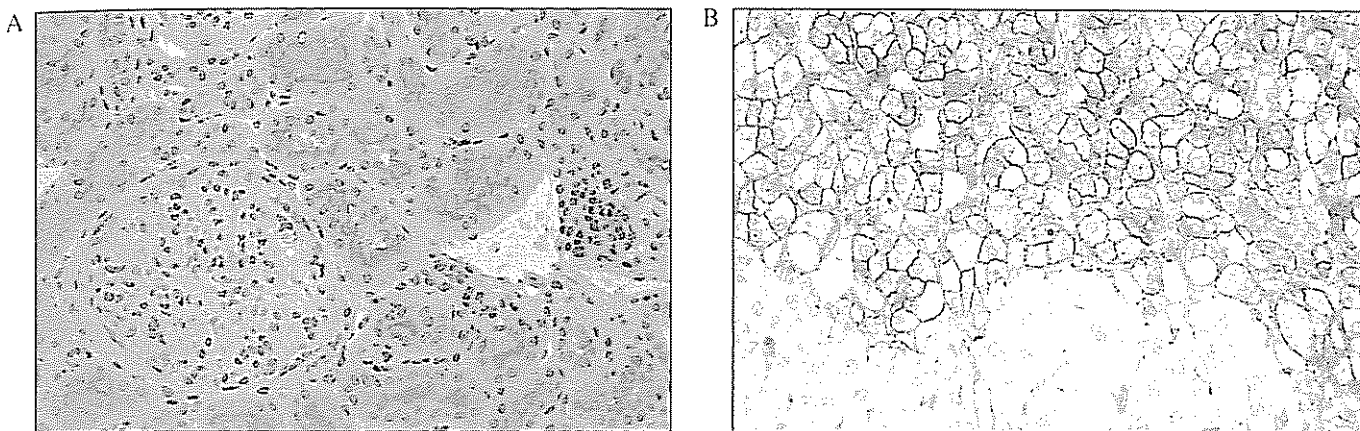


Figura 3. A) Expresión inmunohistoquímica de glicoproteína P en el borde en cepillo de los túbulos proximales renales (Fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina, x200). B) Expresión normal de glicoproteína P en la corteza suprarrenal localizada en las membranas celulares (estreptavidina-biotina-Peroxidasa x400)

Todos estos hallazgos sugieren que la expresión de un fenotipo MDR (+) puede jugar no sólo un papel antitóxico sino que podría ser de importancia en la regulación del tráfico de sustancias de carácter enzimático o mediadores de la respuesta inmunitaria relacionadas con la función leucocitaria (78, 79).

Variabilidad individual en la expresión de glicoproteína-P

En cuanto a la variabilidad en la expresión de Gp-P entre sujetos apenas existen descripciones en la literatura. Uno de los primeros estudios sobre el tema ha sido presentado por Schuetz et al. (80) en tejido hepático, donde se demuestra la variabilidad en la expresión de Gp-P tanto sobre tejido normal como en respuesta a agentes tóxicos. En dicho estudio se miden los niveles de mRNA de Gp-P en hígado de pacientes hepatectomizados por neoplasias, existiendo variación entre individuos con diferencias de hasta 4.5 veces, que se ponen de manifiesto tanto al analizar el parénquima hepático normal como el tumoral de cada paciente.

A su vez, los cultivos de hepatocitos sanos muestran heterogeneidad en la respuesta frente a la lesión inducida por hidrocarburos aromáticos.

Resultados publicados por nuestro grupo de investigación (9) demuestran que en células renales no neoplásicas, la CsA puede estimular la expresión de Gp-P como mecanismo de detoxificación, aunque existen variaciones individuales en la respuesta adaptativa a Gp-P que podrían ser responsables de las diferencias individuales observadas en la susceptibilidad a la nefrotoxicidad mediada por CsA. De igual modo, y en un modelo experimental de nefrotoxicidad crónica por CsA en rata (81), aunque hay una tendencia hacia la sobreexpresión de dicha glicoproteína en los grupos tratados, en general se ha observado una respuesta heterogénea, que podría estar condicionada genéticamente por los niveles basales previos al tratamiento.

Expresión de glicoproteína-P en trasplantes orgánicos

En el momento actual existen varias descripciones acerca del papel que parece jugar la sobreexpresión de Gp-P en los tejidos de los pacientes trasplantados y el desarrollo de reacciones de rechazo resistentes al tratamiento inmunosupresor.

De este modo se ha encontrado incremento de los niveles de Gp-P en la superficie linfocitaria demostrado por citometría de flujo en pacientes portadores de trasplante cardíaco en tratamiento con CsA y este hecho se ha puesto en relación con la aparición de crisis de rechazo refractarias al tratamiento (82).

Asimismo y sobre biopsias de pacientes con trasplante pulmonar y crisis de rechazo agudo resistente a esteroides se ha demostrado elevación concomitante de Gp-P en los linfocitos infiltrantes en el injerto (83); un hecho descrito muy recientemente también en receptores de trasplante cardíaco (84) y en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con trasplante renal (85, 86).

Con independencia de la relación directa observada entre el tratamiento crónico con CsA y la inducción de sobreexpresión de Gp-P en linfocitos, nuestro grupo utilizando técnicas inmunohistoquímicas ha encontrado en biopsias renales postrasplante que la presencia de depósitos intrarrenales de CsA se asocia a una expresión aumentada de Gp-P en las células del túbulo proximal (9) (Fig.3). En esta publicación hemos demostrado sobre un estudio inmunohistoquímico de biopsias renales de 52 pacientes que existía una fuerte asociación entre los depósitos intrarrenales de CsA y la expresión de Gp-P en el parénquima renal y que este hecho mostraba una elevada significación estadística ($p < 0.001$). De forma muy interesante, no encontramos correlación entre los niveles séricos de CsA y los depósitos intrarrenales del fármaco y por el contrario demostramos la ele-

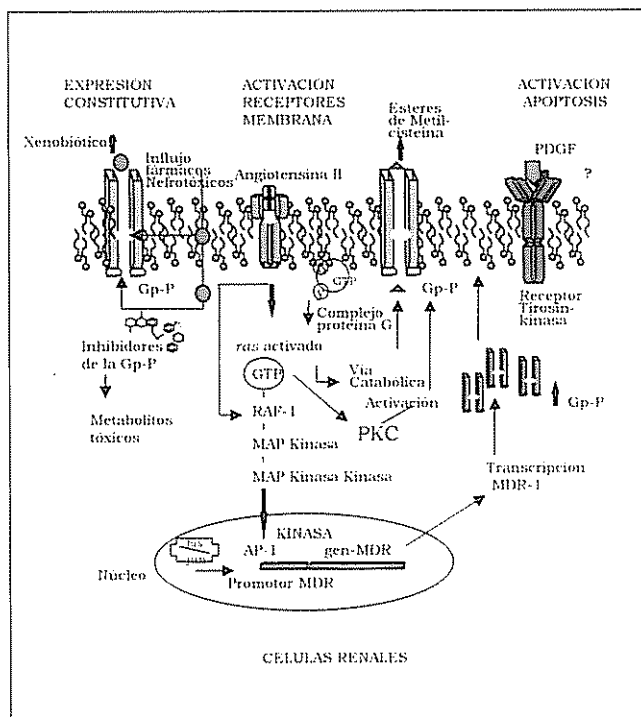


Figura 4. Mecanismo propuesto por nuestro grupo para explicar la relación entre los depósitos de angiotensina II y la expresión de glicoproteína P (Gp-P) en el riñón. La estimulación por la angiotensina II de su receptor de membrana específico, desencadena la activación de la proteína ras, que en su vía degradativa produce ésteres de metilcisteína, que son vehiculizados por la Gp-P. Estos metabolitos tóxicos entra en competición con los fármacos expulsados por la Gp-P y de no producirse una adecuada inducción del gen MDR-1 y posterior producción de Gp-P el resultado final es la lesión celular.

vada variabilidad individual del fenómeno y que justamente los pacientes que no presentaban una inducción de Gp-P fueron aquellos que mostraron mayor incidencia de lesiones de nefrotoxicidad.

Con posterioridad, otros autores (87) y nuestro propio grupo (88) han corroborado en modelos experimentales in vivo que el tratamiento con CsA induce este fenómeno a nivel del riñón (82). De forma complementaria a lo mencionado, se ha propuesto que la CsA podría actuar como bloqueante de Gp-P en los túbulos renales por un mecanismo de inhibición competitiva similar al demostrado en las células neoplásicas (73) y que este hecho podría conducir a la acumulación en el interior de las células tubulares de toxinas endógenas o metabolitos tóxicos de la CsA (89) (Fig. 4). En un reciente trabajo (88) hemos demostrado la relación existente entre la acumulación intrarrenal de angiotensina II y la sobreexpresión de Gp-P en un modelo de nefrotoxicidad por CsA en ratas, proponiendo que en los animales con mayor incidencia de arteriopatía hialina, la incapacidad por parte de las fibras musculares lisas de las arteriolas para sobreexpresar Gp-P en respuesta a la presión farmacológica por CsA produciría una acumulación de ésteres tóxicos de metilcisteína responsables de la muerte celular y su sustitución por sustancia hialina (Fig. 4).

En relación con esta hipótesis de trabajo, nuestro propio grupo de investigación y otros (90, 91) han publicado recientemente amplias revisiones de las funciones de la Gp-P en el riñón, proponiendo a este sistema excretor de xenobióticos como uno de los mecanismos más importantes de control de la nefrotoxicidad farmacológica.

Referencias Bibliográficas

1. CROKER BP, RAMOS EL: Pathology of the renal allograft. En: Renal Pathology. With Clinical and Functional Correlations. Tisher CC, Brenner BM. Philadelphia, Lippincot Co. 2th Ed. Vol II. 1591-1640.
2. LEMSTRÖM K, KOSKINEN P, HÄYRY P: Molecular mechanisms of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995, 48: S2-S10.
3. PAUL LC, BENEDIKTSSON H: Post-transplant hypertension and chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 1995, 48: S34-S37.
4. BARRIENTOS A, PORTOLES J, HERRERO JA, TORRALBO A, PRATS D, GUTIERREZ MV, BLANCO J: Glomerular hyperfiltration as a nonimmunologic mechanism of progression of chronic renal rejection. *Transplantation* 1994, 57: 753-756.
5. REMUZZI G, PERICO N: Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int* 1995, 48: S70-S74.
6. GOMEZ-MORALES M, BUSTOS M, MONTES A, ANDUJAR M, MEDINA-CANO MT, RAMIREZ C, O'VALLE F, AGUILAR D, ANEIRO J, GARCIA DEL MORAL R: Influence of intrarenal deposits of cyclosporin A on acute renal transplant rejection. *Nephron* 1995, 70: 402-409.
7. YOUSEM SA, SARTORI D, SONMEZ-ALPAN E: Multidrug resistance in lung allograft recipients: possible correlation with the development of acute and chronic rejection. *J Heart Lung Transplant* 1993, 12: 20-26.
8. ZANKER B, BARTH C, MENGES AV, LAMMERDING P, STACHOWSKI J, BALDAMUS CA: Expression of the multidrug resistance gene MDR-1 in peripheral blood mononuclear cells from cyclosporin-treated renal transplant recipients rejecting their graft. *Transpl Proc* 1995, 27: 925-926.
9. GARCIA DEL MORAL R, O'VALLE F, ANDUJAR M, AGUILAR M, LUCENA MA, LOPEZ-HIDALGO J, RAMIREZ CL, MEDINA-CANO MT, AGUILAR D, GOMEZ-MORALES M: Relationship between P-glycoprotein expression and cyclosporin A in kidney. An immunohistological and cell culture study. *Am J Pathol* 1995, 146: 398-408.
10. SHIHAB FS, YAMAMOTO T, NAST CC, COHEN AH, NOBLE NA, GOLD LI, BORDER WA: Transforming growth factor beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 1995, 6: 286-294.
11. PANKEWYCZ OG, MIAO L, ISAACS R, GUAN J, PRUETT T, HAUSSMANN G, STURGILL BC: Increased renal tubular expression of transforming growth factor beta in human allografts correlates with cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1996, 50: 1634-1640.

12. HORVATH LZ, FRIESS H, SCHILLING M, BORISCH B, DEFLORIN J, GOLD LI, KORC M, BUCHLER MW: Altered expression of transforming growth factor beta S in chronic renal rejection. *Kidney Int* 1996, 50: 489-498.
13. SHARMA VK, BOLOGA RM, XU GP, LI BG, MOURADIAN J, WANG J, SERUR D, RAO V, SUTHANTHIRAN M: Intragraft TGF-beta (I) messenger RNA. A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996, 49: 1297-1303.
14. ONG ACM, JOWETT TP, FIRTH JD, BURTON S, KARET FE, FINE LG: An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney Int* 1995, 48: 390-401.
15. BENIGNI A, REMUZZI G: Endothelin in the progressive renal disease of glomerulopathies. *Miner Electrol Metab* 1995, 21: 283-291.
16. HARRIS RC, MARTINEZ-MALDONADO M: Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrol Metab* 1995, 21: 328-335.
17. KRUM H, ITESCU S: Spontaneous endothelin production by circulating mononuclear cells from patients with chronic heart-failure but not from normal subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994, 21: 311-313.
18. BORDER WA, NOBLE NA: Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 1994, 331: 1286-1292.
19. LAWRENCE DA: Transforming growth factor- β : an overview. *Kidney Int* 1995, 47: S19-S23.
20. EDDY AA: Interstitial macrophages as mediators of renal fibrosis. *Exp Nephrol* 1995, 3: 76-79.
21. RAVALLI S, SZABOLCS M, ALBALA A, MICHLER RE, CANNON PJ: Increased immunoreactivity endothelin 1 in human transplant coronary artery disease. *Circulation* 1996, 94: 2096-2102.
22. SOLEZ K, AXELSEN RA, BENEDIKTSSON H, BURDICK JF, COHEN AH, COLVIN RB, CROKER BP, DROZ D, DUNNILL MS, HALLORAN PF, HÄYRY P, JENNETTE JC, KEOWN PA, MARCUSSEN N, MIHATSCH MJ, MOROZUMI K, MYERS BD, NAST CC, OLSEN S, RACUSEN LC, RAMOS EL, ROSEN S, SACHS DH, SALOMON DR, SANFILIPPO F, VERANI R, VON WILLEBRAND E, YAMAGUCHI Y: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993, 44: 411-422.
23. SOLEZ K, BENEDIKTSSON H, CAVALLO T, CROKER BP, DEMETRIS AJ, DRACHENBERG C, EMANCIPATOR S, FURNES PM, GABER LW, GIBSON IW, GOUGH J, GUPTA R, HALLORAN P, HÄYRY P, KASHGARIAN M, MARCUSSEN N, MASSY ZA, MIHATSCH MJ, MOROZUMI K, NORONHA I, OLSEN S, PAPANITRIU J, PAUL LC, PICKEN M, RACUSEN LC, RAMOS EL, RANDHAWA P, RAYNER DC, RUSH D, SANFILIPPO F, TASKINEN E, TRPKOV K, TRUONG L, YAMAGUCHI Y, YILMAZ S: Report of the Third Banff Conference on allograft pathology (july 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplantation Proc* 1996, 28: 441-444.
24. LARDELLI P, AGUILAR D, GOMEZ-MORALES M, ANTON I, NAVARRO N, MONTES A, ANDUJAR M, BUSTOS M, O'VALLE F, ANEIRO J, GARCIA DEL MORAL R: Presence of cytomegalovirus genome and leukocyte subsets in renal transplant biopsies. Relationship with prognosis. *Path Res Pract* 1994, 190: 142-150.
25. BUSTOS M, GOMEZ MORALES M, MONTES A, NAVARRO N, AGUILAR D, GARCIA DEL MORAL R: Valoración clínica, histopatológica e inmunohistoquímica en biopsias renales postrasplante. *Rev Esp Trasp* 1993, 2: 198-204.
26. MAIN IW, ATKINS RC: The role of T-cells in inflammatory kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1995, 4: 354-358.
27. KRENSKY AM: T cells in autoimmunity and allograft rejection. *Kidney Int* 1994, 45: S50-S56.
28. HOLTER W: Regulation of interleukin 4 production and interleukin 4-producing cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1992, 98: 273-278.
29. AZUMA H, CHANDRAKER A, NADEAU K, HANCOCK WW, CARPENTER CB, TILNEY NL, SAYEGH MH: Blockade of T cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93: 12439-12444.
30. BAHADORI L, MILDER J, GOLD L, BOTNEY M: Active macrophage-associated TGF-beta colocalizes with type-I procollagen gene-expression in atherosclerotic human pulmonary arteries. *Am J Pathol* 1995, 146: 1140-1149.
31. NATHAN CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987, 79: 319-326.
32. NORONHA IL, WEIS H, HARTLEY B, WALLACH D, CAMERON JS, WALDHERR R: Expression of cytokines, growth factors and their receptor in renal allograft biopsies. *Transplant Proc*. 1993, 25: 917-918.
33. COHEN AH, NAST CC: TGF-beta in renal allograft rejection. *Miner Electrolyte Metab* 1998, 24: 197-201.
34. MOSES HL, YANG EY, PIETENPOL JA: TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990, 63: 245-247.
35. PARALKAR VM, VUKICEVIC S, REDDI AH: Transforming growth factor β type I binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Develop Biol* 1991, 143: 303-308.
36. MOORADIAN DL, LUCAS RC, WEATHERBEE JA, FURCHT LT: Transforming growth factor- β 1 binds to immobilized fibronectin. *J Cell Biochem* 1989, 41: 189-200.
37. ANDRES JL, STANLEY K, CHEIFERTZ S, MASSAGUE J: Membran-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol* 1989, 109: 3137-3145.
38. BARNARD JA, LYONS RM, MOSES HM: The cell biology of transforming growth factor- β . *Biochem Biophys Acta* 1990, 1032: 79-87.
39. HILL DJ, STRAIN AJ, ELSTROW SF, SWENNE I, MILNER RDG: Bifunctional action of transforming growth factor- β on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1986, 128: 322-328.
40. KHANNA A, LI BG, STENZEL KH, SUTHANTHIRAN M: Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor β -dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation* 1994, 57: 577-582.
41. DEAN DC, NEWBY RF, BOURGEOIS J: Regulation of fibronectin biosynthesis by dexamethasone, transforming growth factor beta and cAMP in human cell lines. *J Cell Biol* 1988, 106: 2159-2170.
42. CLARK RA: Wound repair. *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1: 1000-1008.

43. FRISKH SM, CLARK EJ, WERB Z: Coordinate regulation of stromelysin and collagenase genes determined with cDNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 2600-2604.
44. ALEXANDER CM, WERB Z: Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1989, 1:974-982.
45. LEBMAN DA, NOMURA DY, COFFMAN RL, LEE FD: Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type β -induced isotype switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 3962-3966.
46. KURIHARA H, YOSHIZUMA M, SUGIYAMA T, TAKAKU F, YANAGISAWA M, MASAKI T, HAMAOKI M, KATO H, YAZAKI Y: Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 159: 1435-1440.
47. SHIN GT, KHANNA A, DING R, SHARMA VK, LAGMAN M, LI B, SUTHANTHIRAN M: In vivo expression of transforming growth factor-beta 1 in humans: stimulation by ciclosporine. *Transplantation* 1998, 15: 313-318.
48. SHARMA VK, BOLOGAR M, XU GP, LI BG, MOURADIAN J, WANG J, SERUR D, RAO V, SUTHANTHIRAN M: Intra-graft TGF-Beta(1) messenger-RNA. A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996, 49: 1297-1303.
49. SHIHAB FS, BENNETT WM, TANNER AM, ANDOH TP: Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* 1997, 64: 1829-1837.
50. FINE LG, NORMAN JT: Renal growth responses to acute and chronic injury: Routes to therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 1992, 3: 206-211.
51. DESMOULIÈRE A, GEINZ A, GABBIANI F, GABBIANI G: Transforming growth factor- β 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993, 122: 103-111.
52. WATSCHINGER B, SAYEGH MH, HANCOCK WW, RUSSELL ME: Up-regulation of endothelin 1 messenger RNA and peptide expression in rat cardiac allograft with rejection and arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1995, 146: 1065-1072.
53. FORBES RDC, CERNACEK P, ZHENG SX, GOMERSALL M, GUTTMANN RD: Increased endothelin expression in a rat cardiac allograft model of chronic vascular rejection. *Transplantation* 1996, 61: 791-797.
54. WATSCHINGER B, VYCHYTAL A, ATTAR M, WAGNER D, SCHULLER M, HARTTER E, ULRICH W: Pattern of endothelin immunostaining during rejection episodes after kidney transplantation. *Clin Nephrol* 1994, 41: 86-93.
55. MULDOON LL, PRIBNOW D, RODLAND KD, MAGUN BE: Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and anchorage-independent growth of rat-1 fibroblasts through of protein kinase C-dependent mechanism. *Cell Regul* 1990, 1: 379-390.
56. MAASS A, GROHE C, KUBISCH C, WOLINIK B, VETTER H, NEYSES L: Hormonal induction of an immediate-early gene response in myogenic cell lines. A paradigm for heart growth. *Eur Heart J* 1995, 16: 12-14.
57. LOPEZ-FARRE A, RIESCO A, ESPINOSA G, DIGIUNI E, CERNADAS MR, ALVAREZ V, MONTON M, RIVAS F, GALLEGU MJ, EGIDO J, CASADO S, CAMELO C: Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 1993, 88: 1166-1171.
58. YOUNG BA, BURDMANN EA, JOHNSON RJ, ALPERS CE, GIAVICHELLI CM, ENG E, TAKESHI A, BENNETT WM, COUSER WG: Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1995, 48: 439-448.
59. SERON D, DIAZ-GALLO C, GRYNÓ JM, CASTELAO M, CARRERA J, BOVER J: Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991, 23: 1267-1269.
60. GUARDA E, KATWA LC, MYERS PR, TYAGI SC, WEBER KT: Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993, 27: 2130-2134.
61. KAHALEH MB: Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum* 1991, 34: 978-983.
62. UGUCCIONI M, PULSATELLI L, GRIGOLO B, FACCHINI A, FASANO L, CINTI C, FABBRI M, GASBARRINI G, MELICONI R: Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 1995, 48: 330-334.
63. GRIEFF M, LOERTSCHER R, ALSHOHAIB S, STEWART DJ: Cyclosporine induced elevation in circulating endothelin-1 in patients with solid organ transplantation. *Transplantation* 1993, 56: 880-884.
64. GARCIA DEL MORAL R, ANDUJAR M, O'VALLE F: Mecanismos de nefrotoxicidad por ciclosporina A a nivel celular. *Nefrología* 1995, 15 (supl. 1): 55-60.
65. KON V, HUNLEY TE, FOGO A: Combined antagonism of endothelin A/B receptors links endothelin to vasoconstriction whereas angiotensin II effects fibrosis. Studies in chronic nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 1995, 60: 89-95.
66. FUJISAKI H, ITO H, HIRATA Y, TANAKA M, HATA M, LIN MH, ADACHI S, AKIMOTO H, MARUMO F, HIROE M: Natriuretic peptides inhibit angiotensin-II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 1995, 96: 1059-1065.
67. KIRK AD, JACOBSON LM, HEISEY DM, FASS NA, SOLLINGER HW, PIRSCH JD: posttransplant diastolic hypertension: associations with intra-graft transforming growth factor-beta, endothelin, and renin transcription. *Transplantation* 1997, 64: 1716-1720.
68. BIEDLER JL, RIEHM, H: Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970, 30: 1174-1184.
69. UEDA K, CLARK DP, CHEN CJ, RONINSON IB, GOTTESMAN MM, PASTAN IH: The human multidrug-resistance (mdr1) gene: cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 1987, 262: 505-508.
70. HIGGINS CF: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992, 8: 67-113.
71. GOTTESMAN MM, PASTAN IH: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993, 62: 385-427.

72. UEDA K, OKAMURA N, HIRAI M, TANIGAWARA Y, SAEKI T, KIOKA N, KOMANO T, HORI R: Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992, 267: 24248-24252.
73. TWENTYMAN PR: Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem Pharmacol* 1992, 43: 109-117.
74. SCHINKEL AH, WAGENAAR E, VAN DEEMTER L, MOL CA, BORST P: Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995, 96: 1698-1705.
75. ERNEST S, RAJARAMAN S, MEGYESI S, BELLO-RAUSS EN: Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. *Nephron* 1997, 77: 284-289.
76. CORDON-CARDO C, O'BRIEN JP, CASALS D, BERTINO JR, MELAMED MR: P-glycoprotein expression in human tumors and normal tissues. *J Histochem Cytochem* 1990, 38: 1277-1281.
77. GUPTA S, KIM CH, TSURUO T, GOLLAPUDI S: Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol* 1992, 12: 451-458.
78. DRACH D, ZHAO S, DRACH J, MAHADEVIA R, GATTRINGER C, HUBER H, ANDREEFF M: Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistance phenotype. 1992, 80: 2729-2734.
79. WITKOWSKI JM, MILLER RA: Increased function of P-glycoprotein in T-lymphocyte subset of aging mice. *J Immunol* 1993, 150: 1296-1306.
80. SCHUETZ EGS, FURUYA KN, SCHUETZ JD: Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 275: 1011-1018.
81. ANDUJAR M, NAVARRO N, RAMIREZ C, GOMEZ-MORALES M, REVELLES F, ESTEBAN R, OSUNA A, O'VALLE F, GARCIA-CHICANO MJ, GARCIA DEL MORAL R: Influence of salt intake on Gp-P expression in rat lymphocytes treated chronically with cyclosporin A. En: *Current and future directions for clinical flow cytometry*. Garcia del Moral, R., Revelles, F, y O'Valle, F. Eds. DL GR-675-95. 1995, pp 226-227.
82. KEMNITZ J, UYSAL A, HAVERICH A, HEUBLEIN B, COHNERT TR, STANGEL W, GEORGH A: Multidrug resistance in heart transplant patients: a preliminary communication on a possible mechanism of therapy-resistant rejection. *J Heart Lung Transplant* 1991, 10: 201-210.
83. YOUSEM SA, SARTORI D, SONMEZ-ALPAN E: Multidrug resistance in lung allograft recipients: possible correlation with the development of acute and chronic rejection. *J Heart Lung Transplant* 1993, 12: 20-26.
84. MOEZZI DM, BOWERS MC, LARSEN DF: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in heart-transplant recipients. Role of a multidrug-resistant transporter in transplant rejection. *J Invest Med* 1996, 44: A157-A157.
85. ZANKER B, BARTH C, MENGES AV, LAMMERDING P, STACHOWSKI J, BALDAMUS CA: Expression of the multidrug resistance gene *mdr1* in peripheral blood mononuclear cells from Cyclosporine-treated renal transplant recipients rejecting their graft. *Transplantation Proc* 1995, 27: 925-926.
86. GÖTZL M, WALLNER J, GSURZÖCHBAUER S, KOVARIK J, BALCKE P, PIRKER R: *mdr1* gene expression in lymphocytes of patients with renal transplants. *Nephron* 1995, 69: 227-280.
87. JETTE L, BEAULIEU E, LECLERC JM, BELIVEAU R: Cyclosporine A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and others tissues. *Am J Physiol* 1996, 39: F756-F765.
88. DEL MORAL RG, ANDUJAR M, RAMIREZ C, GOMEZ-MORALES M, MASSEROLI M, AGUILAR M, OLMO A, ARREBOLA F, GUILLEN M, GARCIA-CHICANO MJ, NOGALES FF, O'VALLE F: Chronic cyclosporin A nephrotoxicity, P-glycoprotein overexpression, and relationships with intrarenal angiotensin II deposits. *Am J Pathol* 1997, 151: 1705-1714.
89. BENNETT WM, DEMATTOS A, MEYER MM, ANDOH T, BARRY JM: Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 1996, 50: 1089-1100.
90. DEL MORAL RG, OLMO A, AGUILAR M, O'VALLE F: P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 1998, 6:89-97.
91. ERNEST S, BELLO-REUSS E: P-glycoprotein functions and substrates: possible roles of MDR1 gene in the kidney. *Kidney Int* 1998, 65 (Suppl): S11-S17.