

**ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS
GENES TRANSFORMING GROWTH FACTOR-
 β_1 , ENZIMA DE CONVERSIÓN DE LA
ANGIOTENSINA, Y Par1/Emk1 COMO
MARCADORES MOLECULARES PARA EL
DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA NEFROPATÍA
CRÓNICA DEL TRANSPLANTE**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado 34424

“Investigació en fisiopatología general de la malaltia”

Bienio 1994-1996

Miguel Hueso Val

Directores

Dr. Josep M. Grinyó Boira

Dr. Daniel Serón Micas

Universidad de Barcelona

Departamento de Medicina

ÍNDICE GENERAL

I	Introducción	5
II	Hipótesis	60
III	Objetivos del estudio	62
IV	Trabajos publicados	65

- Serón D, Moreso F, Ramón JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castela AM, Alsina J, Grinyó JM: **Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy.** Transplantation 69;1849-1855, 2000.
- Moreso F, Lopez M, Vallejos A, Giordani C, Riera L, Fulladosa X, Hueso M, Alsina J, Grinyó JM, Serón D: **Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts.** Am J Transplant. 1:82-8,2001.
- Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM: **Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies.** Kidney Int. 61: 727-733, 2002.
- Hueso M, Navarro E, Moreso F, Beltrán-Sastre V, Ventura F, Grinyó JM, Serón D: **Relationship between subclinical rejection and genotype, renal mRNA and plasma protein TGF- β_1 levels.** Transplantation. En tramite para su publicación.
- Hueso M, Bover J, Espinosa L, Moreso F, Serón D, Cañas C, Raulf F, Blanco A, Gil-Vernet S, Carreras M, Castela AM, Grinyó JM, Alsina J: **TGF- β_1 gene expression in protocol biopsies from patients with stable renal allograft function.** Transplant Proc. 33 :342-4, 2001.
- Hueso M, Alía P, Moreso F, Beltrán-Sastre V, Riera L, González C, Navarro MA, Grinyó JM, Navarro E, Serón D: **Angiotensin Converting Enzyme Genotype and Chronic Allograft Nephropathy in Protocol Biopsies.** J. Am. Soc. Nephrol. 15:2229-2236, 2004.
- Hueso M, Beltran V, Moreso F, Ciriero E, Fulladosa X, Grinyó JM, Serón D, Navarro E: **Splicing alterations in human renal allografts: detection of a new splice variant of protein kinase Par1/Emk1 whose expression is associated with an increase of inflammation in protocol biopsies of transplanted patients.** Biochim. Biophys. Acta (Molecular Basis of Disease) 1689:58-65, 2004.

ÍNDICE GENERAL

V	Resultados	73
VI	Discusión de los resultados	88
VII	Conclusiones	103
VIII	Bibliografía	106
IX	Glosario de términos	128
X	Agradecimientos	134

I INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La Medicina del siglo XXI se encuentra inmersa en una época de rápidos cambios tecnológicos que tienen un impacto sobre la sociedad cada vez más inmediato. La revolución terapéutica y el constante progreso de la medicina desde la Segunda Guerra Mundial ha cambiado la percepción que sobre la salud tiene la sociedad y ha disminuido el miedo a la enfermedad (1). En este progreso ha participado la Tecnología sanitaria, que tiene por objetivo la aplicación de la ciencia y el conocimiento a la mejora de la calidad de vida. En esta revolución tecnológica hay que destacar la Biotecnología, que ha contribuido de forma espectacular al diagnóstico y a la terapéutica, y la llamada cirugía de sustitución cuyo ejemplo más llamativo es el transplante de órganos sólidos. Además, la amplia difusión en los medios de comunicación de sus logros y expectativas ha provocado que su demanda social sea imparable, y ha contribuido a que la sociedad occidental del siglo XXI considere que no existe un “imposible” para la ciencia, la técnica y la medicina.

Sin embargo, la Biotecnología, que consiste en el empleo de células vivas para la obtención de productos útiles, no es una nueva tecnología, sino una de las más antiguas, y ya había sido utilizada desde tiempos remotos en la fabricación, por ejemplo, de vino o queso. No obstante, en los últimos años ha presentado un espectacular desarrollo desde el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por James Dewey Watson (1928-) y Francis Harry Compton Crick (1916-2004) (2) y el posterior nacimiento de nuevas disciplinas científicas, como la biología molecular y la genómica (término propuesto en 1987 por Thomas Roderick del Jackson Laboratory de Bar Harbor, en Maine, USA). Es importante subrayar que la biología molecular, en palabras del mismo William Thomas Astbury (1898-1961) “padre” del término biología molecular, “implica no tanto una técnica como una estrategia. Un abordaje desde el punto de vista de las llamadas ciencias básicas, con el objetivo principal de investigar las bases de las manifestaciones a gran escala de la biología clásica, en la medida que responden a un plan molecular. Tiene que ver, en particular, con las formas de las moléculas biológicas, y con la evolución, explotación y diversificación de aquellas formas en el ascenso hasta niveles, más y más altos, de organización. La biología molecular es predominantemente tridimensional y estructural, lo

que no significa, sin embargo, que sea un mero refinamiento de la morfología. Debe indagar al mismo tiempo, en la génesis y en la función” (3). De la fusión de conocimientos procedentes de la biología molecular y celular, de la genética e informática (bioinformática) surge la genómica.

A diferencia de la genética, que está centrada en el estudio de alteraciones en genes individuales y en su herencia, la genómica se ocupa del estudio de las funciones y relaciones entre los genes del genoma, incluyendo en su perspectiva la interacción con los factores ambientales (4). Los nuevos conocimientos que proporciona la genómica son importantes para intentar explicar los mecanismos patogénicos de la mayor parte de las enfermedades comunes y han contribuido a la consolidación de la Medicina Molecular (5).

1. MEDICINA MOLECULAR

La medicina molecular considera la enfermedad como resultado de una patología molecular (entendida como proceso biofísico y bioquímico), y pretende la aplicación de los métodos de la biología molecular a la práctica clínica. Está basada en el estudio de los componentes moleculares que determinan la función celular para caracterizar la expresión génica aberrante y las interacciones moleculares anómalas. El propósito es comprender la enfermedad, obtener el diagnóstico y dirigir el tratamiento a escala molecular, y no a sus consecuencias fenotípicas.

La medicina molecular ha significado un relevante progreso en el campo de la medicina al transformar el carácter empírico de la práctica médica en uno científico y representa la unificación de las tres mentalidades (la anatomoclínica, la fisiopatológica, y la etiopatológica) que a lo largo del siglo XIX pretendían explicar científicamente la enfermedad (6). El término Medicina Molecular fue acuñado por Heinrich Schade (1876-1935) en un libro titulado “Die Molekularpathologie der Entzündung. Ihre Bedeutung für das Krankheitsverstehen und Krankheitskeim. Eine Einführung für Studierende und Ärzte” (“La patología molecular de la inflamación. Su importancia para comprender la enfermedad

INTRODUCCIÓN

y el germen patógeno. Una introducción para estudiantes y médicos”), para referirse al papel de la química y la física en la patología. Sin embargo, el punto de partida del concepto de enfermedad molecular se deben a los estudios de Archibald E. Garrod (1857-1936) sobre la alcaptonuria (producida por el acumulo de alcapción o ácido homogentístico) y otras metabolopatías congénitas (7). Garrod interpretó que algunas enfermedades se debían a la ausencia o ineficiencia de la enzima que, en condiciones normales, cataliza un paso metabólico determinado, y cuya falta de actividad originaba el acumulo de un compuesto intermedio. Este defecto enzimático dependía de la alteración de un gen específico. Garrod tenía claro el sistema definido por “un gen, una enzima, una reacción química”, sin embargo la idea no prosperó (8). En 1941 George W. Beadle (1903-1989) y Edward L. Tatum (1909-1975), retomaron la idea, que evolucionó hasta el concepto “un gen, una enzima”. Estos autores propusieron que: 1) todos los procesos bioquímicos están bajo control genético, en todos los organismos; 2) cada vía metabólica se compone de una serie de reacciones químicas; 3) cada reacción química está bajo control de un determinado gen; y 4) una sola mutación génica puede alterar la capacidad de una célula para realizar una determinada reacción química (8). Beadle y Tatum recibieron el premio Nóbel de Fisiología en 1958, “por su descubrimiento que los genes actúan regulando acontecimientos químicos definidos”.

Un hecho crucial en la consolidación de la medicina molecular fue la publicación en 1949 por Linus Pauling (1901-1994) de un artículo titulado “Sickle cell anemia, a molecular disease” que tuvo un fuerte impacto porque demostró cómo la ciencia básica puede solucionar problemas médicos (9). En este trabajo se mostró que la causa de una enfermedad podía atribuirse a una alteración en la estructura molecular de una proteína, abriendo la posibilidad que otras muchas enfermedades pudieran explicarse de esta manera. Además, al tratarse de una enfermedad hereditaria, se apuntaba que los genes determinaban la estructura de las proteínas.

Finalmente, hay que destacar de una manera especial la revolución que ha supuesto

INTRODUCCIÓN

en la medicina molecular el proyecto Genoma Humano por el impacto científico, mediático y social alcanzado (10). Aunque oficialmente comenzó el 1 de Octubre de 1990, sus inicios se sitúan en 1985, por iniciativa de Robert Sinsheimer (director del campus de Santa Cruz de la Universidad de California) y Charles de Lisi (director de la Oficina de Salud y Medio Ambiente del Departamento de Energía de Estados Unidos) que convocaron a expertos europeos y americanos para analizar las posibilidades de un proyecto que perseguía determinar la secuencia de pares de bases del ADN humano. Aunque la naturaleza del proyecto es fundamentalmente tecnológica, hay que destacar su enorme potencial práctico. La gran cantidad de información que encierra el genoma permitirá acelerar el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades. El logro principal del proyecto Genoma humano ha sido la determinación en su casi totalidad de la secuencia del genoma humano, construyendo un mapa físico que localiza de forma correlativa los genes en los cromosomas. Además, se han desarrollado otros proyectos con el objetivo de secuenciar genomas de otros organismos con interés científico y/o económico, como por ejemplo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la bacteria *Escherichia coli*, el gusano *Caenorhabditis elegans*, la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), el mosquito *Anopheles gambiae*, el pez fugu (*Fugu rubripes*), el perro (*Canis familiaris*), la rata (*Rattus norvegicus*), el ratón (*Mus musculus*), el chimpancé (*Pan troglodytes*), y así hasta casi un centenar de organismos. Este proyecto de genómica comparada recupera los valores de la anatomía, la fisiología y la bioquímica comparada clásica. Desde este punto de vista, la comparación de secuencias sirve, entre otras cosas, para establecer correlaciones entre proteínas (por ejemplo entre oncogenes y factores de crecimiento), para caracterizar funcionalmente productos de los genes (por ejemplo, en un gen de función aún desconocida la identificación de un motivo estructural característico de una determinada función), y servir de base para la predicción de estructuras de proteínas, sobretodo de su estructura tridimensional. Desde 1998 el proyecto Genoma dedicó sus esfuerzos a establecer las variaciones de la secuencia del ADN entre individuos y al desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias para estudiar la función de los genes dentro del genoma. En este sentido, el conocimiento de las diferencias genéticas entre poblaciones e individuos podría contribuir

a establecer patrones de susceptibilidad a la enfermedad, o de respuesta al tratamiento y ha permitido el nacimiento de la medicina predictiva, la medicina individualizada y la farmacogenómica.

2. MEDICINA PREDICTIVA

La medicina molecular ha modificado no sólo la perspectiva que se tiene de la enfermedad por parte del enfermo y del médico, sino también el pronóstico ya que se han identificado genes asociados con la susceptibilidad a diferentes enfermedades, y ha contribuido a la aparición de la medicina predictiva. Con anterioridad a esta nueva medicina el pronóstico se ha basado en probabilidades, fundamentadas en estudios epidemiológicos y expresadas en términos estadísticos. Sin embargo, las pruebas que surgen de la medicina molecular van más allá de la probabilidad epidemiológica, porque informan de personas que poseen variantes génicas que confieren un riesgo innato a padecer cierta enfermedad, permitiendo una medicina individualizada. El conocimiento de un substrato genético favorecedor de la enfermedad, podría ser utilizado como marcador diagnóstico o pronóstico para establecer estrategias en la prevención de enfermedades en individuos y en poblaciones de riesgo. Esta actitud nos enlaza con la tradición médica de orientación fisiopatológica del siglo XIX, reflejada en palabras de Ottomar Rosenbach (1851-1907) en 1878, “la misión del médico no consiste en diagnosticar un estado irreparable, esto es, una lesión anatómica ya constituida, sino en conocer tempranamente la génesis del padecimiento, el comienzo del proceso, la “*functio laesa*” del órgano; ...”(6), y representa un reconocimiento a la medicina galénica que ya observó que existía el “organismo vulnerable” (*aitía proegoumené*) sobre la que actuaría la causa externa (*aitía prokatartiké*) de la enfermedad, dando lugar a la causa conjunta (*aitía synektiké*), esto es, a la más temprana fase de alteración de ese organismo que la anatomía patológica clásica ha llamado “lesión anatómica” (6).

Este substrato genético individual que confiere vulnerabilidad o resistencia reside en el genoma. Considerando que el genoma humano está formado por más de 3.000 millones de nucleótidos, y que la similitud de genomas entre dos personas no emparentadas es del

INTRODUCCIÓN

99,9%, las diferencias entre dos personas son de menos de un millón de pares de bases. La naturaleza de esta diversidad radica en variaciones en la secuencia de ADN (polimorfismos), que incluyen inserciones o pérdidas de nucleótidos, diferencias en el número de secuencias repetidas, y los llamados polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms o SNPs), que consisten en la presencia de diferentes nucleótidos en una misma posición de la secuencia de ADN (10,11). Además, hay que tener en cuenta que varias proteínas pueden derivar de un mismo gen debido a variaciones en el ensamblaje de los exones en la cadena de ARN mensajero, a través de un mecanismo llamado splicing alternativo (11). Estas variaciones dan una gran plasticidad al genoma permitiendo que este sea único para cada persona.

En la actualidad hay un gran interés en el estudio de los SNPs como marcadores moleculares diagnósticos o pronósticos. Los SNPs reflejan mutaciones ancestrales, de forma que dos individuos que comparten un mismo alelo están marcados por una herencia evolutiva común. Se estima que existe un SNP por cada 300-500 nucleótidos y un total de 6,4-10,6 millones de SNPs. La mayor parte de los SNPs se encuentran en regiones que no codifican proteínas. Sin embargo, los más interesantes son los que se localizan en regiones codificantes o exones (cSNPS) porque son los que con más probabilidad podrían alterar la función biológica del gen, modificando la producción de la proteína, su transporte, su activación o su afinidad por el receptor. Se calcula que existen unos 2.000 cSNPs, y se considera que serían los responsables de gran parte de la diversidad humana, y de su diferente predisposición a la enfermedad. La importancia de los SNPs ha determinado la constitución de un grupo internacional, “The International SNP Map Working Group”, que ha identificado unos 1,4 millones de SNPs. Además, grupos de SNPs localizados próximos en el mismo cromosoma se heredan en bloque, denominándose haplotipo al patrón de SNPs de un bloque. De forma independiente al número de SNPs que contenga el bloque sólo unos pocos, conocidos como “tag SNPs”, son suficientes para identificar un haplotipo. Recientemente se ha realizado un mapa de haplotipos (The International HapMap Project) con el objetivo de establecer patrones de variación en la secuencia de ADN del genoma

humano. Este mapa permitirá, utilizando los “tag SNPs”, buscar en el genoma de una forma rápida aquellas variaciones que se asocien con enfermedades (12).

Por otro lado, también hay que resaltar los mecanismos de splicing alternativo, que permiten obtener varias proteínas a partir de un único gen (de aproximadamente 30.000 genes que consta el genoma humano derivan unas 100.000 proteínas) (4). Este proceso permite una rápida adaptación celular ante estímulos externos. El proceso de splicing puede alterarse por mutaciones o polimorfismos en las secuencias que controlan la correcta eliminación de los intrones, en el que sólo se afectaría un gen, o por desequilibrio entre los factores que lo regulan, en el que se afectaría la expresión de varios genes a la vez (13).

La medicina predictiva ha recibido críticas y se le reprocha que identifique individuos sanos que no necesitan tratamiento, aunque posean susceptibilidad a ciertas enfermedades. Es decir, establece un nuevo grupo de individuos llamado “prepacientes”, que tendrían una relación especial con el mundo médico porque estarían obligados a un seguimiento hasta que se manifieste la enfermedad. Esta situación provocaría estrés psicológico en el paciente y tendría un importante impacto económico en los servicios de salud (14,15). Además, hay que tener en cuenta que esta susceptibilidad no significa que finalmente se manifieste la enfermedad, porque también influyen otros genes que podrían tener un efecto protector, además de otros factores como los psicológicos, sociales o ambientales. Esta incertidumbre y complejidad en establecer el pronóstico exacto tiene implicaciones éticas de cara a la información que se le ofrece al paciente.

La Comisión Europea en reconocimiento del interés que tiene la Medicina Predictiva propuso un proyecto que llevaba por título “Medicina Predictiva: Análisis del Genoma Humano” (5). El objetivo era “proteger a los individuos de aquellas enfermedades a las que son más vulnerables por predisposición genética y, cuando se estime adecuado, prevenir la transmisión de las características genéticas que confieren tales susceptibilidades”. Este proyecto, que se ajustaba a las directrices de la política europea basadas en la mejora de la calidad de vida de los ciudadanos y que contribuía indirectamente a la reducción de los

costes de la factura sanitaria y de forma directa fortalecía las bases científicas y tecnológicas, tropezó con la oposición del Parlamento Europeo. Las causas de este rechazo fueron los antecedentes históricos sobre el impacto que la genética había tenido en políticas sociales, como el movimiento eugenésico en Estados Unidos y Europa a principios del siglo XX que degeneró en políticas de esterilización y en los campos de exterminio (6).

3. TRANSPLANTE RENAL

El Transplante de órganos ha supuesto una gran revolución terapéutica que ha permitido curar pacientes con lesiones crónicas irreversibles y ha contribuido a la confianza de la sociedad en la tecnología. Se ha recorrido un largo camino en poco tiempo. Desde los primeros trabajos de Frank Macfarlane Burnet (1915-1985) y Peter Brian Medawar (1915-1987) sobre tolerancia inmunológica adquirida (16) que les valió el premio Nóbel de Medicina en 1960, hasta el primer trasplante renal realizado en el Hospital Bent Brigham de Boston por el equipo del doctor Joseph Edward Murray. Un joven de 23 años, Richard Herrick, recibió un riñón de su hermano gemelo el 23 de Diciembre de 1954, y Joseph E. Murray (1919-) recibió el premio Nóbel de Medicina en 1990 por sus descubrimientos relativos al tratamiento de trasplantes de órganos y células en seres humanos (compartido con Edward Donnall Thomas). En España hay que destacar el primer trasplante renal de cadáver realizado por los doctores Josep Maria Gil-Vernet y Antoni Caralps en el Hospital Clinic de Barcelona el 23 de Julio de 1965, a un joven de 20 años, José Sayago. En la actualidad casi cualquier órgano es susceptible de ser transplantado. Se ha conseguido transplantar con éxito el pulmón (James Hardy en Junio de 1963 al paciente John Rusell), el corazón (Christiaan Barnard el 3 de Diciembre de 1967 al comerciante Louis Washkaknsky), el páncreas (Richard Lillehei de Minneapolis en 1967), el hígado (Thomas E. Starzl en 1968), la medula ósea (Edward Donnall Thomas en 1970), el intestino delgado (John Fung en 1990), la córnea, e incluso varios órganos de forma simultanea (6,17).

La historia del transplante de órganos ha sido una lucha constante contra el fenómeno del rechazo, y su éxito ha corrido paralelo a la llegada de una nueva clase de fármacos, los

INTRODUCCIÓN

inmunosupresores. El primero de ellos fue la azatioprina, un derivado de la 6-mercaptopurina que interfiere en la síntesis de ADN y que fue desarrollado por Gertrude Elion (1918-1999) y George Hitchings (1905-1998), por lo que recibieron el premio Nobel en 1988. Sin embargo, ha sido la llegada de la ciclosporina (péptido derivado del hongo *Tolypocladium inflatum*), un inhibidor de la calcineurina, a principios de los años 80, la que ha permitido la expansión y popularización del trasplante de órganos (18).

La supervivencia de los injertos renales en el primer año después del trasplante aumentó del 89% en 1988 al 94% en 1996 cuando el injerto procedía de un donante vivo, y del 76,7% al 88% en el caso de donante cadáver (19). Esta mejoría se ha atribuido a la disponibilidad de fármacos inmunosupresores más potentes y a un mejor manejo clínico del rechazo agudo. Los datos del año 2001 de la UNOS (“United Network for Organ Sharing”) indicaron que esta mejoría continuó, situando la supervivencia del injerto al año del trasplante en el 95% para el donante vivo y en el 89% para el donante cadáver, y a los cinco años en el 76% y en el 61%, respectivamente. Del mismo modo, en Cataluña en el año 2002 la supervivencia del injerto un año después del trasplante fue del 93% (20). Esta mejoría se ha acompañado de un aumento proporcional en la vida media del injerto, que ha pasado en los receptores de donante vivo de 12,7 años en 1988 a 21,6 años en 1996, y en el caso del donante cadáver de 7,9 a 13,8 años (19). En Cataluña se ha observado una disminución en el riesgo de pérdida del injerto después del primer año del trasplante que ha pasado de 5,7% personas/año en el período 1990-1997 a 3,2% personas/año en el período 1998-2000 (20). Sin embargo, es importante resaltar que la vida media de los injertos de donante cadáver sólo mejoró en aquellos que no sufrieron rechazo agudo. Además, en un estudio americano reciente (“Scientific Registry of Transplant Recipients”) con datos de 62.103 pacientes receptores de un primer trasplante renal entre el año 1995 y el 2000, se observó que la mejora en la supervivencia descrita para el período 1988-1996 no se mantiene y permanece sin cambios desde el año 1995. En este estudio, en contra de lo esperado, la supervivencia global del injerto no aumentó, a pesar de constatar una reducción en el porcentaje de rechazos agudos (21). Sin embargo, los autores sugieren que este

fenómeno se debe, en parte, al mayor porcentaje de casos en que la función renal sólo se recuperó parcialmente después del rechazo agudo, aunque también proponen otras posibles explicaciones, como el mayor porcentaje de donantes y receptores “subóptimos”, los efectos de la sobreinmunosupresión con el mayor riesgo de infecciones oportunistas, como el BK-poliomavirus, y el cambio en el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento respecto al período anterior.

Las principales causas de pérdida del injerto renal son la llamada nefropatía crónica del trasplante (NCT) y la muerte del paciente, que conjuntamente resultan en una tasa de pérdida anual del 3-5% (19,20). Sin embargo, hasta la fecha ningún fármaco ha demostrado ser efectivo para prevenir o estabilizar la progresión de la NCT (22). En consecuencia, es necesario obtener un diagnóstico precoz y conocer los mecanismos moleculares causantes de la NCT para poder establecer nuevas estrategias terapéuticas y de prevención. Para conseguir este doble objetivo es necesario obtener una muestra de tejido renal mediante la realización de una biopsia, técnica que se ha convertido en imprescindible.

4. LA BIOPSIA RENAL

La biopsia renal percutánea es una técnica básica en nefrología, y junto con la diálisis y el trasplante contribuyó a la aparición de la especialidad a principios de los años 60. La biopsia renal percutánea fue introducida por Nils Alwall (1906-1986) en 1944 utilizando la aguja de punción-aspiración hepática de Iversen-Roholm (23,24). Sin embargo sólo desde 1949, gracias a la experiencia de Poul Iversen y Claus Brun en Copenhague, se ha convertido en una técnica fundamental en la práctica clínica. Desde los comienzos, la realización de la biopsia ha tenido detractores, que dudaban que la información ofrecida pudiera cambiar el diagnóstico clínico (25). No obstante, hoy en día se considera indiscutible su utilidad para el diagnóstico cuando se realiza precozmente y para evaluar los efectos del tratamiento, aunque se reconocen sus limitaciones cuando la biopsia se realiza tardíamente y la lesión renal está muy avanzada (26). Por otro lado, la técnica ha ido evolucionando con objeto de mejorar la rentabilidad diagnóstica y reducir los riesgos para el

INTRODUCCIÓN

paciente. Así, desde la aguja de punción-aspiración de Iversen-Roholm con el paciente en posición sentada y utilizando la radiología para localizar el riñón, se pasó a la aguja de Vim-Silverman (utilizada por primera vez en 1950 en Cuba por el patólogo Antonio Pérez-Ara) con el paciente en decúbito prono y utilizando la insuflación de aire alrededor del riñón para localizarlo. Seguidamente apareció el celebre tru-cut® (Figura 1), que es un dispositivo formado por una cánula, una porta-cánula, un estilete y un porta-estilete. La punta de la cánula está cortada en bisel, y el otro extremo está unido a la porta-cánula, que tiene una entrada para que pueda introducirse el estilete para la toma de biopsias. La punta del estilete (trocar) está cortada en bisel para facilitar la penetración en los tejidos. Posteriormente a esta aguja se le ha añadido un mecanismo de disparo automático (27). En la década de los 70 para localizar el riñón se utilizó una punción previa con aguja fina, pero hoy en día se utiliza el control ecográfico consiguiendo que se trate de un procedimiento seguro. La prueba de la

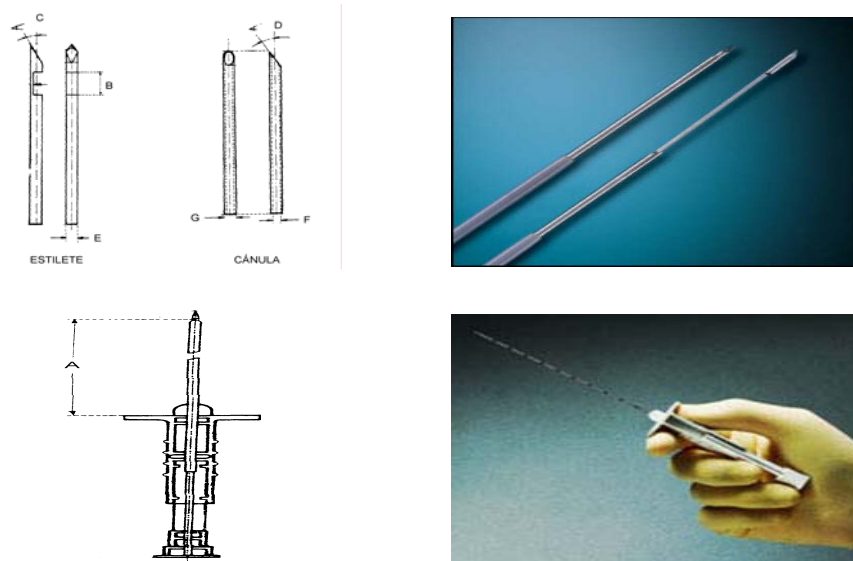


Figura 1. Aguja de biopsia tipo Tru-cut®.

La aguja consta de un dispositivo formado por una cánula, una porta-cánula, un estilete y un porta-estilete. La punta de la cánula está cortada en bisel, y el otro extremo está unido a la porta-cánula, que debe tener una entrada para que pueda introducirse el estilete para la toma de biopsias. La punta del estilete (trocar) está cortada a bisel para facilitar la penetración en los tejidos.

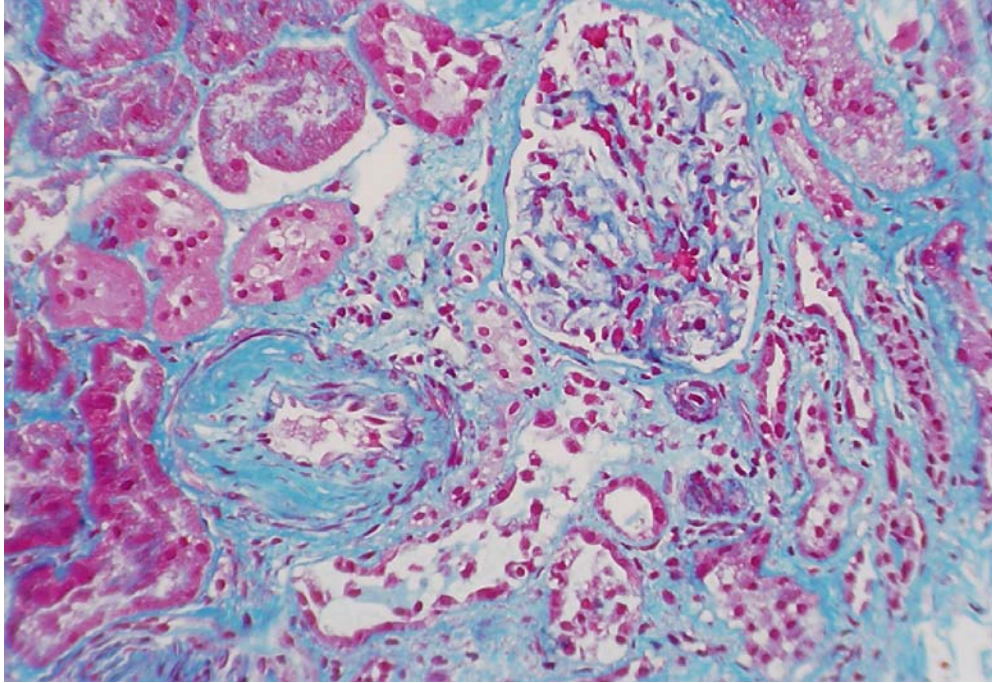
seguridad de la técnica se confirmó un estudio multicéntrico europeo sobre 2.127 biopsias de protocolo en población transplantada donde se registró la pérdida de sólo un injerto y 3 casos de hemorragias graves (28).

La lesión histológica es casi siempre, más que la causa real de la enfermedad, una consecuencia tardía de ella. Esta forma de pensar representa una prolongación de la mentalidad fisiopatológica de la segunda mitad del siglo XIX, constituyendo lo que Pedro Laín-Entralgo ha llamado la “fisiopatologización de la anatomía patológica clásica” (6). En consecuencia, para obtener un diagnóstico precoz se buscan las alteraciones iniciales, previas a la aparición de la lesión, que constituyen la respuesta inmediata a la agresión. En el trasplante renal, para el diagnóstico precoz de la NCT, ha tenido una contribución muy importante la biopsia renal precoz protocolizada en pacientes asintomáticos.

5. NEFROPATÍA CRÓNICA DEL TRASPLANTE (NCT)

La NCT es la causa más frecuente del fracaso de los injertos una vez transcurrido el primer año después del trasplante, excluyendo la muerte del paciente. En la actualidad representa el 57,4% de las pérdidas del injerto (19,20). Se prefiere utilizar el término NCT al de rechazo crónico (RC), ya que este último presupone un origen inmunológico, y en la actualidad se considera que en su patogenia participan también factores no-inmunológicos.

La NCT es una enfermedad degenerativa que desde el punto de vista clínico se caracteriza por un deterioro progresivo de la función renal, habitualmente asociada a proteinuria e hipertensión arterial. Desde el punto de vista histológico la lesión se define, según los criterios propuestos en 1991 por la Sociedad Internacional de Nefrología reunida en la ciudad canadiense de Banff, por presentar fibrosis en el intersticio, atrofia tubular, lesiones vasculares que ocluyen su luz y glomeruloesclerosis (Figura 2) (29,30). Se han establecido 3 grados (leve, moderado y severo) dependiendo del área de la biopsia que muestra fibrosis y atrofia tubular. De este modo se define que un injerto presenta NCT leve



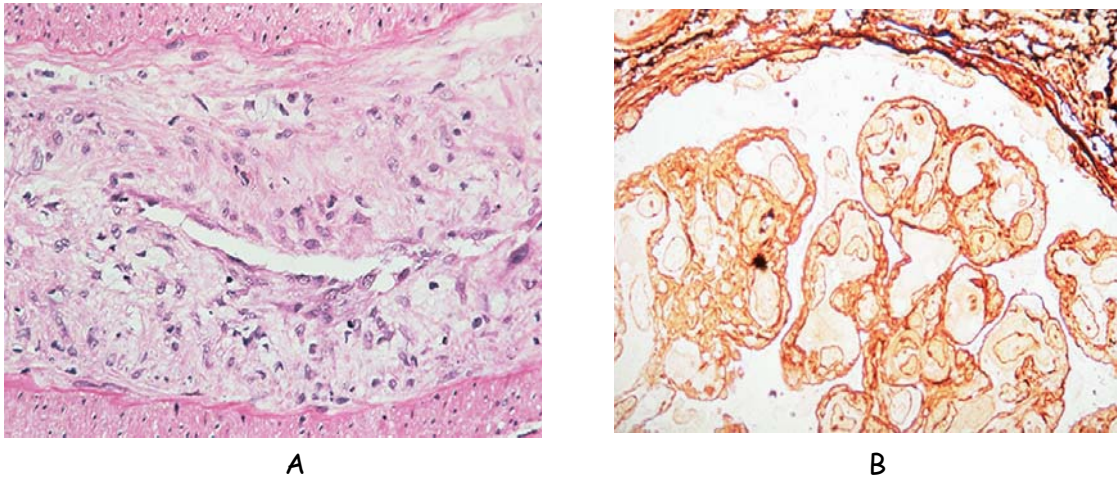
Mannon RB. Eighth Banff Conference. 2005

Figura 2. Biopsia renal con nefropatía crónica del trasplante.

En esta biopsia se observa la presencia de fibrosis intersticial, atrofia tubular, una lesión vascular caracterizada por un engrosamiento de la íntima que ocluye su luz y lesiones glomerulares. En el glomérulo presenta una proliferación mesangial y unas paredes capilares engrosadas. Tinción mediante tricrómico de Masson. X 100.

cuando la lesión ocupa entre 6 y el 25% de la superficie cortical, NCT moderada cuando ocupa entre el 26 y el 50% y NCT severa cuando esta afectado más del 50%.

Para poder establecer el diagnóstico de RC, definido como proceso de origen inmunológico, tienen que cumplirse dos criterios (Figura 3) (30): 1) presentar una lesión arterial caracterizada por la proliferación o engrosamiento de la íntima (neointima) acompañada de un infiltrado linfocitario, y de la fragmentación de la elástica; y 2) presentar una duplicación de las membranas basales en los capilares glomerulares (glomerulopatía crónica del trasplante). También se pueden encontrar algunas lesiones que sugieren un



Racusen LC. Eighth Banff Conference. 2005

Figura 3. Biopsia renal con lesiones histológicas de rechazo crónico.

A) lesión arterial con engrosamiento de la íntima que ocluye la luz vascular, acompañada de un infiltrado linfocitario. Tinción con hematoxilina-eosina. X 400. B) Glomerulopatía crónica del trasplante. Puede observarse la duplicación de las membranas basales de los capilares glomerulares. Tinción periodic acid-Schiff. X 400.

rechazo crónico mediadas por anticuerpos, como: 1) la presencia de neutrófilos y/o células mononucleadas en los capilares peritubulares y/o glomérulo, y/o trombosis capilar; 2) la arteritis intimal, necrosis fibrinoide y la inflamación intramural o transmural de las arterias; 3) la tinción lineal con C4d y/o detección de inmunoglobulinas en los capilares peritubulares; y 4) el deposito de inmunoglobulinas y complemento en áreas de necrosis fibrinoide (31).

A modo de conclusión, desde el punto de vista histológico se pueden distinguir dos tipos de NCT dependiendo si existe afectación vascular: a) NCT con daño túbulo-intersticial crónico sin lesión vascular, y b) NCT con daño túbulo-intersticial crónico y vasculopatía del trasplante o rechazo crónico. Esta clasificación tiene importancia dado que el rechazo crónico implica un peor pronóstico (32).

5.1 HISTORIA NATURAL DE LA NEFROPATÍA CRÓNICA DEL TRANSPLANTE

La historia natural de la NCT ha podido ser establecida recientemente (33,34). Utilizando biopsias seriadas de protocolo se ha observado la progresión de las lesiones renales, y se han identificado los factores de riesgo que intervienen en su desarrollo. De este modo se han establecido dos fases. En una primera fase, en el primer año después del transplante, la lesión está localizada a nivel túbulo-intersticial, y está asociada a lesiones de isquemia-reperfusión, rechazo agudo y rechazo subclínico. Posteriormente, en una segunda fase, a partir del año del transplante, aparecen lesiones localizadas en vasos (hialinosis arteriolar) y glomérulos (glomerulosclerosis). Estas lesiones se asocian a nefrotoxicidad por el uso de fármacos inhibidores de la calcineurina. También se ha demostrado que la presencia de una lesión aguda a los 3 meses postransplante se correlaciona con las lesiones crónicas a los 12 meses (35). Así, la aparición de signos de rechazo subclínico a los 3 meses (el rechazo subclínico presenta una incidencia del 24% en las biopsias de protocolo practicadas a los 3 meses) se asocia a un engrosamiento de la íntima entre los 3 y los 12 meses. Del mismo modo, hay que señalar que las lesiones crónicas observadas a los 3 meses, como el engrosamiento crónico de la íntima y la lesión tubular, se correlacionan con las lesiones presentes a los 12 meses, demostrando que su medida es reproducible y que sus variaciones no se deben a un error de muestreo como resultado de haber realizado la biopsia en dos zonas distintas del riñón. Por otro lado, la fibrosis intersticial muestra una escasa correlación indicando que su evaluación es poco precisa. En este sentido, utilizando los criterios de Banff que establece el diagnóstico de NCT sí existe atrofia tubular y la fibrosis intersticial ocupa más del 5% de la biopsia, se ha estimado que en el 25% de los casos se produce un error sistemático en el diagnóstico de la NCT (36). Finalmente, respecto a las variables clínicas se ha observado que el aumento de la proteinuria es el primer signo de progresión en las lesiones crónicas, mientras que la concentración sérica de creatinina y el filtrado glomerular calculado tardan más en modificarse (36).

5.2 ETIOLOGÍA DE LA NEFROPATÍA CRÓNICA DEL TRANSPLANTE

Hasta el momento la causa de la NCT sigue siendo desconocida, aunque se ha sugerido que es multifactorial (22). A continuación revisaremos los factores de riesgo para el desarrollo de la NCT, las hipótesis propuestas para explicar su patogenia, los mecanismos moleculares responsables de sus lesiones y la base genética que explicaría la variabilidad individual en la aparición de la NCT.

5.2.1. Factores de riesgo de la nefropatía crónica del transplante.

La NCT se ha asociado a factores de origen inmunológico y no inmunológico. Hay que destacar que esta división es de carácter más bien académica, porque factores no mediados por antígenos como la muerte cerebral del donante, el síndrome de isquemia-reperusión, y la función retrasada del injerto, activan mecanismos inflamatorios inespecíficos y contribuyen a la respuesta inmunológica (22). La conjunción de causas de origen inmunológico y no inmunológico explicaría porque es tan difícil el manejo de la NCT.

Factores de riesgo inmunológico.

En la actualidad se considera que los fenómenos inmunológicos tienen un papel fundamental en la etiología de la NCT, ya que se ha observado que ambos están firmemente asociados. Los factores de riesgo descritos son los siguientes:

1-El rechazo agudo.

Varios estudios epidemiológicos han identificado el rechazo agudo como el factor de riesgo más importante de NCT. La vida media estimada de los injertos procedentes de cadáver es 6,6 años si han sufrido rechazo agudo y 12,5 años en los casos que no lo ha presentado (19). En este mismo sentido, de 1988 a 1996 se ha mantenido el riesgo relativo (RR) de pérdida del injerto después del primer año del transplante en los casos con rechazo agudo, mientras que en los casos sin rechazo agudo se ha reducido un 6,3 % por año (19). Además, en la década de los 90 ha disminuido la incidencia de rechazo agudo, aunque ha

INTRODUCCIÓN

aumentado su impacto en el desarrollo de la NCT (37). Así, el riesgo relativo de NCT tras un episodio de rechazo agudo fue de 1,67 de 1992-1993 y de 5,2 de 1996-1997. Una posible explicación a este fenómeno es que el rechazo agudo producido bajo una inmunosupresión potente es más grave.

Sin embargo, no todos los injertos que sufren rechazo agudo terminan desarrollando NCT. El riesgo de desarrollar NCT depende del tipo, severidad, número y del tiempo después del trasplante en que se produce el rechazo. Tienen peor pronóstico el rechazo agudo vascular, los injertos que presentan varios episodios de rechazo agudo y los casos cuando el injerto no recupera la función renal después del rechazo (21). También, se ha observado que el rechazo agudo tardío (definido como aquel que se presenta a partir de los 3 meses del trasplante) tiene mayor riesgo de desarrollar NCT que los que ocurren en los 3 primeros meses (22). Así, se ha observado que la supervivencia del injerto, excluyendo los casos en que se perdió el injerto por otras causas que no fueran NCT, fue del 94% en los pacientes sin rechazo agudo, del 86% para el rechazo agudo precoz, y del 45% para el rechazo agudo tardío (22). No obstante, se desconoce si los episodios de rechazo agudo tardío que aparecen como resultado de una reducción en la inmunosupresión tienen el mismo riesgo de progresar a NCT que aquellos que aparecen bajo dosis normales de inmunosupresión. Finalmente, hay que destacar el impacto del rechazo subclínico en el desarrollo de la NCT. En un estudio reciente con 120 pacientes y biopsias de protocolo secuenciales durante 10 años se demostró que los injertos con rechazo subclínico desarrollaban con mayor frecuencia NCT (33).

Por otro lado, aún no se ha podido demostrar que con más inmunosupresión, tanto dosis mayores como inmunosupresores más potentes, sea posible prevenir el desarrollo de NCT. En este sentido, hay que recordar el efecto nefrotóxico de algunos inmunosupresores, como los anticalcineurínicos, y el efecto del exceso de inmunosupresión en la aparición de infecciones virales oportunistas como el BK-poliomavirus, que pueden enmascarar el efecto de la inmunosupresión en la patogenia de la NCT. En la actualidad la aparición de nuevos

inmunosupresores no nefrotóxicos, como el micofenolato mofetil (MMF), y el sirolimus o el bloqueo de las señales de coestimulación del linfocito T están permitiendo el diseño de pautas de inmunosupresión sin anticalcineurínicos (38-42). Algunos de los resultados publicados muestran una reducción en la incidencia de NCT en la biopsia de protocolo (42-44). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido demostrar una mejoría en la supervivencia del injerto debido a la falta de un seguimiento suficiente.

2- Incompatibilidad HLA (Human Leukocyte Antigens).

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o “Major Histocompatibility Complex”), son las principales dianas de la respuesta alloinmune. En los seres humanos los genes MHC reciben el nombre de HLA, y constan de dos clases: clase I formado por los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, y clase II formado por los genes HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. En el trasplante clínico los genes más importantes son el HLA-A, -B y -DR. Se ha observado que la compatibilidad HLA repercute sobre la supervivencia del injerto. En el registro de la UNOS se ha observado que la supervivencia a los 10 años de los injertos con identidad HLA-A, -B y -DR (definida como similitud en los 6 antígenos, o en sólo dos antígenos de un mismo locus, o bien la ausencia de incompatibilidades) fue de un 52% en comparación con el 37% en los casos sin ninguna identidad (45). Además, los antígenos de clase I del MHC (HLA-A y -B) forman grupos con reactividad cruzada (CREG o “Cross- reactive groups”). Según los datos de la UNOS se ha observado que el riesgo de rechazo crónico es un 62% mayor en los pacientes con incompatibilidad para grupos CREG (22). Sin embargo, se desconoce si este efecto es independiente del rechazo agudo (46,47). Además, el número de incompatibilidades HLA no se ha asociado con la NCT en las biopsias de protocolo (48).

3-Sensibilización.

La detección de anticuerpos anti-HLA previos al trasplante se han asociado con un mayor riesgo de rechazo crónico (22,49). Esta sensibilización se puede adquirir durante el embarazo, por transfusiones de sangre o por trasplantes previos fracasados. El porcentaje de

anticuerpos anti-HLA se determina mediante una técnica llamada panel de anticuerpos reactivos (PAR) que consiste en contactar suero del paciente con una serie de linfocitos normales representativos de los HLA mayoritarios en la población.

La detección de anticuerpos anti-HLA de clase I y clase II se asoció con una peor supervivencia a los 3 años (65%), especialmente en los pacientes con 3 o más incompatibilidades HLA (HLA-A + HLA-B + HLA-DR) (50). Sin embargo los pacientes con anticuerpos anti-HLA exclusivamente de clase I o clase II mostraban la misma supervivencia que los pacientes que no presentaban anticuerpos (50,51).

Recientemente se ha analizado el impacto de los anticuerpos no-HLA pretransplante en la supervivencia estudiando injertos procedentes de gemelos HLA idénticos (49). Estos pacientes no presentan anticuerpos anti-HLA del donante, y un PAR positivo se interpreta como la existencia de anticuerpos contra antígenos no-HLA. En este estudio se observó que los injertos de los pacientes con PAR=0 presentaban una supervivencia a los 10 años del 72,4%, mientras que los pacientes con un PAR=<50% y PAR>50% mostraban una supervivencia del injerto del 63,3%, y 55,5% respectivamente.

4- Rechazo humoral.

La detección de anticuerpos anti-HLA del donante y el depósito de C4d (fragmento del componente C4 de la vía clásica del complemento) en los capilares peritubulares de las biopsias con NCT han subrayado la importancia de la lesión humoral en su patogenia (52-55). En un trabajo con 120 pacientes receptores de un transplante renal no sensibilizados, se observó que un año después del transplante el 24,2% de los pacientes tenían anticuerpos específicos frente al donante (53). Los pacientes con anticuerpos anti-HLA del donante presentaban un riesgo 5-6 veces superior para el desarrollo de NCT y pérdida del injerto con respecto a los pacientes en los que no se detectaron estos anticuerpos. Además, los pacientes sin antecedentes de rechazo agudo pero con anticuerpos perdían el injerto en mayor proporción (18,2%) que los pacientes con antecedentes de rechazo agudo pero sin anticuer-

pos (8,3%). El mayor riesgo de pérdida del injerto se producía cuando al antecedente de rechazo agudo se añadían la presencia de anticuerpos. Por otro lado el 77% de los episodios de rechazo agudo y crónico ocurren sin detectarse anticuerpos circulantes anti-HLA en el momento del rechazo (56). Sin embargo se ha observado que todos los pacientes con rechazo crónico habían tenido previamente anticuerpos circulantes anti-HLA, sugiriendo que en el momento del rechazo los anticuerpos pueden encontrarse secuestrados en el tejido inflamado y no detectarse en la circulación (57).

El depósito de C4d también se ha vinculado con el rechazo crónico (54). Se sabe que el C4d es un marcador sensible de rechazo agudo humoral, y se asocia con anticuerpos circulantes anti-HLA del donante. En un estudio sobre 28 biopsias con rechazo crónico se observó depósito de C4d en el 61% de los casos en comparación con sólo el 2% en los controles (54). Además, el 88% de los pacientes con C4d en la biopsia desarrollaron anticuerpos frente al donante. Sin embargo, aunque las lesiones histológicas fueron similar para los grupos C4d- y C4d+, la supervivencia del injerto un año después fue más prolongada en el grupo C4d+ (65% vs 25%). Este efecto paradójico posiblemente se debe a un cambio en el tratamiento inmunosupresor en el grupo C4d+ (de CsA y azatioprina pasó a tacrolimus y MMF). Finalmente, también se ha observado en biopsias seriadas que en la mayoría de los casos el depósito capilar de C4d precedía al desarrollo de la glomerulopatía del transplante.

5-Inmunosupresión sub-óptima o abandono del tratamiento.

Se ha sugerido que una dosis insuficiente de inhibidores de la calcineurina (<5 mg/kg/día al año del transplante) aumenta el riesgo de NCT (52). Además se ha observado que la retirada de esteroides y CsA aumenta el riesgo de rechazo agudo y crónico (58,59). También el incumplimiento del tratamiento inmunosupresor representa un mayor riesgo de perder el injerto por NCT (60).

Factores de riesgo no-inmunológicos de la nefropatía crónica del trasplante.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que también existen factores de riesgo de NCT de origen no-inmunológico que conducen a la pérdida de la masa renal. Algunos autores consideran que estos factores contribuyen a la progresión de la NCT, pero no a su desarrollo (22). Entre estos factores hay que destacar los siguientes:

1-Edad del donante y del receptor.

Los riñones añosos presentan unas lesiones histológicas similares a las observadas en la NCT, y se considera a la edad del donante como un factor de riesgo independiente de rechazo crónico (22). Además se asocian con una peor supervivencia del paciente y del injerto, especialmente cuando se sobreañaden otros factores (22,61). El riesgo relativo de pérdida del injerto, censurando los pacientes fallecidos, es 1,38 para donantes de 45-59 años y 1,93 para donantes >60 años. Sin embargo algunos autores ponen en duda que se trate de un factor de riesgo independiente de supervivencia del injerto, ya que observan que los injertos que no han sufrido rechazo agudo tienen el mismo pronóstico a los 5 años que los riñones procedentes de donantes jóvenes (62).

La edad del receptor también se ha asociado con el desarrollo de la NCT, e influye en la supervivencia del injerto y del paciente (63). El riesgo relativo de pérdida del injerto por cualquier causa es de 1,34 para los receptores de más de 60 años (63). Por otro lado, se sabe que los receptores más jóvenes tienen una mayor respuesta aloinmune y son los que con más frecuencia no toman de forma adecuada la medicación. En consecuencia, algunos autores han observado que esta edad es un factor de riesgo de pérdida del injerto (22).

2-Tipo de donante.

Los injertos procedentes de donantes vivos no emparentados tienen mejor supervivencia que los receptores de injertos procedentes de cadáver, incluso en el caso que estos últimos tengan un mayor grado de compatibilidad HLA. Sin embargo las diferencias en la supervivencia sólo son evidentes en los pacientes que han sufrido un episodio de

rechazo agudo (22). En un grupo de 588 pacientes (326 receptores de un injerto de cadáver y 260 receptores de donante vivo) con rechazo agudo, se observó una pérdida de injerto por NCT en el 30% de los receptores de donante cadáver respecto a sólo un 16% en el donante vivo (22).

3- Diferencias de tamaño entre donante y receptor.

Los riñones de mayor tamaño tienen proporcionalmente mayor capacidad de filtración que los pequeños, aunque esto no quiere decir que tengan un número mayor de nefronas. En este sentido, se ha sugerido que el implante de un riñón pequeño en un paciente de gran superficie corporal crearía un desequilibrio entre la demanda metabólica del receptor y el número de nefronas aportado. Este desequilibrio conduciría a la hiperfiltración de las nefronas disponibles y a la NCT. En consecuencia, el cociente entre el peso del injerto y el peso del receptor se ha considerado un buen índice pronóstico, ya que se ha observado una menor supervivencia del injerto cuanto mayor es la diferencia de peso entre el injerto y el receptor (64). En el Servicio de Nefrología del Hospital de Bellvitge se llevó a cabo un estudio que confirma esta hipótesis y en el que se observó que la superficie corporal del receptor es un factor pronóstico independiente de retraso en la función del injerto, y se asociaba con mayor HTA y mayor creatinina sérica a los 12 meses después del trasplante (65). Una situación similar se produce en los riñones procedentes de mujeres. Así se ha observado un riesgo de pérdida del injerto de 1,15 en mujeres receptoras de un riñón de mujer y de 1,22 para hombres receptores de un riñón de mujer (66).

4- Síndrome isquemia-reperfusión y función retrasada del injerto.

La muerte cerebral y el tiempo de isquemia fría (TIF) aumentan el riesgo de necrosis tubular aguda (NTA) y el retraso en la recuperación de la función del injerto (definida como necesidad de hemodiálisis en la primera semana). El efecto del TIF sobre la supervivencia del injerto se observa con tiempos >24 h, con un riesgo de pérdida del injerto censurando la muerte del paciente de 1,12 entre 25-36 horas y de 1,2 para TIF >36 horas (67). Por otro lado, algunos estudios observan que el retraso en la recuperación de la función del injerto es

un factor de riesgo de rechazo agudo, aunque no está asociado independientemente con el rechazo crónico (22). Sin embargo, el registro de la UNOS analizando 89.000 trasplantes de donante cadáver observó que el retraso en la recuperación de la función del injerto sí se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de rechazo crónico (22).

5- Fármacos nefrotóxicos.

El tratamiento a largo plazo con inhibidores de la calcineurina (CsA o tacrolimus) causa lesiones histológicas similares a las observadas en la NCT, y se ha sugerido que está asociado con su patogenia (68). En la actualidad la aparición de nuevos fármacos no nefrotóxicos ha permitido el diseño de pautas de inmunosupresión sin anticalcineurínicos y se ha observado que se asocian con una menor incidencia de NCT en la biopsia de protocolo (38-42, 44).

6-Hipertensión (HTA).

La lesión más característica de la NCT es la proliferación miointimal en las arterias, y de alguna manera, esta lesión vascular recuerda a la arteriosclerosis, sugiriendo que podrían compartir los mismos factores de riesgo. La HTA promueve tanto la arteriosclerosis como la hipertensión glomerular que conduce a la esclerosis glomerular. Estudios epidemiológicos observan una supervivencia del injerto menor en los pacientes hipertensos, aunque no se conoce si este efecto es independiente de la función renal (69). Además, tanto la hipertensión sistólica como la diastólica al año del trasplante son predictores de la supervivencia del injerto. Sin embargo, no hay estudios prospectivos y randomizados que exploren si la disminución agresiva de la HTA tiene un efecto protector sobre la aparición de NCT (70).

7-Dislipemia.

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo independiente para la pérdida del injerto por NCT en hombres con rechazo agudo previo, y está asociada con la lesión vascular del injerto en biopsias de protocolo (22,32). Por otro lado se han observado

depósitos de colesterol LDL en el intersticio renal que pueden contribuir al desarrollo de fibrosis (22). En el trasplante cardíaco se ha demostrado en ensayos clínicos controlados y randomizados que los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa disminuyen la severidad de la vasculopatía del injerto (71). Finalmente, también la hipertrigliceridemia se ha correlacionado con la supervivencia del injerto en algunos estudios (22).

8-Radicales libres de oxígeno.

Los productos finales de la glucólisis (AGE), el estrés oxidativo y los radicales libres de oxígeno están implicados en la patogénia de la arteriosclerosis y en la progresión de la enfermedad renal. También están aumentados en la NCT de forma independiente al grado de insuficiencia renal y podrían participar en la lesión endotelial y en la vasculopatía de la NCT (72).

9-Tabaquismo.

El tabaco reduce el flujo plasmático renal, probablemente por un aumento en la síntesis de vasoconstrictores como la endotelina y por una reducción en la síntesis de vasodilatadores como el óxido nítrico (22). Se ha sugerido que podría tener un efecto perjudicial sobre la vasculopatía del injerto y contribuir a la NCT (73). En este sentido se sabe que los fumadores tienen un riesgo relativo de pérdida del injerto de 2,3 censurando los pacientes fallecidos, y que además este factor es independiente de los episodios de rechazo agudo (22).

10- Hiperhomocisteinemia.

La homocisteína podría tener un efecto lesivo sobre las células endoteliales vasculares, y están aumentados sus niveles en los pacientes transplantados (74). Sin embargo, la insuficiencia renal es una causa conocida de aumento en los niveles de homocisteína. Hasta el momento no hay datos sobre el impacto que tendría la reducción de los niveles de homocisteína en la supervivencia del injerto.

11-Infecciones.

Se ha demostrado que la inflamación y algunas infecciones participan en la patogenia de la arteriosclerosis (75). Así, en un modelo animal la infección por citomegalovirus aumenta la intensidad y prolonga la duración de la inflamación del injerto y contribuye a la aparición precoz de NCT (76).

12-Proteinuria.

La proteinuria a los 12 meses del trasplante es un importante factor de riesgo para la pérdida del injerto por NCT, y aproximadamente el 66% de los pacientes con proteinuria presentan NCT en la biopsia (22). Sin embargo, aunque la proteinuria puede ser secundaria a la NCT, en modelos animales se ha observado que por sí misma provoca lesiones túbulo-intersticiales en el injerto (77). La reabsorción de proteínas en el túbulo proximal causa la liberación de mediadores de la inflamación por las células epiteliales, y contribuye a las lesiones intersticiales y a la NCT.

5.2.2 Hipótesis patogénicas de la nefropatía crónica del trasplante.

La NCT se caracteriza por una acumulación de matriz extracelular que causa fibrosis intersticial, esclerosis glomerular e hiperplasia de la íntima vascular. Esta lesión histológica es la manifestación tardía de la enfermedad. Sin embargo el origen de la enfermedad sigue siendo desconocido, aunque se han formulado varias hipótesis.

1-Hipótesis del origen inmunológico de la nefropatía crónica del trasplante.

Se ha sugerido que la NCT es el resultando de una inflamación crónica debida a la reacción alioimmune, tanto de origen celular como humoral. La intensidad de la inflamación depende del balance entre la inmunogenicidad del injerto, la respuesta del receptor y el nivel de inmunosupresión. El resultado de esta inflamación es la producción de citoquinas relacionadas con la síntesis y degradación de la matriz extracelular, causando una fibrosis excesiva (22). Sin embargo, esta teoría no excluye que en la progresión de la lesión contribuyan factores no-inmunológicos.

INTRODUCCIÓN

Esta hipótesis está basada en datos epidemiológicos y en evidencias clínicas y experimentales. Muchos de los factores de riesgo identificados se relacionan con la activación del sistema inmunológico. Además, los injertos con NCT expresan más moléculas de adhesión celular que los injertos sin NCT, presentan un infiltrado por macrófagos y linfocitos T y depósitos de inmunoglobulinas y complemento (78). Estas inmunoglobulinas consisten en anticuerpos dirigidos frente a antígenos HLA y no-HLA. Dentro de los antígenos no-HLA cabe destacar los localizados en la lamina basal glomerular y tubular o aquellos procedentes de las células mesangiales o endoteliales expuestos durante la lesión tisular (22). También se ha demostrado que la inmunización con antígenos del donante acelera la NCT. Los anticuerpos anti-donante estimulan la proliferación celular y el desarrollo de la arteriosclerosis del trasplante. Todos estos datos sugieren una inflamación de origen inmunológico. Por el contrario, manipulaciones del sistema inmunológico con el objetivo de inducir tolerancia inhiben el desarrollo de NCT (79). En el ámbito experimental se ha observado que los animales que carecen de linfocitos B, linfocitos CD4+ o macrófagos no desarrollan NCT (78,80). Finalmente, en un modelo animal de NCT se ha observado que sólo la lesión vascular y la gloméruloesclerosis son consecuencia de la reacción aloinmune, mientras que las lesiones túbulo-intersticiales se deben a la isquemia (81). La suma de la reacción inmune y de la isquemia aumenta el infiltrado celular, y las lesiones vasculares y túbulo-intersticiales.

En esta hipótesis se basan los intentos de inducir tolerancia al injerto. Aunque muchas estrategias han tenido éxito en roedores, los animales de mayor tamaño plantean más dificultades. En el campo de la clínica la inducción de tolerancia se ha conseguido con la asociación de trasplante renal y trasplante alogénico de médula ósea (82,83). También se ha descrito una larga supervivencia del trasplante renal con la administración conjunta de globulina antilinfocitaria y células de la médula ósea del donante, sin necesidad que estas se implanten en la médula del receptor (84,85). Otras estrategias consisten en bloquear las moléculas de coestimulación de los linfocitos T, utilizando por ejemplo inmunoglobulinas anti CTLA-4 (42, 86). Sin embargo, no se consigue una completa tolerancia ya que algunos

injertos desarrollan NCT asociada con la aparición de anticuerpos contra antígenos del donante.

2-Hipótesis del exceso de citoquinas como causa de la nefropatía crónica del trasplante.

Hay numerosas evidencias que las citoquinas son factores clave en el desarrollo de las enfermedades renales. Según esta hipótesis, la lesión repetida en un corto período de tiempo, independientemente que tenga un origen inmunológico o no-inmunológico, causaría una excesiva producción de citoquinas. Estas citoquinas, a su vez, producirían una respuesta inflamatoria caracterizada por un infiltrado de células mononucleares (87,88). Las células inflamatorias liberan también citoquinas que activan los fibroblastos y las células epiteliales renales. Además, producen quemoquinas que atraen a más células inflamatorias. Los fibroblastos experimentan un cambio fenotípico caracterizado por la expresión “de novo” de la α -actina de músculo liso cuya expresión está circunscrita a las células de la musculatura lisa vascular (a partir de este momento los fibroblastos reciben el nombre de “miofibroblastos”). Estos miofibroblastos proliferan y se encargan de sintetizar componentes de la matriz extracelular, formando cicatrices (89,90). Se ha comprobado que los fibroblastos procedentes de riñones con NCT sintetizan “in vitro” más colágeno que los procedentes de riñones sanos. También, los macrófagos intersticiales y las células epiteliales del túbulo renal contribuyen al depósito intrarrenal de colágeno (91). Por otro lado, se produce una disminución en la degradación de la matriz extracelular debido a un aumento en el número de inhibidores de las enzimas encargadas de la degradación de la matriz (metaloproteinasas) como el TIMP-1,-2,-3 (“tissue inhibitors of metalloproteinases”). Además, la modificación en la estructura de la nueva matriz depositada puede reducir su susceptibilidad a la degradación por las metaloproteinasas (92). Finalmente, cuando no se consigue la resolución del daño tisular, el estado de activación de los fibroblastos se perpetúa, produciéndose un desequilibrio entre la síntesis de la matriz extracelular y su degradación. En consecuencia, la progresión de la enfermedad renal se debería a una sobreproducción de matriz extracelular y a una disminución de su degradación.

3-Hipótesis de la alteración de la reparación tisular después de la lesión como causa de la nefropatía crónica del trasplante.

Esta hipótesis sostiene que la NCT es el resultado de una reparación defectuosa de la lesión renal (93). Los pacientes con NCT a menudo presentan anticuerpos contra las moléculas que participan en la reparación tisular. En modelos animales de rechazo crónico cardíaco se han observado anticuerpos contra biglicanos, decorina, moléculas de adhesión de las células mesangiales y contra las proteínas “heat-shock” (94). Los biglicanos y la decorina participan en la regulación de la actividad enzimática proteolítica, mientras que las proteínas “heat-shock” (traducidas como “proteínas de choque térmico”) participan en el plegamiento de proteínas intracelulares, protegiéndolas contra su degradación.

4-Hipótesis de la pérdida de la arquitectura de la matriz extracelular como causa de la nefropatía crónica del trasplante.

Otra hipótesis sugiere que la pérdida de la estructura tridimensional de la matriz extracelular sería la causa de la fibrosis intersticial (93). Los vasos sanguíneos pueden regenerarse después del daño tisular. Sin embargo, el túbulo no se regenera cuando se destruye la lamina basal tubular y las células tubulares renales sufren apoptosis o incluso en algunos casos transdiferenciación (transformación de células de estirpe epitelial a células mesenquimales) a fibroblastos (miofibroblastos). La transdiferenciación se cree que se induciría por factores de crecimiento como FGF-2 (“basic fibroblast growth factor”), EGF (“epithelial growth factor”) y TGF- β_1 y por el contacto directo de la célula con la matriz extracelular, especialmente con las fibras de colágeno tipo I (95). La fibrosis ocuparía el espacio tisular que no está ocupado por parénquima.

5-Hipótesis de la senescencia prematura como causa de la nefropatía crónica del trasplante.

Se ha sugerido que el continuo estrés que actúa sobre las células conduce a su envejecimiento prematuro, perdiendo su capacidad de reparar el tejido después de una lesión (96). Esta hipótesis propone que la fibrosis es el resultado de un agotamiento de las células después de soportar múltiples agresiones. Se sabe que las células somáticas en cultivo sólo

pueden dividirse un número limitado de veces (límite de Hayflick) convirtiéndose después en células seniles que irreversiblemente pierden determinadas capacidades, como la replicación y la generación de energía. Además, se ha observado que las lesiones del riñón añoso son similares a las de los injertos con NCT, por lo que podrían compartir el mismo mecanismo patogénico (22,96).

La célula senil presenta alteraciones en el citoesqueleto, cambios en la morfología de la célula, acortamiento de los telómeros, aumento en la expresión de genes supresores de tumores como el p16 y el p21, y aumento en la actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA β -gal). En el modelo experimental de trasplante de riñón de rata Fisher (F344) a rata Lewis se observó un aumento en la actividad de SA β -gal en los riñones con rechazo crónico, mientras que el acortamiento de los telómeros y la expresión de p16 y p21 se presentó en riñones con y sin rechazo crónico (22). Sin embargo, los cambios de senescencia sólo se encontraron en el compartimiento túbulo-intersticial de los injertos con rechazo crónico sugiriendo que otros mecanismos deben ser los responsables de las lesiones vasculares y glomerulares (22).

6-Hipótesis de la reducción de la masa renal como causa de la nefropatía crónica del trasplante.

El riñón transplantado está sometido a diversas agresiones que resultan en una reducción de la masa renal. Esta reducción en la masa renal provoca cambios hemodinámicos en las restantes nefronas como un aumento del flujo sanguíneo y de la hipertensión glomerular, favoreciendo la aparición de proteinuria y contribuyendo al desarrollo de la insuficiencia renal crónica (77,97,98). En consecuencia, se ha demostrado en un modelo de rata con NCT que la disminución mediante fármacos de la hipertensión glomerular reduce la proteinuria, preserva la estructura glomerular y mejora la supervivencia del injerto (99). Sin embargo, no se ha demostrado que la existencia de hipertensión glomerular sea suficiente para explicar la aparición de la NCT, aunque es un claro factor de progresión.

5.2.3. Mecanismos moleculares responsables de las lesiones de la nefropatía crónica del trasplante.

La NCT se caracteriza por el excesivo depósito de matriz extracelular. Con el objetivo de conocer su patogenia se buscan las alteraciones moleculares iniciales que constituyen la respuesta del injerto a la agresión, y que son responsables de la lesión histológica. Dentro de las vías moleculares propuestas se encuentran el factor de crecimiento transformante- β_1 (transforming growth factor- β_1 o TGF- β_1), y el sistema renina-angiotensina (SRA). Sin embargo también pueden contribuir otras proteínas no tan bien conocidas como la proteína-quinasa Par1/Emk1.

La vía del transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)

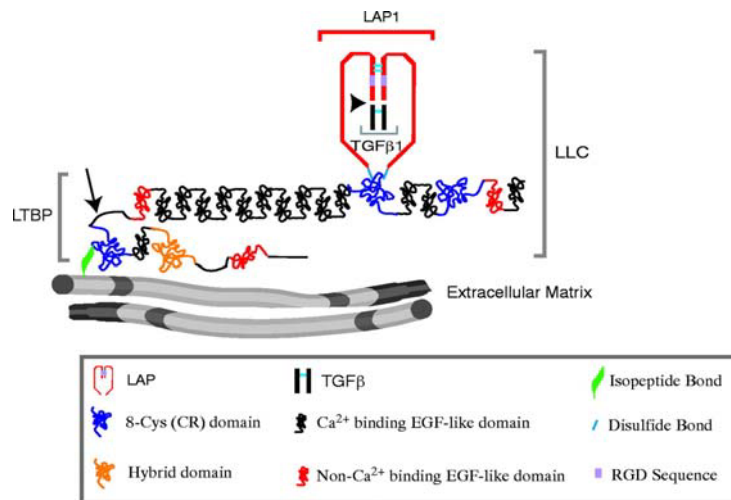
El TGF- β_1 es una citoquina multifuncional que regula un gran número de procesos celulares como la reparación tisular, la proliferación y diferenciación celular. De forma resumida se puede decir que posee una acción antiinflamatoria y fibrogénica (100). Las alteraciones en la regulación de la vía del TGF- β_1 se han relacionado con el desarrollo de numerosas enfermedades como el cáncer, la arteriosclerosis, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades caracterizadas por la sustitución del parénquima por tejido fibroso. El TGF- β_1 y sus receptores son ubicuos. Cualquier tipo celular (células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, neuronales, o las células del tejido conectivo) produce TGF- β_1 y tiene receptores para el propio TGF- β_1 (100).

El TGF- β_1 pertenece a una familia de factores de crecimiento (formada por más de 40 miembros entre los que están las “Bone morphogenetic proteins”, las inhibinas y las activinas) que comparten un grupo de residuos de cisteína (101). El TGF- β_1 activo está formado por 2 cadenas de 112 aminoácidos unidos por puentes de disulfuro (25 kDa).

La proteína del TGF- β_1 presenta varias modificaciones antes de ser activa. El TGF- β_1 se sintetiza como un precursor (pre-pro-TGF- β_1) de 391 aminoácidos formado por el péptido señal, el péptido LAP (“Latency-associated peptide”), y el TGF- β_1 maduro. En un primer

paso se libera del péptido señal (que comprende del codón 1 al codón 29) durante su tránsito a través del retículo endoplasmático. Posteriormente, debido a la acción de proteasas tipo furina, la cadena polipeptídica se corta a nivel del codon 279. Sin embargo, aún quedan unidos el péptido maduro (pro-TGF- β_1) y el péptido LAP por puentes no-covalentes, formando el llamado “complejo latente pequeño”(102). Este “complejo latente pequeño” se secreta al exterior de la célula y se une por puentes de disulfuro a la proteína LTBP (“latent TGF- β_1 -binding protein”) con el que forma un complejo latente de mayor tamaño quedando almacenado en la matriz extracelular (Figura 4). No se conoce con exactitud la función de LTBP pero podría facilitar la activación o contribuir a la estabilidad del complejo. En este estado latente el TGF- β_1 no puede unirse a su receptor y por lo tanto no puede activar la vía de señalización.

Complejo latente del TGF- β_1



Annes J.P. J Cell Sci. 116:217.2003

Figura 4. El complejo latente del TGF- β_1 .

El complejo latente largo (LLC o “Large latent complex”) esta formado por el TGF- β_1 maduro, el péptido LAP (“Latency-associated peptide”), y la proteína LTBP (“latent TGF- β_1 -binding protein”). El TGF- β_1 y el péptido LAP se separan por proteólisis en el punto indicado por la flecha, aunque persisten unidos por puentes no-covalentes. El péptido LAP y la proteína LTBP están unidos por puentes disulfuro. El complejo LLC esta unido de forma covalente a una proteína de la matriz extracelular que aún no se ha identificado.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la proteína del TGF- β_1 puede presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación (el precursor contiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación) y fosforilación que pueden influir en su actividad.

El mecanismo por el que el TGF- β_1 maduro se libera del complejo no es del todo bien conocido (102). Entre los activadores descritos se encuentran proteasas como la plasmina, y las metaloproteasas (MMP-2 y MMP-6), la trombospondina-1 (TSP-1), la integrina $\alpha_v\beta_6$, los radicales libres de oxígeno, y la acidosis (102,103). Así, en los casos de rechazo crónico se ha visto localizada la trombospondina-1 (TSP-1) junto al TGF- β_1 en la nueva matriz extracelular sintetizada, sugiriendo la presencia de áreas locales de activación del TGF- β_1 . Se ha propuesto que esta activación local podría ser más determinante para la aparición de fibrosis en el injerto renal que el grado de síntesis de la proteína inactiva (102).

Se conocen tres receptores para el TGF- β_1 . Los receptores tipo I y el tipo II son ser/thr quinasas, mientras que el tipo III es un betaglicano que tiene la función de presentar el TGF- β a los otros receptores. De esta forma, el TGF- β_1 activo se une directamente al receptor tipo II o de forma indirecta a través de la unión previa al receptor tipo III. Una vez activado el receptor tipo II, reclutará y fosforilará el receptor tipo I. Este complejo de receptores inicia la cascada de señalización intracelular (104).

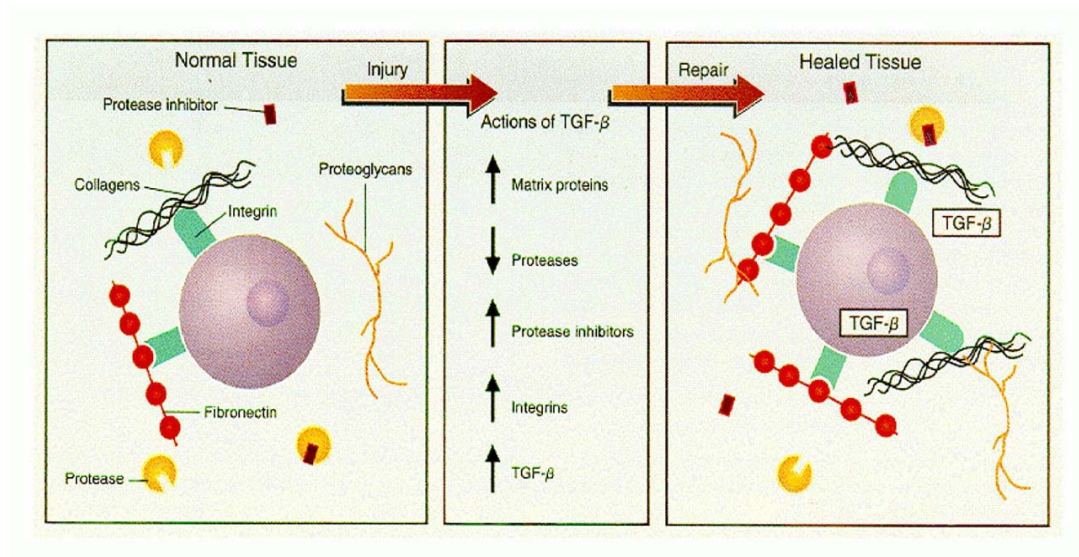
El efecto del TGF- β_1 depende de su concentración, de la duración del estímulo, del tipo y del estado de la célula sobre la que actúa (104). En general inhibe la proliferación (detiene el ciclo celular en fase G1), promueve la diferenciación celular y la apoptosis, regula el desarrollo embrionario, la reparación tisular y la angiogénesis (100). Se ha demostrado que el TGF- β_1 es imprescindible para la vida, ya que se ha observado que los ratones “knock-out” fallecen precozmente a causa de una inflamación sistémica (105). Por otro lado, las ratas con una sola copia del gen, aunque son fenotípicamente normales, frente a estímulos cancerígenos desarrollan neoplasias en hígado y pulmón con mayor frecuencia (100).

INTRODUCCIÓN

El TGF- β_1 posee dos funciones principales. Por una parte actúa como regulador del sistema inmunológico y de los fenómenos inflamatorios, y por otra estimula el depósito de matriz extracelular (107,108). El papel inmunomodulador y antiinflamatorio se debe a la supresión de la proliferación de monocitos, y linfocitos B y T, y al bloqueó de la adhesión al endotelio de neutrófilos y linfocitos T mediante la inhibición de la expresión de E-selectina y/o IL-8 (factor activador y quimiotáctico de los neutrófilos). Además, inhibe la función de las células NK (“natural killer”). En macrófagos el TGF- β_1 disminuye la producción de citoquinas, inhibe la cadena respiratoria con la consiguiente disminución en la producción de radicales libres de oxígeno, impide la adhesión tisular por la disminución en la expresión de receptores como el CR3 (receptor del complemento 3) y reduce la producción de óxido nítrico porque inhibe la expresión de la iNOS (“inducible nitric oxide synthase”). Finalmente se ha demostrado que el TGF- β_1 suprime la producción de citoquinas inflamatorias como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (“tumor necrosis factor- α ”), linfoxina, el interferón- γ , MIP-1 α (“macrophage inflammatory protein-1 α ”) y tiene un efecto opuesto a ciertas citoquinas (IL-1, IL-2, IL-3, factor estimulante de colonias, interferón α e interferón γ).

Por otra parte, el TGF- β_1 estimula el depósito de matriz extracelular (Figura 5). En este sentido, en fibroblastos, al igual que en otros tipos celulares, el TGF- β_1 estimula la producción de la mayor parte de proteínas de la matriz extracelular, como colágenos (I,II,III,IV y IV), glicoproteínas de adhesión como fibronectina y laminina, y proteoglicanos como betaglicano y decorina (104). También estimula la producción de integrinas que facilitan la adhesión celular a la matriz extracelular, y disminuye la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (metaloproteinasas), como colagenasas, plasmina, heparinasa y estromelisin. Sin embargo, se han observado excepciones, ya que aumenta la expresión de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) (107). Finalmente, aumenta la producción de proteínas que inhiben las enzimas encargadas de degradar la matriz extracelular como el inhibidor del activador del plasminogeno tipo 1 (PAI-1) y el llamado inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP-2 y TIMP-3).

Mecanismos fibrogénicos del TGF- β_1



Border, W. N Engl J Med 331: 1286, 1994

Figura 5. Mecanismos por los que el TGF- β_1 causa fibrosis.

El TGF- β_1 estimula la producción de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, colágenos y proteoglicanos) y bloquea su degradación porque disminuye la síntesis de proteasas y aumenta la producción de inhibidores de las proteasas. Además modula la expresión de integrinas favoreciendo la unión de las células a la matriz extracelular.

El TGF- β_1 es un arma de doble filo por su potencial terapéutico y por ser también causa de enfermedades. De este modo, tanto el aumento como la disminución en los niveles de TGF- β_1 se han asociado con las siguientes enfermedades:

1-Cáncer.

Se considera que el TGF- β_1 podría tener un efecto protector contra el cáncer porque inhibe la proliferación celular, promueve la diferenciación y la apoptosis. En las fases

iniciales del cáncer las células pierden su sensibilidad al TGF- β_1 como resultado de mutaciones o pérdida en la expresión de genes que participan en su vía intracelular (100). En el 100% de los cánceres de páncreas y en el 83% de los cánceres de colon se ha observado mutaciones que afectan al menos uno de los componentes de la vía del TGF- β_1 . Por otro lado, niveles elevados de TGF- β_1 en pacientes con cáncer se asocian a un mayor riesgo de metástasis. En fases avanzadas las células cancerígenas y del estroma circundante aumentan la producción de TGF- β_1 y con ello su actividad proteolítica y su capacidad de adhesión a la matriz extracelular, provocando un incremento en su potencial invasivo. Además, el TGF- β_1 estimula la angiogénesis, favoreciendo el crecimiento de los tumores y suprime el sistema inmunológico y con ello el sistema de inmunovigilancia (100).

2-Arteriosclerosis.

El TGF- β_1 inhibe la proliferación y la migración de las células musculares lisas y las células endoteliales, por lo que podría tener un efecto inhibitorio de la arteriosclerosis. En este sentido se ha observado que los pacientes con arteriosclerosis tienen bajos niveles plasmáticos de TGF- β_1 (109). En un modelo de ratón tratado con tamoxifeno y alimentado con una dieta rica en grasas, el aumento en los niveles plasmáticos y tisulares de TGF- β_1 frenaba la formación de lesiones arterioscleróticas (110). También se ha descrito una disminución en la expresión del receptor del TGF- β_1 tipo II en la lesión arteriosclerótica, que explicaría una resistencia al efecto del TGF- β_1 (111).

3-Enfermedades fibrosas.

La administración de TGF- β_1 en animales de experimentación o el aumento en la expresión de TGF- β_1 en ratones transgénicos causa gloméruloesclerosis, fibrosis intersticial e insuficiencia renal (112,113). Por el contrario el uso de antagonistas del TGF- β_1 reduce, de forma significativa, la fibrosis (88,100,114). Sin embargo en el caso del aumento transitorio del TGF- β_1 las lesiones son reversibles (115). En un modelo experimental se observó que 7 días después de la lesión del mesangio se producía un incremento del ARN mensajero y de proteína del TGF- β_1 acompañado por el aumento en la síntesis de proteínas de la matriz

extracelular. Sin embargo cuando los niveles de TGF- β_1 se normalizaban las lesiones glomerulares mejoraban. Únicamente si antes de curarse las lesiones se producía una nueva agresión y los niveles de TGF- β_1 se mantenían elevados, se producía una glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial irreversible.

En la clínica, enfermedades caracterizadas por la fibrosis como la hepatopatía VHC, hepatopatía alcohólica, fibrosis hepática autoinmune, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por bleomicina, esclerodermia, fibrosis medular, retinopatía proliferativa, enfermedad veno-oclusiva de los pacientes transplantados, fibrosis peritoneal de los pacientes en diálisis peritoneal, y en el síndrome de mialgia-eosinofilia se han asociado a un aumento en los niveles tisulares de ARN mensajero y plasmáticos de TGF- β_1 (100). En patología renal se ha observado también un aumento de TGF- β_1 en la glomerulonefritis mesangial IgA, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefritis lúpica, nefropatía diabética, nefropatía asociada al VIH, y en la fibrosis renal progresiva (100).

4-Enfermedades autoinmunes.

Se han observado niveles aumentados de TGF- β_1 en plasma en la enfermedad de Crohn, en enfermedades neurológicas autoinmunes, en la uveítis, y en neumonitis intersticial idiopática (100).

5-Rechazo agudo.

En un modelo experimental de rata se ha demostrado que los niveles intrarrenales del ARN mensajero del TGF- β_1 aumentan significativamente a los 3 días de haber iniciado el episodio de rechazo agudo (116). Se ha sugerido que este aumento podría tener un efecto protector por su acción antiinflamatoria y por favorecer la reparación tisular. En este sentido, se han asociado menores niveles intrarrenales de ARN mensajero del TGF- β_1 durante el episodio de rechazo con la pérdida del injerto por rechazo crónico (117).

6-Enfermedad de Camurati-Engelmann o displasia diafisaria progresiva.

Es una rara enfermedad ósea causada por mutaciones del gen del TGF- β_1 que se hereda de forma autosómica dominante (118). Se caracteriza por hiperostosis y esclerosis de las diáfisis de los huesos largos y de la base del cráneo. Los pacientes sufren dolores óseos, debilidad muscular, alteraciones de la marcha (marcha “de pato”) y astenia (119).

7-Telangiectasia hemorrágica hereditaria.

Es una enfermedad autosómica dominante que consiste en una displasia vascular que da lugar a telangiectasias y malformaciones arterio-venosas sistémicas. Está causada por mutaciones en receptores del TGF- β_1 como el ALK-1 (“activin receptor like kinase-1”) y la endoglinina (100).

TGF- β_1 y nefropatía crónica del trasplante.

Se considera que el TGF- β_1 es la vía molecular común donde convergen las diferentes agresiones que sufre el riñón (Figura 6) y que desembocan en las lesiones histológicas de la NCT (34,120). En animales la asociación entre la expresión de TGF- β_1 y NCT está bien establecida. Así, en modelos animales de arteriosclerosis y rechazo crónico se ha demostrado un aumento en la expresión de PDGF (“platelet derived growth factor”), FGF (“fibroblast growth factor”) y TGF- β_1 en la íntima vascular (121). Además, en un modelo experimental de trasplante de riñón de rata Fisher-344 a rata Lewis (los aloinjertos presentan un infiltrado inflamatorio sostenido y acaban desarrollando lesiones similares a la NCT) se ha demostrado un aumento en los niveles tisulares de ARN mensajero (detectado mediante Northern blot) y de proteína del TGF- β_1 respecto a los controles (122,123). El aumento en la expresión de TGF- β_1 se producía entre las 4 y 16 semanas después del trasplante y se correlacionaba con un aumento de fibronectina, colágeno de tipo I, tenascina, biglicano y decorina. Además, se observó un aumento del TGF- β_1 y de la fibrosis en los isoinjertos sugiriendo que los factores no-inmunológicos también modifican la expresión de TGF- β_1 y participan en el desarrollo de la NCT. En otro modelo experimental

Patogénesis de la NCT

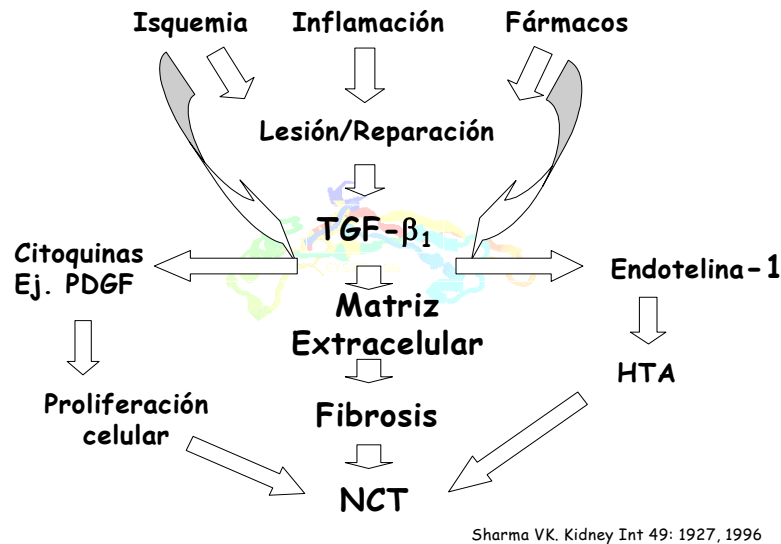


Figura 6. Hipótesis patogénica de la NCT.

Algunos autores consideran que el TGF- β_1 es la vía molecular común donde convergen las diferentes agresiones que sufre el riñón y desemboca en las lesiones histológicas de la NCT.

se observó que la expresión de TGF- β_1 aumentaba simultáneamente o se producía después de la aparición de una fibrosis significativa en el riñón, sugiriendo que el depósito de la matriz extracelular puede estimular la producción de TGF- β_1 (104). Finalmente, en injertos procedentes de ratones knock-out para las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II se ha observado una disminución en el infiltrado por linfocitos T y en la expresión intrarrenal de TGF- β_1 sin que se afecte el curso de la NCT (123). Estos datos sugieren que la fibrosis del trasplante renal se puede generar tanto por mecanismos dependientes como independientes del TGF- β_1 . Además, se ha propuesto que la expresión de TGF- β_1 en el injerto más que el desencadenante de la NCT puede ser un proceso amplificador de esta patología (104).

A nivel clínico, en un estudio transversal basado en 127 biopsias de injertos renales con disfunción crónica, la expresión intrarrenal de TGF- β_1 se ha asociado con la NCT (120).

Estos resultados se han confirmado en un estudio longitudinal con biopsias de protocolo secuenciales. En este trabajo se observó una correlación entre la progresión de la fibrosis intersticial (cuantificada mediante técnicas de morfometría) y los niveles tisulares de ARN mensajero del TGF- β_1 en los pacientes tratados con CsA, pero no en los tratados con tacrolimus (34). Asimismo, se observó un progresivo aumento en los niveles de ARN mensajero del TGF- β_1 , trombospondina y fibronectina a partir de los 6 meses post-trasplante hasta los 12 meses, momento en que se estabiliza.

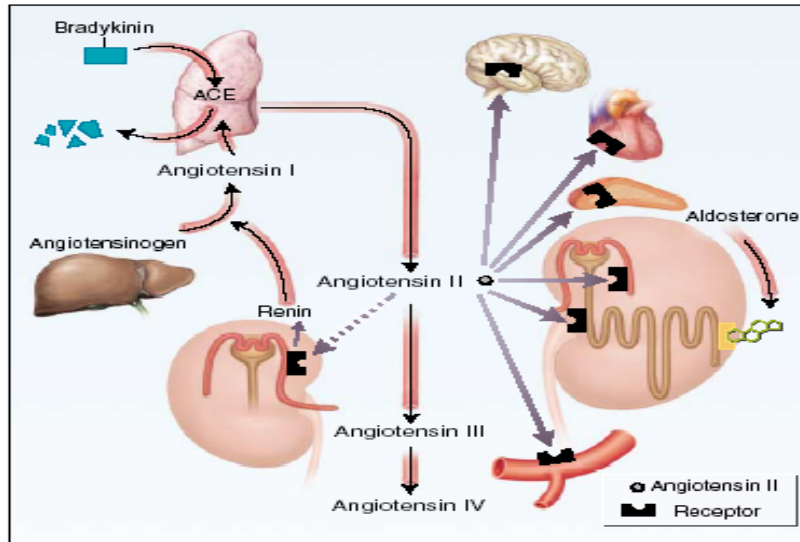
Respecto a los niveles de proteína tisular (analizados mediante inmunohistoquímica) se ha detectado un aumento en los niveles de TGF- β_1 y TGF- β_3 en los glomérulos y los vasos, en casos de rechazo agudo y crónico (104). Sin embargo, a nivel túbulo-intersticial los resultados son contradictorios porque sus niveles se han encontrado aumentados (124), disminuidos (125) o sin cambios respecto al control normal (126). En cualquier caso, los resultados de la inmunohistoquímica hay que interpretarlos con cautela. El riñón normal contiene abundante cantidad de la forma latente de las tres isoformas del TGF- β , principalmente en el epitelio tubular. La técnica utilizada no permite discriminar entre TGF- β_1 activo y TGF- β_1 en latencia, y hay evidencias que las moléculas en latencia pueden ser activadas durante el procesamiento de las muestras.

El sistema renina-angiotensina (SRA).

Otra vía molecular que puede tener un papel importante en la patogenia de la NCT es el sistema renina-angiotensina. Se conoce que su bloqueo utilizando IECAs (inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina) o ARA-II (antagonistas del receptor de la angiotensina II) ha mejorado el pronóstico de diferentes nefropatías crónicas como la diabetes, la glomerulonefritis por depósito de IgA, y la poliquistosis renal (127,128).

El SRA funciona como un sistema endocrino y paracrino (Figura 7). La renina se sintetiza en forma de pro-hormona (pro-renina) en las células yuxtglomerulares del riñón. Una vez metabolizada en renina se almacena en gránulos, y finalmente se secreta en

Sistema Renina-Angiotensina



Goodfriend T. N Engl J Med. 334:1649. 1996

Figura 7. Sistema renina angiotensina.

A la izquierda de la figura se muestra la biosíntesis de la angiotensina II. La renina se sintetiza en las células yuxtaglomerulares del riñón y cataliza la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I, que es inactivo sobre los vasos. La conversión de angiotensina-I en angiotensina II es la reacción clave del sistema, y está catalizada por la enzima de conversión de la angiotensina (ECA). El mismo enzima metaboliza la bradikinina. A la derecha de la figura se muestran los principales órganos que presentan receptores para la angiotensina II. A nivel renal la angiotensina II tiene un efecto vasoconstrictor sobre la arteriola post-glomerular, y un efecto directo sobre la permeabilidad glomerular al actuar sobre los podocitos.

respuesta a estímulos procedentes de la macula densa (grupo especializado de células del túbulo contorneado distal que actúa como quimiorreceptor de los niveles de sodio y cloro). La retención de sodio aumenta el volumen sanguíneo, y por consiguiente la tensión arterial. El aumento de la tensión arterial tiene un efecto feedback negativo sobre las células yuxtaglomerulares e inhibe la producción de renina. La secreción de renina está modulada por la inervación simpática de los túbulos renales y las arteriolas.

INTRODUCCIÓN

La renina circulante cataliza la conversión de angiotensinógeno a angiotensina I, que es un decapeptido inactivo. La conversión de angiotensina I en el octapeptido vasoactivo angiotensina II es la reacción clave del sistema, y está catalizada por la enzima de conversión de la angiotensina (ECA), que elimina el dipéptido His-Leu del extremo C-terminal de la angiotensina I. Finalmente, la angiotensina II se une a los receptores tipo 1 y tipo 2. Hay que tener en cuenta que el nivel de activación intrarrenal del SRA no se correlaciona con la actividad de la renina plasmática (129).

Desde el punto de vista hemodinámico, la angiotensina II tiene un efecto vasoconstrictor predominantemente sobre la arteriola post-glomerular, que aumenta la presión intraglomerular y la fracción de filtración, y un efecto directo sobre la permeabilidad glomerular al actuar sobre los podocitos. Además, modula el crecimiento celular, porque incrementa la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *jun B*, *c-myc* y *Egr-1*, e induce hipertrofia e hiperplasia de las células mesangiales, tubulares y musculares lisas. También, tiene un efecto pro-inflamatorio, bien de forma directa o a través del estrés oxidativo y la producción de radicales libres. Se ha observado que aumenta la producción de factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias como el TGF- β_1 , el PAI-1 (“plasminogen activator inhibitor type 1” o inhibidor del activador del plasminogeno tipo 1), el TNF- α (“tumor necrosis factor α ”), el PDGF- α (“platelet-derived growth factor α ”), el FGF (“basic fibroblast growth factor”), la endotelina, el PAF (“platelet-activating factor”), y la IL-6 (“interleucina-6”), y aumenta la actividad del factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), y la síntesis de angiotensinogeno (130,131). Además, aumenta la matriz extracelular en mesangio e intersticio, y el componente inflamatorio asociado con la lesión crónica renal porque estimula la secreción de péptidos quimiotácticos y vasoactivos, y la activación de macrófagos (131,132). Finalmente, la angiotensina II estimula la aldosterona que promueve la retención de sodio y agua y la eliminación de potasio. En consecuencia, la angiotensina II tiene un efecto negativo en la producción de renina debido a un doble mecanismo, el aumento de la volemia y un efecto directo sobre las células yuxttaglomerulares.

En general, parece que existen dos puntos claves en el control del sistema, la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) y el receptor II de la Angiotensina.

La ECA es una zinc-metalopeptidasa que actúa como una dipeptidil carboxipeptidasa (DCP1). Esta ligada a la membrana de las células endoteliales, y su liberación requiere la ruptura de los puentes hidrófobos. También, la ECA es un componente clave del sistema de la kinina-kalikeína. Actúa como proteasa de la bradikinina, rompiendo el dipéptido Phe-Arg del extremo C-terminal, e inactivando este péptido vasodilatador. Como resumen podemos decir que la ECA tiene un efecto vasoconstrictor activando la angiotensina II, e inactivando la bradikinina.

La activación del SRA se ha asociado con las siguientes enfermedades:

1-Cardiopatía isquémica.

Se ha observado que el uso de IECAs reduce la incidencia y la recurrencia del infarto agudo de miocardio y ofrece una evidencia indirecta del efecto lesivo que tiene el aumento en la expresión de la ECA en la patogenia de la cardiopatía isquémica. (133). Además, los IECAs bloquean el engrosamiento neointimal después de la angioplastia coronaria, sugiriendo el papel de la Ang-II en el desarrollo de la hiperplasia de la íntima (134).

2-Insuficiencia renal.

Como ya hemos comentado, la angiotensina II tiene un papel crítico en la génesis de la lesión renal y en su progresión. Asimismo, los IECAs ejercen un efecto renoprotector al reducir la tensión arterial y la presión intraglomerular y por su efecto antiproteinúrico.

3-Nefropatía crónica del trasplante.

Se ha demostrado que el uso de IECAs o de antagonistas de los receptores de angiotensina (ARAI) es efectivo para reducir la progresión de la NCT en modelos animales. No obstante, hay muy pocos datos sobre su uso en ensayos clínicos en trasplante renal

debido a las dudas sobre su seguridad en estos pacientes monorrenos y el temor de inducir insuficiencia renal aguda en los casos con estenosis de la arteria renal. Sin embargo, en un estudio retrospectivo sobre 642 receptores de un trasplante renal se observó que el 28% recibían IECAs o ARAII y su uso no causó alteraciones significativas en los valores de creatinina a lo largo de 36 meses. Es más, se observó una reducción de la proteinuria y un buen control de la tensión arterial (135). El efecto secundario más frecuente con los IECAs, y la razón principal para interrumpir el tratamiento, fue la tos, mientras que sólo 4 pacientes (2%) experimentaron empeoramiento de la función renal. Por lo demás, tres pacientes (1,6%) presentaron anemia y otros 6 (3,3%) tuvieron que interrumpir el tratamiento por hiperkaliemia. En otro estudio retrospectivo de casos y controles sobre 32 pacientes con NCT tratados con IECAs o ARAII se compararon con 31 pacientes con NCT que no tomaban esta medicación (136). Las características básicas sólo se diferenciaban en el porcentaje de hipertensos, que era del 100% en los que tomaban IECAs o ARAII, en comparación con el 71% del otro grupo. Se observó que con IECAs o ARAII el número de pacientes en que aumentó la creatinina sérica >50% fue menor (19% vs 26%), sugiriendo su papel protector. Sin embargo, son necesarios ensayos prospectivos randomizados de gran tamaño para determinar sus riesgos y sus ventajas.

Identificación y caracterización de nuevos marcadores de nefropatía crónica del trasplante: Par1/Emk1

La proteína Par1/Emk1 es una Ser/Thr protein-quinasa, que participa en la regulación de la homeostasis del sistema inmunológico y es importante para la función normal de los linfocitos T y B (137). Se caracteriza por tener el dominio quinasa en el extremo amino terminal, seguido por una región de función desconocida, y de una región de unos 100 aminoácidos que termina con la secuencia glutamato-leucina-lisina/asparagina-leucina, conocida como dominio ELKL (137). El nombre Emk procede de “ELKL motif kinase”. También se la conoce como MARK2 (microtubule affinity-regulating kinase 2) y Par-1 (basada en su homología con la proteína quinasa Par-1 de *Caenorhabditis elegans*).

La proteína Par1/Emk1 es esencial para el conservación de la red de microtúbulos del citoesqueleto, para la regulación de la polarización celular, y también participa en el ciclo celular (139,140). En un modelo de ratón “knock-out” se ha observado que la pérdida de actividad del gen Par1/Emk1 se asocia con un estado de hiperexcitabilidad del sistema inmunitario, como lo demuestra el aumento en la producción de IFN- γ cuando se estimula el receptor de la célula T (TCR), y en la expresión de CD44 (marcador de linfocito CD4+ memoria) en su membrana. Además, los ratones Emk1^{-/-} presentaban lesiones renales caracterizadas por un infiltrado inflamatorio difuso, cuya causa no está aclarada y puede ser consecuencia de una reacción autoinmune o de una alteración de la quimiotaxis. Por otro lado, la proteína quinasa Par1/Emk1 también se encuentra en las células epiteliales formando parte de los desmosomas, regulando la adhesión célula a célula a través de la E-cadherina (139).

5.2.4. Base genética de la variabilidad individual en la aparición de la NCT.

Como sabemos la lesión histológica de la NCT es el resultado final de las alteraciones moleculares causadas por múltiples factores etiológicos. Sin embargo, se ha observado que una misma agresión no siempre produce la misma lesión, sugiriendo que existen factores individuales que la modulan. La base de esta variabilidad reside en el substrato genético, por lo que la genómica podría ayudar a descubrir marcadores de susceptibilidad a la NCT. En la actualidad el estudio de los polimorfismos está generando grandes expectativas. La falta de un tratamiento eficaz de la NCT hace más importante el diagnóstico precoz para identificar pacientes de riesgo y promover estrategias encaminadas a mejorar su pronóstico. En este sentido, se sabe que las vías moleculares que se han considerado responsables de la patogenia de la NCT presentan variaciones polimórficas, y que ya han sido asociadas con una mayor predisposición a otras enfermedades también caracterizadas por la inflamación y la fibrosis excesiva.

El papel de los polimorfismos del TGF- β_1 .

El TGF- β_1 está localizado en el cromosoma 19 (q13.1-q13.3), y contiene 7 exones localizados entre unos largos intrones (141). El TGF- β_1 activo está codificado por parte del exón 5, el exón 6 y parte del exón 7.

Se han descrito 8 SNPs (Figura 8) (142,143). En el promotor están localizados 3 SNPs: 1) en la posición -988 pb (representa la sustitución de una citosina por una adenina; C-988A), 2) en la posición -800 pb (sustitución de guanina por adenina; G-800A), y 3) en posición -509 pb (sustitución de citosina por timina; C-509T). En la posición +72 pb (zona no codificante) se ha descrito la inserción de una citosina. En el primer exón se han localizado dos SNPs: uno en la posición +869 pb (sustitución de timina por citosina; T+869C), y conlleva el cambio de una leucina por una prolina en el codón 10 (leu10pro), y otro en posición +915 pb (sustitución de guanina por citosina; G+915C), y conlleva el cambio de una arginina por una prolina a nivel del codón 25 (Arg25pro). En el exón 5 se ha descrito un SNP en posición +1632 pb (sustitución de citosina por timina; C+1632T) y da lugar al cambio de una treonina por una isoleucina en el codón 263 (Thr263Ile). Finalmente se ha descrito la delección de una citosina en el intrón anterior al exón 5 (8 bp previos al inicio del exón).

El principal mecanismo regulador de los niveles de TGF- β_1 se encuentra a nivel transcripcional. En este sentido 3 SNPs de los 8 descritos se han asociado a mayores niveles de proteína en plasma. Uno localizado en el promotor (C-509T) y otros dos en el primer exón (T+869C, y G+915C). La contribución de los SNPs del promotor en los niveles de TGF- β_1 en el plasma fue estudiada por David Grainger en una población de gemelos (144). Este autor llegó a la conclusión que sólo el polimorfismo C-509T está asociado con mayores niveles plasmáticos. Sin embargo este SNP únicamente explicaría el 8,2% de las variaciones en los niveles sugiriendo la presencia de otros factores.

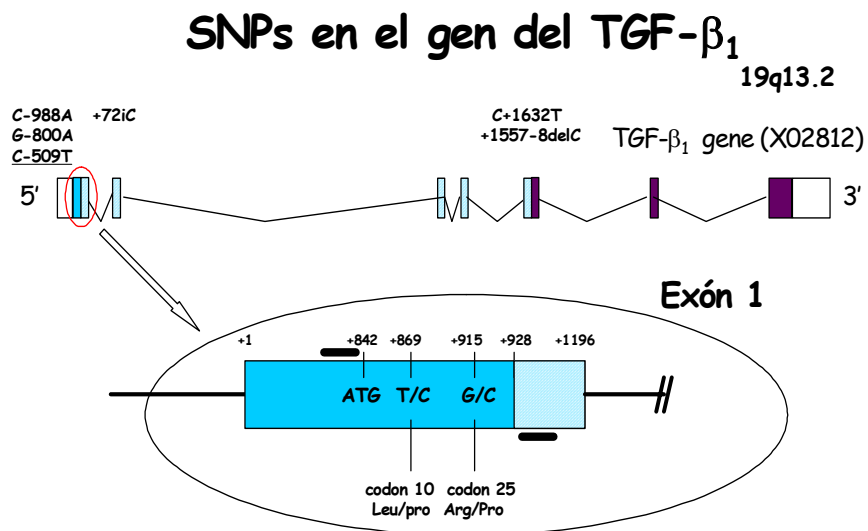


Figura 8. SNPs del gen del TGF- β_1 , con detalle de los localizados en el exón 1.

El TGF- β_1 está localizado en el cromosoma 19 y contiene 7 exones. El TGF- β_1 activo está codificado por parte del exón 5, el exón 6 y parte del exón 7 (cajas de color lila). Se han descrito 8 SNPs. En el promotor se localizan: 1) C-988A (sustitución de una citosina por una adenina en la posición -988 pb), 2) G-800A (guanina por adenina en la posición -800 pb), 3) C-509T (citosina por timina en posición -509 pb). En la posición +72 pb se ha descrito la inserción de una citosina. En el primer exón se localizan: T+869C (timina por citosina en posición +869 pb, que da lugar al cambio de leucina por prolina en el codón 10), y G+915C (guanina por citosina en posición +915 pb con cambio de arginina por prolina en el codón 25). En el exón 5 se localiza: C+1632T (citosina por timina en posición +1632 pb con cambio de treonina por isoleucina en el codón 263). Finalmente se ha descrito una deleción de una citosina en el intrón anterior al exón 5 (8 bp previos al inicio del exón).

Se conoce con bastante precisión el mecanismo por el que un SNP en el promotor influye en la producción de una proteína, sin embargo no es tan bien conocido como influyen los SNPs localizados en una región codificante. Conviene recordar que en el caso

del TGF- β_1 el exón 1 codifica el péptido señal, que es clave en el transporte del pre-pro-TGF- β_1 a través del retículo endoplasmático. Se ha demostrado que las mutaciones experimentales en el péptido señal alteran la transcripción y disminuyen la secreción de TGF- β_1 (145). A nivel clínico, se ha asociado el SNP del codón 10 con un aumento en los niveles plasmáticos de TGF- β_1 (145-148). El codón 10 se encuentra localizado en la hélice alfa del péptido señal, y la transición de una timina (T) a una citosina (C) da lugar al cambio de un aminoácido hidrófobo, la leucina, por uno neutro, la prolina. Sin embargo, los resultados publicados respecto al alelo responsable del aumento de los niveles son contradictorios y tanto el alelo T como el C se han asociado con mayores niveles de ARN mensajero y de proteína. Por otro lado, el SNP del codón 25, que consiste en el cambio de una guanina (G) por una citosina (C), representa el reemplazo de una arginina (aminoácido básico) por una prolina, alterándose la activación de la proteína. Además, el alelo G del codón 25 está ligado por desequilibrio con la inserción de una citosina en la posición +72 facilitando la aparición de un bucle de ADN, que puede alterar la regulación del gen. Así, en estudios “in vitro” con leucocitos de pacientes en cultivo activados con PMA (“phorbol 12-myristate 13-acetate”) y fitohemaglutinina el genotipo GG se ha asociado a un mayor nivel de proteína (146).

Finalmente, se ha descrito un mecanismo de feedback donde el TGF- β_1 activo estimularía su propia transcripción y el de otras enzimas encargadas de su catabolismo (103).

Los SNPs del exón 1 del TGF- β_1 (codón 10 y codón 25) han sido los que con más frecuencia se han asociado con enfermedades. A modo de resumen hay que tener presente que en la posición 2 del codón 10 se han detectado los alelos T y C, que dan lugar a los genotipos TT, CT y CC; mientras que en la posición 2 del codón 25 se han detectado los alelos G y C, que dan lugar a los genotipos GG, GC y CC. Así el alelo T del codón 10 se ha asociado con enfermedades autoinmunes como la Artritis Reumatoide (149), con ciertas enfermedades neurológicas (150), y con la uveítis (151). En el trasplante hepático el

INTRODUCCIÓN

rechazo agudo se ha asociado con una mayor prevalencia del genotipo TT del codón 10, aunque esta observación no se ha confirmado en otros estudios (152,153). En el trasplante renal, tanto el alelo T del codón 10 procedente del donante o del receptor, como el alelo G del codón 25 procedente del receptor se han asociado con una mayor incidencia de rechazo agudo (154,155,156). En el trasplante cardíaco no se ha podido demostrar que tenga relevancia clínica en la incidencia del rechazo agudo (157).

Por otra parte el alelo T del codón 10 y el alelo G del codón 25 se han asociado con enfermedades fibrosantes pulmonares (145). Sin embargo, sólo el alelo G del codón 25 se ha asociado a la aparición de fibrosis en trasplante pulmonar (145). Recientemente se ha publicado en un estudio multicéntrico sobre 808 pacientes con fibrosis quística y la mutación $\Delta F508$ en homocigosis que el genotipo CC del codón 10 se asocia con lesiones pulmonares más severas de forma independiente a otros genes (158).

Los pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis presentan una mayor prevalencia del alelo T del codón 10 y el alelo G del codón 25 (159). Sin embargo, únicamente los pacientes con el alelo T del codón 10 presentaban una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares. En la nefropatía IgA se ha observado una mayor prevalencia del genotipo TT del promotor (C-509T) y del genotipo CC del codón 10 (160). Además, estos genotipos presentaban una peor supervivencia.

En el riñón transplantado los datos son contradictorios. Por un lado, se ha descrito la asociación entre el genotipo TT del codón 10 y la NCT (161). Sin embargo, en otro estudio en población pediátrica con disfunción crónica del injerto renal los SNPs del codón 10 y del codón 25 no se han asociado con la NCT (162). Finalmente, el registro del “Collaborative Transplant Study Report database” demuestra poca relevancia de los SNPs del codón 10 y 25 en la supervivencia del injerto renal a los 3 años, aunque no en los retransplantes.

El genotipo GG del codón 25 también se ha asociado con una mayor prevalencia de HTA (141,146). Finalmente, se ha sugerido que el SNP del codón 10 es uno de los determinantes genéticos de la masa ósea, y que el alelo T es un factor de riesgo independiente para desarrollar osteoporosis en mujeres japonesas con menopausia (147).

Polimorfismos génicos de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA).

La caracterización de los polimorfismos de los genes del SRA es un área de intensa investigación. Los estudios se han centrado, sobre todo, en la enzima de conversión de la angiotensina (ECA), que regula el paso clave de conversión de la angiotensina I en angiotensina II. El gen de la ECA está localizado en el cromosoma 17q23. Tiene un tamaño de 21 kb, y está formado por 26 exones y 25 intrones (163,164). Se transcribe principalmente en 2 formas, una forma endotelial de 4.3 kb, formada por los exones del 1 al 26, excluyendo el exón 13 (también se encuentra en las células de estirpe epitelial) y una forma testicular de 3 kb, formada por los exones 13-26. El exón 26 codifica el dominio de anclaje a la membrana celular.

La regulación de los niveles plasmáticos de ECA es principalmente transcripcional. Se ha observado que la presencia de polimorfismos de ADN del tipo de inserción/delección interviene en el control de los niveles plasmáticos de ECA (165). En este sentido se han detectado dos alelos de la ECA que difieren en la inserción de 287 pb en el intrón 16 del gen. Los pacientes con genotipo DD generalmente presentan unos niveles plasmáticos de ECA dos veces superiores a los del genotipo II. Sin embargo, el mecanismo responsable de la regulación de los niveles no es del todo conocido, ya que se trata del cambio en un intrón, aunque se ha sugerido que el alelo D estaría ligado a una alteración de otro locus que participaría en la regulación de la expresión de la ECA.

Los polimorfismos en el gen de la ECA se han asociado a diversas enfermedades. Así, el alelo D se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad coronaria (132), de reestenosis en las arterias coronarias después del implante de un “stent” (166) y de hipertro-

fa ventricular izquierda (167). Sin embargo, esta asociación no se ha confirmado en otros estudios con un mayor número de pacientes y en el meta-análisis (168,169). Estos datos sugieren que la patogenia de la enfermedad cardiovascular es compleja, y en ella intervienen múltiples factores, tanto genéticos como ambientales, por lo que en poblaciones de estudio amplias el riesgo que ofrecen los polimorfismos de un único gen puede fácilmente ser enmascarado por otros factores de riesgo (167). Por el contrario, este riesgo puede ponerse en evidencia analizando subgrupos homogéneos de pacientes. Por otra parte, su papel en la HTA es un tema controvertido, ya que se ha descrito su asociación con el alelo I, aunque no se ha confirmado en otros estudios (167). También se ha descrito la asociación del genotipo DD con la trombosis venosa profunda (167).

El genotipo DD de la ECA se ha asociado con el deterioro progresivo de la función renal, aunque no con la mayor incidencia o prevalencia de enfermedades renales (170-172). Así, por ejemplo, se ha demostrado que la progresión de la insuficiencia renal en la nefropatía diabética o la poliquistosis es más rápida en los pacientes con el genotipo DD. También se ha observado que el genotipo de la ECA predice la respuesta antiproteínúrica de los IECAs (173,174). Los pacientes con genotipo DD presentan resistencia a los IECAs, mientras que los pacientes con genotipo II presentan una buena respuesta. Sin embargo hasta la fecha no hay consenso para la utilización del genotipo como marcador pronóstico en las enfermedades renales, ya que se considera que faltan datos sólidos procedentes de estudios prospectivos con un tamaño muestral suficiente.

En el riñón trasplantado hay poca información sobre la asociación del genotipo de la ECA y la aparición de NCT. Los receptores con el genotipo DD presentan una peor función renal a los 3 años (175). También se ha publicado la asociación entre el genotipo DD del receptor y la supervivencia del injerto en niños y en pacientes que presentaban un deterioro de la función renal. Sin embargo, esta asociación no ha sido confirmada por otros, sugiriendo que el genotipo DD podría modular la evolución del injerto solamente en aquellos casos en los que ya existe lesión (176-179).

Los polimorfismos del gen Par1/Emk1.

El gen Emk1 se encuentra en el cromosoma 11q12.3 y consta de 17 exones. En los seres humanos se han descrito varias isoformas (Figura 9), debido a la existencia de 2 promotores (isoforma Emk1A e isoforma Emk1B) y por el splicing alternativo del exón 16 (isoforma Emk1D cuando se expresa el exón 16 e isoforma Emk1E cuando no se expresa) (137). Hasta el momento se desconoce la función de estas isoformas o su asociación con enfermedades.

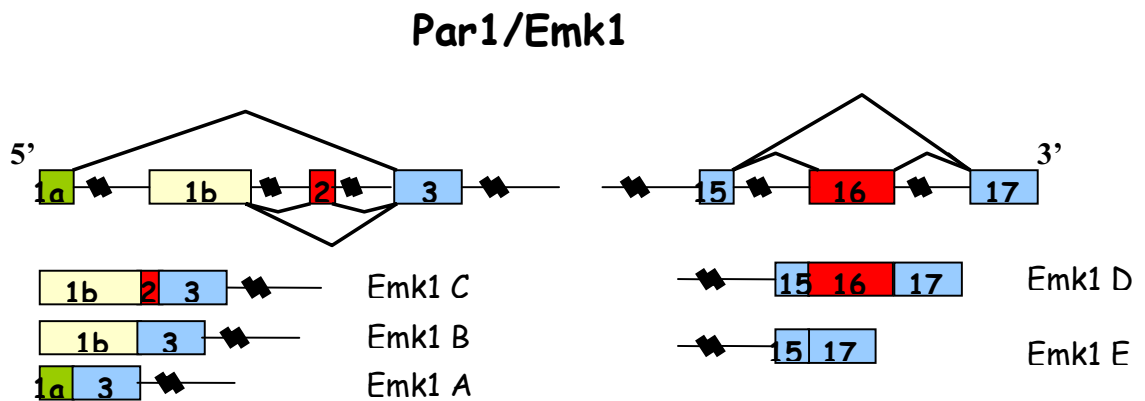


Figura 9. Isoformas del gen Par1/Emk1.

Esquema que muestra las isoformas generadas por el splicing alternativo de los exones 2 y 16, y por el uso de dos promotores denominados 1a y 1b.

5.3. DIAGNÓSTICO DE LA NEFROPATÍA CRÓNICA DEL TRANSPLANTE

Cuando un injerto renal presenta un deterioro progresivo de la función renal, el diagnóstico definitivo se establece mediante la realización de una biopsia renal. Sin embargo en muchas ocasiones la lesión observada es inespecífica y se encuentra ya en una fase irreversible. Este hecho animó a la práctica de biopsias de protocolo sobre injertos clínicamente estables. Las biopsias de protocolo han demostrado que existe una falta de correlación entre función renal y lesión. Asimismo, han permitido identificar lesiones precoces asintomáticas con valor pronóstico (36,47,180). De esta forma, se ha asociado el engrosamiento crónico de la íntima arterial en la biopsia realizada a los 12 meses con una reducción del 14,2% en la supervivencia del injerto a los 10 años (47). Además, la ausencia

INTRODUCCIÓN

de fibrosis intersticial crónica a los 12 meses se asocia con una supervivencia del injerto a los 10 años del 90%, en comparación con un 60% en el caso de existir fibrosis (35).

La evaluación de las biopsias de protocolo se enfrenta a un problema metodológico, la reproducibilidad del diagnóstico entre diferentes grupos. En este sentido, en un estudio europeo en el que participaron 23 centros expertos, que tenía por objeto conocer el grado de concordancia de los diagnósticos histológicos, se ha puesto en evidencia una considerable variación entre observadores (181). En este estudio se recomendaba cautela a la hora de interpretar los datos procedentes de diferentes instituciones y se proponía que en los ensayos multicéntricos el análisis de las biopsias se realizara en un único centro. Para mejorar la precisión en la valoración de las lesiones y la reproducibilidad se ha recurrido al estudio morfométrico para cuantificar la fracción de volumen del intersticio y de la íntima (182).

En el servicio de nefrología del Hospital de Bellvitge desde 1988 está llevándose a cabo en pacientes transplantados un estudio prospectivo con biopsias de protocolo (32,36,47,180,182). El protocolo consiste en la practica de una biopsia entre los 3-6 meses después del trasplante a aquellos pacientes que firman el consentimiento informado y que cumplen los siguientes criterios: 1) creatinina sérica < 300 $\mu\text{mol/L}$; 2) proteinuria < 1g/día; y 3) función renal estable, definida como una variabilidad inferior a un 15% en las dos semanas anteriores y posteriores a la realización de la biopsia. Hasta 1999 se realizó una segunda biopsia un año después del trasplante de forma independiente a su creatinina y a su proteinuria. Además, durante el periodo 1995-1997, y de forma sistemática desde 1999 se está recogiendo una biopsia basal en el momento de la extracción del riñón. Como resultado de esta experiencia se ha llegado a las siguientes conclusiones: 1) La prevalencia de NCT a los 3 meses del trasplante es del 42 %, siendo el 83% de grado leve, y el 17% restante de grado moderado. 2) La NCT sin vasculopatía es 5-6 veces más frecuente a los 3 meses del trasplante que la NCT con vasculopatía. 3) El diagnóstico de NCT tiene un valor pronóstico independiente de otros parámetros clínicos clásicamente asociados con la supervivencia del trasplante como el rechazo agudo, la creatinina sérica en el momento de la

biopsia o la proteinuria, y aumenta el riesgo de perder el injerto 6 veces. 4) La incidencia de la NCT aumenta en función del tiempo, siendo al año del trasplante aproximadamente un 55% y a los dos años un 66%. 5) La incidencia de vasculopatía aumenta rápidamente durante los primeros 3-4 meses y más lentamente a partir de este momento. 6) El ensanchamiento del volumen intersticial progresa durante los 6 primeros meses y se estabiliza posteriormente.

Un aspecto a destacar sobre las biopsias de protocolo es su utilidad para estudiar los factores de riesgo asociados a la aparición de la NCT. De esta forma se ha identificado que la edad del donante, el rechazo agudo, la toxicidad por ciclosporina, la infección por citomegalovirus, la isquemia fría y la función retrasada del injerto se asocian con NCT sin vasculopatía. Por otro lado, la hipercolesterolemia es el único factor asociado con la presencia de NCT y vasculopatía (32). Técnicas más exactas como la histomorfometría, han permitido establecer una asociación entre el crecimiento del intersticio, la superficie corporal del receptor y la necrosis tubular aguda. El tamaño de la íntima se ha asociado con las características del donante, grado de histocompatibilidad entre donante y receptor y la presencia de hipercolesterolemia en el receptor (182). Además, las biopsias de protocolo han permitido detectar diferentes grados de inflamación sin repercusión clínica, pero que han demostrado tener una gran relevancia en el desarrollo posterior de la NCT (33,183,184). Sin embargo el significado de esta inflamación subclínica sigue siendo motivo de discusión y aunque algunos autores han sugerido que tendría un papel inmunorregulador y por la tanto potencialmente beneficioso, existen trabajos preliminares que han demostrado que el tratamiento precoz del rechazo subclínico comporta menos fibrosis y mejora el pronóstico del aloinjerto (185).

Finalmente, se han propuesto las lesiones observadas en las biopsias de protocolo como variables de eficacia para el diseño de ensayos clínicos. Las biopsias permitirían reducir el tamaño de la muestra y el tiempo de seguimiento necesario, en comparación con

INTRODUCCIÓN

los estudios epidemiológicos clásicos, para valorar el efecto de un tratamiento en la aparición o en la progresión de la NCT (32).

II HIPÓTESIS

Diversos polimorfismos en genes fundamentales de las vías moleculares responsables de la NCT podrían explicar la variabilidad individual en las lesiones histológicas que se observan en las biopsias de protocolo, así como en el pronóstico del injerto. Es decir, un mismo estímulo en calidad e intensidad sobre el riñón de una persona predispuesta causaría su lesión, mientras que esto no ocurriría en otros injertos donde no existiera este riesgo. En consecuencia, estos polimorfismos podrían utilizarse como marcadores moleculares para el diagnóstico precoz de aquellos pacientes con riesgo para desarrollar NCT o con peor pronóstico. Este diagnóstico precoz permitiría diseñar estrategias encaminadas a su prevención, minimizando factores de riesgo o administrando fármacos como los IECAs o los ARA-II.

III OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

OBJETIVOS

El objetivo principal es evaluar el componente genético que interviene en el desarrollo de las lesiones del injerto renal y caracterizar marcadores diagnósticos precoces de NCT para identificar pacientes de riesgo a sufrir una pérdida precoz del injerto que podrían beneficiarse de tratamientos preventivos. Con este objetivo se llevó a cabo un estudio de observación prospectivo en biopsias renales de protocolo de pacientes que recibieron un único riñón de cadáver. En ellos se estudió la asociación entre los polimorfismos del transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), y de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) con las lesiones renales tanto agudas (rechazo subclínico), como crónicas (NCT). Además, se estudió la asociación de estas lesiones con los polimorfismos de un gen poco conocido, Par1/Emk1 cuya alteración se ha visto relacionada con fenómenos inflamatorios localizados en el riñón.

De una forma más detallada podemos establecer que los objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1 Evaluar si las biopsias de protocolo pueden ser utilizadas para reducir el tamaño de la muestra poblacional en estudios de asociación.

Este objetivo esta basado en la demostrada validez que la lesión histológica presente en la biopsia de protocolo predice de forma independiente el pronóstico del injerto.

2 Estudio de asociación entre los SNPs del exón 1 del gen TGF- β_1 en donante y/o receptor y las lesiones del aloinjerto renal.

Este objetivo se desprende del papel clave del TGF- β_1 en la patogenia de la NCT, y de la asociación de los SNPs del exón 1 del gen TGF- β_1 con la producción del TGF- β_1 , y con un mayor riesgo de presentar rechazo agudo. En consecuencia, es de gran interés analizar si los SNPs del TGF- β_1 están también asociados con las lesiones precoces en las biopsias de protocolo.

3 Estudio de asociación entre el genotipo de la ECA del donante y/o receptor y las lesiones del aloinjerto renal.

El interés de este estudio se basa en el papel protector que sobre el riñón ejercen los inhibidores de la ECA y en la influencia que tiene el genotipo de la ECA en el pronóstico de algunas nefropatías crónicas.

4 Estudio de un nuevo mediador de lesión renal. Estudio de la asociación entre las alteraciones en el patrón de splicing del gen Par1/Emk1 y las lesiones del aloinjerto renal.

Nuestro grupo está interesado en la detección y caracterización molecular de genes que puedan tener un papel relevante en la aparición o desarrollo de la NCT. En este sentido nos propusimos estudiar la expresión y sus alteraciones de un gen poco conocido, la Ser/Thr proteín-quinasa Par1/Emk1. El motivo principal de centrar el interés en este gen nace con la publicación del fenotipo del ratón $Emk^{-/-}$, que mostraba una alteración del sistema inmunológico y un infiltrado inflamatorio de predominio renal que recordaba los mecanismos y lesiones del rechazo agudo. Dado que, el rechazo agudo es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la NCT nos preguntamos si la expresión del gen Par1/Emk1 está alterada en pacientes transplantados y se asocia con las lesiones histológicas observadas en las biopsias de protocolo.

IV TRABAJOS PUBLICADOS

Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy

Serón D, Moreso F, Ramón JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castelao AM, Alsina J, Grinyó JM.

Transplantation 69;1849-1855, 2000.

PROTOCOL RENAL ALLOGRAFT BIOPSIES AND THE DESIGN OF CLINICAL TRIALS AIMED TO PREVENT OR TREAT CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY¹

DANIEL SERÓN,^{2,3} FRANCESC MORESO,² JOSEP M. RAMÓN,⁴ MIQUEL HUESO,² ENRIC CONDOM,⁵
XAVIER FULLADOSA,² JORDI BOVER,² SALVADOR GIL-VERNET,² ALBERTO M. CASTELAO,²
JERONI ALSINA,² AND JOSEP M. GRINYÓ²

Departments of Nephrology, Epidemiology, and Pathology, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Background. The minimum sample size to perform a clinical trial aimed to modify the natural history of chronic allograft nephropathy (CAN) is very large. Since the presence of chronic tubulointerstitial damage in renal protocol biopsy specimens is an independent predictor of late outcome, we evaluated whether protocol biopsies could facilitate the design of trials aimed to prevent or treat CAN.

Methods. Two hundred eighty-two protocol biopsy specimens were obtained 3 months after transplantation in 280 patients with serum creatinine levels <300 $\mu\text{mol/L}$, proteinuria <1000 mg/day, and stable function. The specimens were evaluated according to the Banff criteria.

Results. Graft survival depended on the presence of CAN and renal transplant vasculopathy (RTV). Thus, biopsy specimens were classified as: (a) no CAN (n=174); (b) CAN without RTV (n=87); and (c) CAN with RTV (n=21). Graft survival at 10 years was 95%, 82%, and 41%, respectively ($P=0.001$). Total serum cholesterol before transplantation was 4.5 ± 1.1 , 4.6 ± 1.1 , and 5.3 ± 1.6 mmol/L, respectively ($P=0.009$) and it was

the only predictor of RTV.

Power analysis ($\beta=20\%$, $\alpha=5\%$) was done to evaluate whether protocol biopsies can facilitate the design of clinical trials aimed either to prevent or treat CAN. We showed that the most feasible approach would be to use the presence of CAN as the primary efficacy end point in a prevention trial. To demonstrate a 50% reduction in the incidence of CAN at 3 months, 570 patients would be required.

Conclusions. Protocol biopsies may allow a reduction of sample size and especially the time of follow-up in a trial aimed to prevent CAN.

The most common cause of late allograft failure is so-called chronic rejection (1, 2). In solid organ transplantation, this condition is recognized by the appearance of transplant vasculopathy, which is defined as the presence of arterial fibrous intimal thickening (3). In heart transplantation, the practice of systematic coronary angiographies and intravascular ultrasounds has facilitated the diagnosis of the appearance and progression of transplant vasculopathy (2, 4). In the kidney, it is not clear whether the presence of renal transplant vasculopathy (RTV) can be properly sampled by means of a core biopsy. Thus, the standardized international classification system of renal allograft pathology proposed the term chronic allograft nephropathy (CAN), which was defined as the presence of tubulointerstitial chronic damage either associated or not with RTV (5, 6).

¹ This work was supported by FISs grants 95/1088 and 96/0865.

² Department of Nephrology.

³ Address correspondence to: Prof. Daniel Serón at the Servei de Nefrologia, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain.

⁴ Department of Epidemiology.

⁵ Department of Pathology.

Despite the existence of some drugs that can improve the outcome of chronic rejection in experimental models (7, 8), no clinical trials aimed to modify the natural history of this entity have been performed due to the difficulties encountered in their design (9, 10). In a primary intervention or prevention trial, the minimum number of patients to test the potential benefit of any new study drug is very large. In a secondary intervention or treatment trial, structural renal damage at the time of the diagnosis is usually too advanced, and probably it is beyond the threshold of reversibility (11).

Different centers have performed protocol renal biopsies to characterize their prognostic value (12-16). These studies have shown that chronic renal damage is a strong predictor of late graft loss, suggesting that protocol biopsies could become a useful tool in the design of clinical trials aimed to improve late graft outcome.

Thus, in the present study, we further characterize the predictive value of histologic lesions in early protocol biopsies and evaluate their potential utility in the design of clinical trials aimed either to prevent or treat CAN.

MATERIALS AND METHODS

Patients. In June 1988, a prospective study of protocol renal allograft biopsies was started at our center. This protocol was stopped in May 1990 because a patient presented an episode of hematuria with ureteral obstruction that was successfully treated. The protocol was restarted in February 1991, and in the present study, biopsies performed until October 1997 are analyzed.

During the study period we performed 576 cadaveric renal transplants. A protocol biopsy was performed at approximately 3 months after transplantation in patients who gave their informed consent and fulfilled the following criteria: (a) serum creatinine level $<300 \mu\text{mol/L}$; (b) proteinuria $<1000 \text{ mg/day}$; and (c) stable renal function, defined as a variability of serum creatinine of less than 15% during the 2 weeks before and after biopsy. Patients who had an episode of acute rejection after protocol biopsy were not considered.

From November 1988 to June 1989 and from December 1995 to June 1997, sequential donor biopsy specimens were obtained at our center.

Definition of clinical variables. The following variables were evaluated at the time of surgery: donor type (heart-beating or non-heart-beating), age and sex of the donor and the recipient, height and weight of the recipient, hepatitis C virus antibodies, etiology of end-stage renal disease, time on dialysis, hypertension, total serum cholesterol before transplantation, last panel-reactive antibodies, number of HLA mismatches, and cold ischemia time. After surgery, delayed graft function and acute rejection were evaluated. At the time of biopsy and during follow-up, serum creatinine level, proteinuria, total serum cholesterol, hypertension, cyclosporine (CsA) dose, and CsA levels were recorded.

Recipient body surface area was calculated according to Mosteller's formula (17). Delayed graft function was defined as hemodialysis requirements during the first week after surgery once acute rejection, vascular complications, or urinary complications were discarded. Acute rejection was defined as an acute rise of serum creatinine $>30\%$, which responded to antirejection therapy. In this study, 69% of patients with clinical suspicion of acute rejection underwent biopsy, and the biopsy specimens were evaluated according to the 1993 Banff schema (5). Hypertension was defined as a mean arterial pressure $>107 \text{ mmHg}$ and/or the requirement of antihypertensive drugs. Mean CsA dose and levels received until biopsy were calculated from the CsA dose and levels at days 1, 7, 14, 30, 60, 90, and the day of biopsy.

Immunosuppressive treatment. During the time of study, six immunosuppressive regimens have been used in our center as de-

scribed elsewhere (18-23): (a) CsA and prednisone (PN); (b) concomitant induction therapy with antilymphocytic antibodies, CsA, and PN; (c) triple-drug standard regimen with CsA, azathioprine, and PN; (d) triple-drug regimen with CsA, mycophenolate mofetil, and PN; (e) concomitant induction therapy with anti-leukocyte function-associated molecule-1 antibodies, CsA, azathioprine, and PN; and (f) induction therapy with antilymphocytic antibodies, mycophenolate mofetil, and PN.

Biopsies. Protocol biopsies were performed and processed as previously described (14). Renal lesions in protocol and donor biopsies were simultaneously and blindly evaluated according to the Banff schema (5, 6) by two observers. Sample adequacy according to the 1993 Banff criteria was defined as: (a) inadequate (less than one glomerulus or arterial section); (b) marginal (between one and six glomeruli with at least one arterial section); and (c) adequate (seven or more glomeruli with at least one arterial section). Acute and chronic glomerular, interstitial, tubular, and vascular lesions as well as the extension of arteriolar hyalinosis were graded from 0 to 3+. The severity of these lesions allows the definition of the histological diagnosis. More than one histological diagnosis was used if appropriate. Protocol biopsies were not used to make any clinical decision.

Statistics. Results are expressed as the mean \pm SD. Kaplan-Meier analysis was used to calculate graft survival, and the Mantel-Cox log-rank test was used to compare survival between groups. Since the aim of this analysis was to evaluate the influence of histological lesions on graft survival but not on patient survival, patients who died with a functioning graft were censored.

Comparison between groups was performed by means of the chi-square test for categorical data, the Kruskal-Wallis test for non-normally distributed variables, and the analysis of variance for continuous variables (Scheffe test for individual comparisons). Predictors of graft survival were evaluated by means of univariate Cox's proportional hazard analysis. Variables that were associated with histological damage and graft survival in the univariate analysis ($P < 0.10$) were further analyzed by means of logistic regression and multivariate Cox's analysis, respectively (24). Independent variables were checked for collinearity. All P values were two-tailed, and a P value <0.05 was considered significant.

Finally, we performed power calculations to estimate the minimum sample size of different hypothetical primary and secondary intervention trials in which the histological damage was either considered the primary efficacy end point or the criteria to select patients. Standard formulas for a binomial model ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) were used to calculate sample size (25).

RESULTS

Patients. Three hundred fourteen protocol biopsies were performed in 311 patients who accomplished the inclusion criteria and gave their consent. In 27 patients, tissue samples were inadequate for histological diagnosis, and 5 cases were excluded due to acute rejection after the protocol biopsy. Finally, 282 biopsies from 280 patients were included. The median time until graft loss or the end of follow-up was 4.5 years (range 9 months to 10 years). Six patients died with a functioning graft, and 21 patients lost their graft after a median follow-up of 3.6 years (range 9 months to 6.4 years).

Histological diagnosis. The mean glomerular number per biopsy was 11.7 ± 6.8 . According to the 1993 Banff criteria, 221 biopsy specimens were adequate and 61 were marginal. The mean glomerular number in marginal specimens was 4.2 ± 1.4 .

Histological diagnoses were as follows: (a) normal ($n = 122$); (b) borderline changes ($n = 48$); (c) acute rejection ($n = 4$); (d) CAN ($n = 62$); (e) CAN associated with borderline changes ($n = 38$); and (f) CAN associated with acute rejection ($n = 8$). RTV was observed in 21 cases and their histological diag-

noses were as follows: (a) CAN (n=10); (b) CAN associated with borderline changes (n=8); and (c) CAN associated with acute rejection (n=3). CAN grade I was observed in 91 biopsy specimens and CAN grade II in 17 specimens. Acute rejection grade I was diagnosed in 8 biopsy specimens and grade II in 4 specimens. Hyaline arteriolar lesions were observed in 33 biopsy specimens.

In 5 of 61 donor biopsy specimens, sufficient tissue was not obtained; in another 5 cases the protocol biopsy specimen was inadequate for diagnosis. Histological diagnoses in the remaining 51 cases were as follows: (a) normal (n=43); and (b) CAN grade I (n=8). RTV was observed in one case.

In 18 of 21 patients who lost their graft, a diagnostic biopsy was done and sufficient tissue for diagnosis was obtained in 15 patients. Histological diagnoses were: (a) CAN grade I (n=3); (b) CAN grade II (n=7); and CAN grade III (n=5). In nine of these cases, CAN was associated with the presence of RTV.

Histological diagnosis and graft survival. Graft survival in the six histological categories is shown in Figure 1. Patients with CAN either associated or not with acute changes displayed a poorer graft survival than patients without CAN. The lack of influence of acute changes on graft outcome supports the classification of the studied set of biopsy specimens in the following groups: (a) no CAN (n=174); (b) CAN grade I (n=91); and (c) CAN grade II (n=17), with 10-year graft survival rates of 95.4%, 74.1% and 85.1%, respectively ($P=0.0009$). Univariate Cox's analysis confirmed that the presence or absence, but not the grade, of CAN was a predictor of late graft failure (data not shown). To further explore the predictive value of chronic renal lesions on graft outcome, biopsy specimens were reclassified as follows: (a) no CAN

(n=174); (b) CAN without RTV (n=87); and (c) CAN with RTV (n=21). As shown in Figure 2, 10-year graft survival rates were 95.4%, 82.3%, and 41.3%, respectively ($P<0.0001$).

Histological diagnosis and clinical characteristics. Demographic characteristics and evolution of patients according to histological diagnosis are summarized in Tables 1 and 2. Cold ischemia time and mean CsA levels were higher in patients with CAN without RTV when compared to patients without CAN. Patients displaying CAN either with or without RTV received kidneys from older donors, suffered from an increased incidence of acute rejection, and showed a higher serum creatinine level and proteinuria at the time of biopsy than patients without CAN. Total serum cholesterol was higher in patients displaying CAN with RTV not only at the time of biopsy but also before transplantation.

To characterize the independent predictors of CAN with or without RTV, a logistic regression analysis was done using patients without CAN as the control group. Donor age (relative risk [RR]=1.02, 95% confidence interval [CI]=1.01–1.05), cold ischemia time (RR=1.05, 95% CI=1.01–1.10), acute rejection (RR=2.29, 95% CI=1.14–4.62), and mean CsA level until biopsy (RR=1.006, 95% CI=1.002–1.010) were predictors of CAN without RTV. On the other hand, total serum cholesterol before transplantation (RR=1.67, 95% CI=1.12–2.50) was the only independent predictor of CAN with RTV.

Risk factors for graft loss. Univariate Cox's regression analysis showed that histological diagnosis, serum creatinine level, and proteinuria at the time of biopsy were associated with a poorer renal allograft survival, whereas acute rejection, donor age, mean CsA levels, and total serum cholesterol

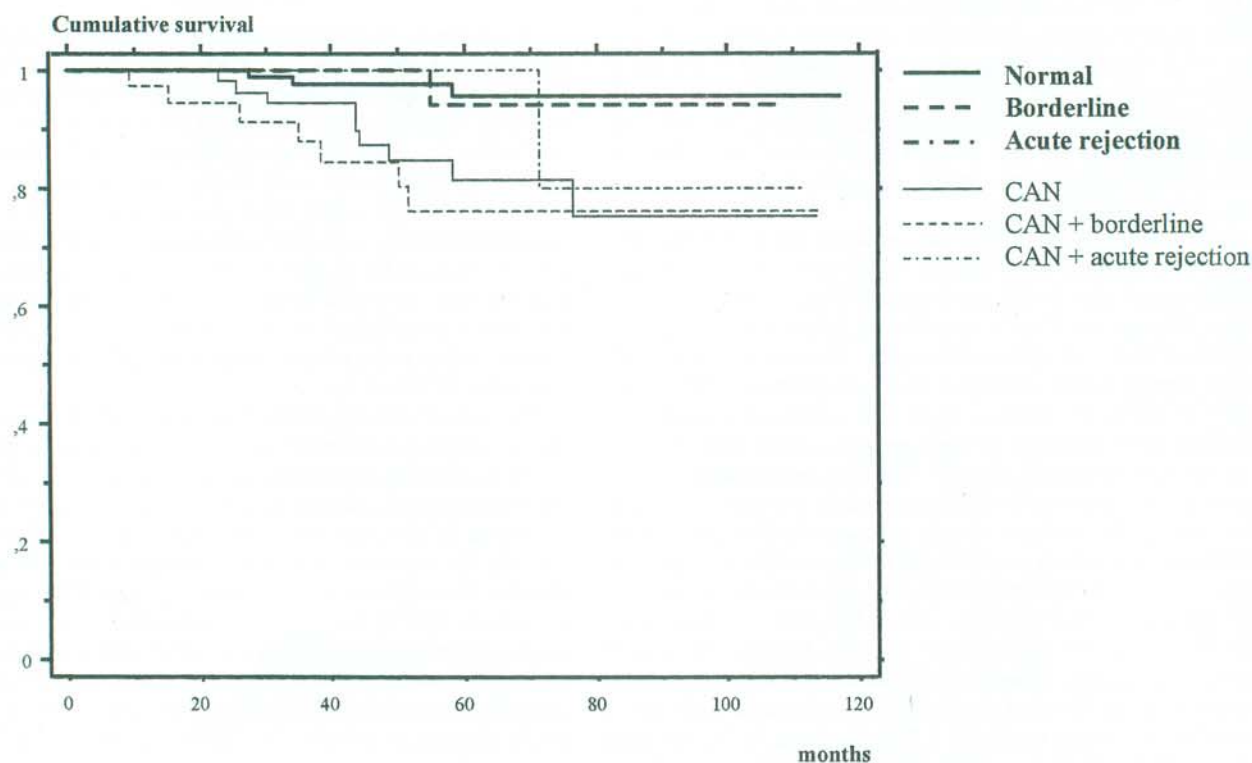


FIGURE 1. Cumulative renal allograft survival in patients with normal histology, borderline changes, acute rejection, CAN, CAN associated with borderline changes, and CAN associated with acute rejection.

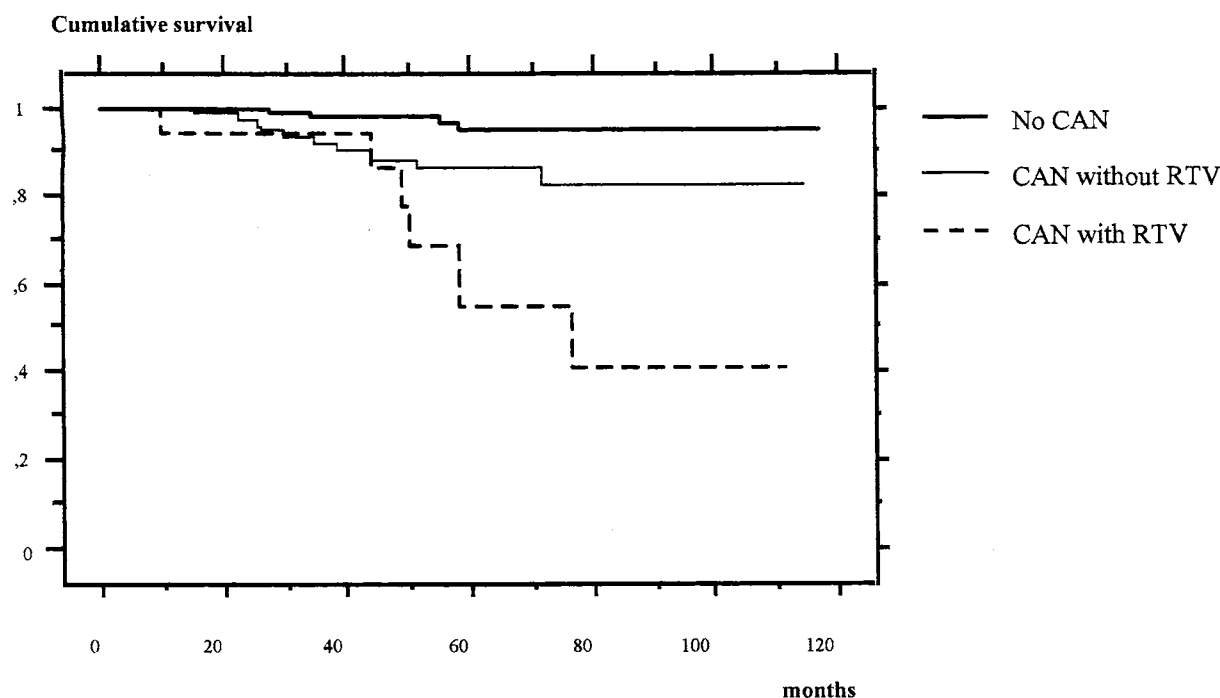


FIGURE 2. Cumulative renal allograft survival in patients without chronic allograft nephropathy (no CAN), chronic allograft nephropathy without renal transplant vasculopathy (CAN without RTV), and chronic allograft nephropathy with renal transplant vasculopathy (CAN with RTV).

either before transplantation or at the time of biopsy were not predictors of graft outcome. Multivariate Cox's regression analysis showed that histological diagnosis was the only independent predictor of graft survival (Table 3).

Protocol biopsies and clinical trials. Primary intervention trials: Since CAN either with or without RTV was diagnosed in 8 (15.7%) of 51 donor biopsy specimens and in 108 (38.3%) of 282 protocol biopsy specimens, it can be assumed that de novo CAN develops during the first 3 months of follow-up in 22.6% of patients. Thus, we calculated the minimum sample size to detect a 50% reduction of the incidence of de novo CAN from 38.3% to 27.0%. For such a hypothetical trial, 285 patients in the control and treatment groups would be necessary ($\alpha=0.05$ and $\beta=0.20$).

Since the presence of RTV was observed in 1 (1.96%) of 51 donor biopsy specimens and in 21 (7.45%) of 282 protocol biopsy specimens, it can be assumed that de novo RTV develops during the first 3 months of follow up in 5.49% of patients. Thus, we calculated again the minimum sample size to detect a 50% reduction in the incidence of RTV from 7.45% to 4.7%. For such a trial, the minimum sample size would be 1142 patients in each group ($\alpha=0.05$ and $\beta=0.20$).

Secondary intervention trials: The minimum sample size to detect a 50% increase in graft survival at 5 years was calculated using the protocol biopsy as the selection criteria for randomization into a control and treatment group. Two different settings were considered to evaluate the best design of this strategy: (a) all patients with CAN either with or without RTV would be included or (b) only patients with RTV would be included. Power calculations ($\alpha=0.05$ and $\beta=0.20$) showed that in the first setting, 217 patients in each group would be necessary to detect a 50% increase in 5-year graft survival from 81.1% to 90.5%. In the second setting, 72 pa-

tients in each group would be necessary to detect a 50% increase in graft survival from 55.1% to 77.5%. It is important to remark that in the first setting, approximately 1200 patients and in the second setting approximately 2000 patients should be biopsied for the purpose of selection.

DISCUSSION

The main findings of the present study can be summarized as follows: (a) the presence of CAN with RTV in early protocol biopsy specimens is associated with a low long-term graft survival, whereas CAN without RTV implies a less ominous prognosis; (b) donor age, acute rejection, cold ischemia time, and mean CsA levels until biopsy are associated with the presence of CAN, while total serum cholesterol is the only variable that distinguished between patients displaying CAN with or without RTV; and (c) power calculations showed that protocol biopsies could become a useful tool to reduce sample size and time of follow-up at least in a primary intervention trial aimed to reduce the incidence of CAN at approximately 3 months of follow-up.

Transplant vasculopathy has been well characterized in the transplanted heart (2, 3, 26), and the prospective angiographic assessment of vessel narrowing at 1 year of follow-up has facilitated the demonstration of the efficacy of statins or diltiazem in the prevention of transplant vasculopathy (27, 28). On the contrary, there are no diagnostic procedures to monitor the appearance and progression of CAN either with or without RTV in the transplanted kidney. CAN is suspected by the presence of a slow decline of renal function, usually in conjunction with proteinuria and hypertension (3). However, once the diagnosis is histologically confirmed, the severity of renal lesions is usually too advanced to expect that any treatment could halt the progression of renal failure (11). The

TABLE 1. Characteristics of patients classified according to the histological diagnosis at the time of surgery

	No CAN (n=174)	CAN without RTV (n=87)	CAN with RTV (n=21)	P
Donor age (yr)	33±16	38±17 ^a	40±17 ^a	0.040
Donor sex (male/female)	117/57	60/27	17/4	NS
HBD/NHBD	160/14	81/6	20/1	NS
Recipient age (yr)	45±14	43±13	42±14	NS
Recipient sex (male/female)	103/71	57/30	12/9	NS
BSA (m ²)	1.72±0.17	1.72±0.18	1.71±0.26	NS
Number of transplant (1st, 2nd)	146/28	77/10	18/3	NS
HCV serology (positive/negative) ^c	28/144	19/66	1/20	NS
Etiology of ESRD				
Glomerular	67	29	11	
Interstitial	33	23	4	
APKD	26	9	1	
Nephrosclerosis	9	7	1	
Unknown	39	19	4	NS
Time on dialysis (mo)	34±36	39±37	28±28	NS
Hypertension on dialysis (yes/no)	88/86	37/50	12/9	NS
Cholesterol before surgery (mmol/L)	4.5±1.1	4.6±1.1	5.3±1.6 ^{a,b}	0.009
Last PRA (%)	9±21	10±21	0.5±1	NS
HLA A+B+DR mismatches	2.9±1.1	2.9±1.1	3.0±1.3	NS
CIT (hr)	23±6	25±7 ^a	25±9	0.021

Abbreviations used in table: HBD, heart-beating donor; NHBD, non-heart-beating donor; BSA, body surface area; HCV, hepatitis C virus; ESRD, end-stage renal disease; APKD, adult polycystic kidney disease; PRA, panel-reactive antibodies; CIT, cold ischemia time.

^a P ≤ 0.05 vs. No CAN.

^b P ≤ 0.05 vs. can without RTV.

^c Serologic HCV was not available in 4 cases.

TABLE 2. Clinical evolution of patients according to histological diagnosis

	No CAN (n=174)	CAN without RTV (n=87)	CAN with RTV (n=21)	P
Immunosuppression				
CsA + PN	9	9	1	
Induction + CsA + PN	93	60	12	
MMF + CsA + PN	37	15	4	
Aza + CsA + PN	21	3	3	
Anti-LFA1 + Aza + CsA + PN	4	0	0	
Induction + MMF + PN	10	0	1	NS
DGF (yes/no)	30/144	18/69	5/16	NS
AR (yes/no)	27/147	25/62	6/15	0.008
Borderline	4	2	0	
AR grade I	9	6	1	
AR grade IIa	5	7	1	
AR grade IIb	1	0	2	NS
No sample	1	0	1	
No biopsy	7	10	1	
Time of biopsy (days)	111±52	103±45	104±46	NS
SCr at the time of biopsy (μmol/L)	135±41	159±47 ^a	158±58 ^a	0.001
Proteinuria at the time of biopsy (mg/24 hr)	280±180	360±210 ^a	390±280 ^a	0.004
Cholesterol (mmol/L)	5.7±1.1	5.8±0.9	6.4±1.3 ^{a,b}	0.020
Hypertension (yes/no)	54/120	45/42	11/10	0.002
CsA mean dose (mg/kg/day)	5.9±2.8	6.4±2.1	6.0±1.8	NS
CsA mean levels (ng/ml)	206±73	231±74 ^a	213±67	0.027

Abbreviations used in table: Anti-LFA1, anti-leukocyte function-associated molecule-1 antibodies; AR, acute rejection; Aza, azathioprine; DGF, delayed graft function; MMF, mycophenolate mofetil; SCr, serum creatinine.

^a P ≥ 0.05 vs. No CAN.

^b P ≥ 0.05 vs. CAN with RTV.

less precise characterization of the natural history of CAN in the kidney than in the heart has been responsible for some generalized assumptions that have never been properly documented. For example, there is an international consensus supporting that RTV is an uncommon condition before the sixth month of transplantation (3, 29), and it is also accepted that RTV can be frequently missed due to the small sample size of a core biopsy (5, 6). In the present study, RTV was present in 7.5% of stable grafts at 3 months, which can be

considered a rather high incidence, taking into account the early timing of protocol biopsies. Furthermore, the observation that the presence of RTV implies such a different long-term prognosis not only suggests that CAN with and without RTV represent two different clinical conditions, but also implies that RTV in patients with stable function is a rather diffuse process that can be sampled by means of a core biopsy with a reasonable accuracy. Further support for this notion comes from the observation that fibrous intimal thickening in

TABLE 3. Risk factors for graft failure

Variable	RR (95% CI)	RR (95% CI)
SCr	1.009 (1.001–1.016)	1.001 (0.992–1.010)
Proteinuria	1.002 (1.001–1.004)	1.002 (0.999–1.003)
Histological diagnosis		
CAN without RTV	4.64 (1.44–14.95)	4.53 (1.39–14.82)
CAN with RTV	13.61 (3.73–49.62)	9.45 (2.32–38.41)

Relative risks and 95% confidence interval for univariate and multivariate Cox's proportional hazard model.

donor biopsy specimens is also a powerful predictor of renal allograft survival (30). Taken together, these results support the differentiation between CAN with and without RTV as has been proposed in the 1997 Banff classification (5, 6).

The study of the risk factors for the development of CAN showed that tubulointerstitial chronic lesions mainly depend on preexisting donor damage, cold ischemia time, CsA levels, and the presence of acute rejection as has been previously described (12–15, 31), whereas the only independent predictor of RTV was total serum cholesterol. The association between elevated total serum cholesterol and RTV suggests that either the appearance or the progression of vascular damage observed at 3 months was partly recipient dependent. This interpretation is further supported by the low incidence of RTV observed in the studied set of donor biopsy specimens. The contribution of elevated total serum cholesterol to transplant vasculopathy has been well documented in the transplanted heart (27). In the transplanted kidney, it has been shown that triglycerides constitute an independent predictor of CAN (32), while it has not been possible to dissociate the predictive value of total serum cholesterol from other predictors of CAN (33, 34). Thus, our results suggest that elevated total serum cholesterol could be a target in a primary intervention trial aimed to prevent the development and/or progression of RTV.

It has been estimated that a minimum sample size of 1500 patients followed during 3 years would be required to demonstrate a 30% improvement in renal allograft survival in a primary intervention trial ($\beta=20\%$, $\alpha=5\%$) (9). Since in our study the presence of CAN in the protocol biopsy specimen was the only independent predictor of late graft loss, we evaluated whether protocol biopsies could be used to reduce the time of follow-up or the minimum sample size in a primary or secondary intervention trial aimed to modify the natural history of CAN. We showed that a primary intervention trial in which the presence of CAN either with or without RTV in the protocol biopsy specimen performed at 3 months was considered the primary efficacy end point. This seems to be a feasible approach because approximately 300 patients in the control and treatment groups followed for only 3 months would be necessary to detect a 50% reduction in the incidence of CAN. The minimum sample size is similar to the number of patients enrolled in trials that have been recently performed to evaluate the efficacy of new immunosuppressive drugs to prevent acute rejection (19), and the main advantage of this design is that the time of follow-up is very short. This result raises the question whether later protocol biopsies could allow a further reduction in sample size in such a hypothetical primary intervention trial because the incidence of chronic lesions increases with time. However, available

data suggest that the increase in the incidence of chronic lesions at 1 year (15, 16) or 2 years of follow-up (12) is not high enough to suggest that a delay in the indication of the protocol biopsy could allow an important reduction in the minimum sample size.

Since elevated total serum cholesterol on dialysis was a predictor of CAN with RTV, we also calculated minimum sample size in a hypothetical primary intervention trial considering the presence or absence of RTV as the primary efficacy variable. In this setting, approximately 1100 patients in the treatment and control groups would be necessary to demonstrate a 50% reduction in the incidence of RTV. It should be noticed that the incidence of RTV in donor biopsy specimens could not be precisely estimated, because the proportion of donor biopsy specimens with RTV was very low. Anyway, estimated sample size is too large, and this result suggests that other strategies should be developed to monitor a trial aimed to reduce the incidence and/or severity of RTV.

On the other hand, we also evaluated the utility of the protocol biopsy in the design of a secondary intervention trial. In this case, the biopsy allows the early detection of chronic renal damage, when a therapeutical intervention could still slow the progression of renal lesions. The advantage of this design is that it allows one to select only patients with an increased risk for late graft failure, avoiding the exposure to the side effects of the study drug in patients who will probably not benefit from it. The major disadvantage of this design is that approximately 1200 patients should be biopsied to select the calculated minimum sample size of 217 patients for the control and treatment groups. Moreover, time of follow-up is necessarily long because only patients with a functioning graft at 3 months can be included. If only patients displaying RTV in the protocol biopsy specimen were randomized to receive treatment or placebo, 72 patients in each group followed during 5 years would be necessary to demonstrate a 50% reduction of late graft loss. Obviously, this design is not reasonable because approximately 2000 patients should undergo biopsy at 3 months to enroll only 144 patients with RTV.

In summary, we show that the protocol biopsy could become a useful tool to improve the design of a primary intervention trial aimed to modify the natural history of CAN, allowing a very important reduction in the time of follow-up. Furthermore, if we take into consideration that CAN represents the additive effect of preexisting donor damage and recipient-dependent factors such as acute rejection, drug nephrotoxicity, cold ischemia time, or dyslipidemia, the protocol biopsy seems a reasonable tool to control the overall effect of any therapeutical maneuver on the transplanted kidney.

REFERENCES

- Dunn J, Golden D, Van Buren CT, Lewis RM, Lawen J, Kahan B. Causes of graft loss beyond two years in the cyclosporine era. *Transplantation* 1990; 49: 349.
- O'Neill BJ, Pflugfelder PW, Singh NR, Menkis AH, McKenzie FN, Kostuk WJ. Frequency of angiographic detection and quantitative assessment of coronary arterial disease one and three years after cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1989; 63: 1221.
- Paul LC, Häyry P, Foegh M, et al. Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney

- transplants: Proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc* 1993; 25: 2020.
4. Uretsky BF, Murali S, Reddy PS, et al. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation* 1987; 76: 827.
 5. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. 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.
 6. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
 7. Azuma H, Nadeau KC, Ishibashi M, Tilney NL. Prevention of functional, structural, and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 1995; 60: 1577.
 8. Räisänen-Sokolowski A, Vuoristo P, Myllärniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Häyry P. Mycophenolate mofetil inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transplant Immunol* 1995; 3: 342.
 9. Hunsicker LG, Bennet LE. Design of trials of methods to reduce late renal allograft loss: the price of success. *Kidney Int* 1995; 48 (suppl 52): 120.
 10. Kasiske BL, Massy ZA, Guijarro C, Ma JZ. Chronic renal allograft rejection and clinical trial design. *Kidney Int* 1995; 48 (suppl 52): 116.
 11. Tullius SG, Hancock WH, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Reversibility of chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 93.
 12. Isoniemi HM, Krogerus L, Von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well functioning long term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41: 155.
 13. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 1995; 9: 79.
 14. Serón D, Móreso F, Bover J, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 310.
 15. Nickerson P, Jeffry J, Cough J, et al. Identification of clinical and histological risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 482.
 16. Nicholson ML, McCulloch TA, Harper SJ, et al. Early measurement of interstitial fibrosis predicts long-term renal function and graft survival in renal transplantation. *Br J Surg* 1996; 83: 1082.
 17. Mosteller RD. Simplified calculation of body surface area [Letter]. *N Engl J Med* 1987; 317: 1098.
 18. Grinó JM, Alsina J, Sabater R, et al. Antilymphoblast globulin, cyclosporine and steroids in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 1114.
 19. Grinó JM, Castela AM, Serón D, et al. Antilymphocyte globulin versus OKT3 induction therapy in cadaveric kidney transplantation: a prospective randomized trial. *Am J Kidney Dis* 1992; 20: 603.
 20. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345: 1321.
 21. Móreso F, Serón D, Morales JM, et al. Incidence of leukopenia and cytomegalovirus disease in kidney transplants treated with mycophenolate mofetil combined with low cyclosporine and steroid doses. *Clin Transplant* 1998; 12: 198.
 22. Grinyó JM, Gil-Vernet S, Serón D, et al. Primary immunosuppression with mycophenolate mofetil and antithymocyte globulin for kidney transplant recipients of a suboptimal graft. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2601.
 23. Hourmant M, Bedrosian J, Durand D, et al. A randomized multicenter trial comparing leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody with rabbit antithymocyte globulin as induction treatment in first kidney transplantations. *Transplantation* 1996; 62: 1565.
 24. Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). *J R Stats Soc B* 1972; 34: 187.
 25. Armitage P. *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1971: 184.
 26. Tuzcu EM, De Franco AC, Goormastic M, et al. Dichotomous pattern of coronary atherosclerosis 1 to 9 years after transplantation: insights from systematic intravascular ultrasound imaging. *J Am Cardiol* 1996; 27: 839.
 27. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333: 621.
 28. Schroeder JS, Gao SZ, Alderman EL, et al. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart transplant recipients. *N Engl J Med* 1993; 328: 164.
 29. Burke BA, Chavers BM, Gillingham KJ, et al. Chronic renal allograft rejection in the first 6 months posttransplant. *Transplantation* 1995; 60: 1413.
 30. Wang H, Solez K, Kjellstrand CM, Cockfield SM. The importance of donor vascular pathology in determining renal allograft outcome [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 702A.
 31. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1506.
 32. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49: 518.
 33. Isoniemi HM, Taskinen E, Häyry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 1195.
 34. Dimény E, Tufveson G, Lithell H, Larsson E, Siegbahn A, Fellström B. The influence of pretransplant lipoprotein abnormalities on the early results of renal transplantation. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 572.

Received 22 April 1999.

Accepted 1 September 1999.

Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts

Moreso F, Lopez M, Vallejos A, Giordani C, Riera L, Fulladosa X, Hueso M, Alsina J, Grinyó JM, Serón D
Am J Transplant. 1:82-8,2001.

Serial Protocol Biopsies to Quantify the Progression of Chronic Transplant Nephropathy in Stable Renal Allografts

Francesc Moreso^a, Marta Lopez^a,
Augusto Vallejos^a, Cora Giordani^a,
Lluís Riera^b, Xavier Fulladosa^a, Miguel Hueso^a,
Jeroni Alsina^a, Josep M. Grinyó^a and
Daniel Serón^{a,*}

^a Nephrology and ^b Urology Departments, Hospital de Bellvitge, c/Feixa Llarga s/n. 08907 l'Hospitalet, Barcelona, Spain

* Corresponding author: Daniel Serón, MD,
17664dsm@comb.es

Aim: To evaluate the utility of intimal thickness and interstitial width as a primary efficacy variable in the design of clinical trials aimed to modify the natural history of chronic allograft nephropathy.

Methods: A donor and a 4-month protocol biopsy were evaluated in 40 stable grafts according to the Banff schema. In 27 patients, a second protocol biopsy was done at 1 yr. Arterial intimal volume fraction (Vvintima/artery) and cortical interstitial volume fraction (Vvinterstitium/cortex) were estimated with a point counting technique.

Results: Chronic Banff scores increased during follow-up, while acute scores reached its peak at 4 months. Vvintima/artery and Vvinterstitium/cortex significantly increased at 4 months, but not at 1 yr. Vvintima/artery at 4 months correlated with donor Vvintima/artery ($r = 0.57$, $p < 0.001$), histocompatibility ($r = 0.38$, $p = 0.01$) and serum cholesterol ($r = 0.31$, $p = 0.047$). Vvinterstitium/cortex at 4 months correlated with recipient body surface area ($r = 0.44$, $p = 0.004$) and delayed graft function ($p = 0.016$). Power calculations showed that Vvintima/artery and Vvinterstitium/cortex allow an important reduction in minimum sample size of a hypothetical trial aimed to prevent chronic allograft nephropathy.

Conclusions: Intimal thickening and interstitial widening progresses rapidly during the first 4 months after transplantation and slowly thereafter. These parameters can be considered as a primary efficacy variable in trials aimed to prevent chronic allograft nephropathy.

Key words: Chronic transplant nephropathy, histomorphometry, protocol biopsies

Received 3 November 2000, revised and accepted for publication 9 January 2001

Introduction

Chronic allograft nephropathy (CAN) is the most common cause of late renal allograft failure (1). This condition is clinically manifested as a slow decline of renal function (2). It is histologically recognized, according to the Banff criteria, by the presence of interstitial fibrosis (ci-score) and tubular atrophy (ct-score), either associated or not with transplant vasculopathy (cv-score) (3).

While many trials aimed to prevent acute rejection have been done in the last decade, no trials aimed to prevent CAN have been performed. The main reason for this discrepancy is that the minimum sample size and minimum time of follow-up in a trial aimed to prevent CAN are too large, because the primary efficacy variable must necessarily rely on survival analysis (4,5).

The study of protocol biopsies has shown that CAN can be detected early after transplantation and that the presence of CAN in stable grafts is an independent predictor of allograft survival (6–9). Recently, we have observed in 3-month protocol biopsies, that the presence of CAN associated with transplant vasculopathy (cv-score ≥ 1), implies a poorer allograft survival than CAN without vessel involvement (10). Data obtained from the study of donor biopsies further sustain the notion that vessel narrowing is a major determinant of outcome (11,12). Taken together, these observations suggested that the presence of chronic renal damage in protocol biopsies associated or not with chronic vascular damage, could be considered a primary efficacy variable in a hypothetical trial aimed to prevent CAN. Unfortunately, power calculations have shown that the minimum sample size in such a hypothetical trial is still too large (10).

Although different morphometric approaches have shown that quantification of chronic renal damage in donor (13–15) and protocol biopsies (16–18) correlates with graft outcome, the utility of quantitative parameters as a primary efficacy variable in a hypothetical clinical trial aimed to modify the natural history of CAN has not been explored. Thus, the aim of the present study is to characterize the temporal evolution of intimal thickening and interstitial widening in stable grafts during the first year of follow-up using a morphometric approach. Moreover, we evaluate whether these quantitative parameters may allow to reduce minimum sample size in a hypothetical trial aimed to prevent intimal thickening or interstitial widening.

Materials and Methods

Patients

Between June 1988 and October 1997, a prospective study of protocol renal allograft biopsies was conducted in our center. During this period of time we performed 576 cadaveric renal transplants. A first protocol renal allograft biopsy was performed at the 4th month of the follow-up in patients who gave their informed consent and fulfilled the following criteria: (a) serum creatinine $<300\mu\text{mol/L}$; (b) proteinuria $<1\text{ g}/24\text{ h}$; and (c) stable renal function, defined as variability of serum creatinine of less than 15% during two weeks before and after biopsy. A second protocol biopsy was performed at 1 yr of the follow-up regardless of serum creatinine or proteinuria.

Consecutive donor biopsies were performed during two time periods in our center: (a) between November 1988 and June 1989 and (b) between December 1995 and June 1997. Patients with a donor and a first protocol biopsy were included in the present study, regardless of the second protocol biopsy being available.

Definition of clinical variables

The following variables were evaluated in each patient at the time of surgery: donor type (heartbeating or nonheartbeating), age and sex of the donor and the recipient, height and weight of the recipient, presence of hepatitis C virus antibodies, etiology of end-stage renal disease, time on dialysis, hypertension and total serum cholesterol before transplantation, last panel reactive antibodies, number of HLA mismatches, and cold ischemia time (CIT). After surgery, the presence of delayed graft function (DGF) and acute rejection were evaluated. At the time of protocol biopsies and during follow-up, serum creatinine, proteinuria, total serum cholesterol, hypertension, cyclosporine (CsA) dose and CsA levels were recorded.

Body surface area (BSA) was calculated from recipient weight and height according to the Mosteller's formula (19). Number of HLA mismatches was calculated as the addition of the number of mismatches in the A, B and DR loci.

DGF was defined as hemodialysis requirements during the first week after surgery once accelerated or hyperacute rejection, vascular complications and urinary tract obstruction were ruled out. The diagnosis of acute rejection was defined as an acute rise of serum creatinine $>30\%$ that responded to antirejection therapy. A diagnostic biopsy at the time of serum creatinine worsening was done in 91% of patients. Hypertension before and after transplantation was defined as a mean arterial pressure $>107\text{ mmHg}$ (blood pressure of approximately $140/90\text{ mmHg}$) and/or the requirement of antihypertensive drugs.

Mean CsA dose received until the first protocol biopsy was calculated from the CsA dose at days 1, 7, 14, 30, 60, 90 and the day of the first protocol biopsy. Mean CsA level was calculated from CsA levels at the same periods of time.

During this period of time, different combinations of immunosuppressive drugs were employed: (a) cyclosporine (CsA) and prednisone (PN); (b) concomitant induction therapy with antilymphocytic antibodies, CsA and PN; (c) triple standard regimen with CsA, azathioprine and PN; (d) triple regimen with CsA, mycophenolate mofetil and PN; (e) concomitant induction therapy with antileukocyte function-associated molecule 1 antibodies, CsA, azathioprine and PN; and (f) induction therapy with antilymphocytic antibodies, mycophenolate mofetil and PN (10). Accordingly, no attempts were made to analyze the possible effect of treatment on graft histology.

Biopsies

Donor and recipient biopsies were performed and processed for routine light microscopy as previously described (9). Briefly, tissue was embedded

in paraffin, cut into $4\text{-}\mu\text{m}$ sections and stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, Masson's trichrome and silver methenamine. Renal lesions in donor and protocol biopsies were graded and diagnosed according to the 1997 Banff criteria by two observers in the absence of any clinical information. According to the 1997 Banff criteria, an adequate specimen is defined as a biopsy containing at least 10 glomeruli and two arterial sections and the threshold for a minimal sample is seven glomeruli and one arterial section (3).

Silver methenamine stained sections were employed for histomorphometric analysis. Cortical interstitial volume fraction ($V_{\text{interstitium/cortex}}$) was estimated by means of a point counting technique at $200\times$ magnification using all the available cortical tissue. A graticule of 560 points (35 coarse and 525 fine points) was added to each field displayed on a television screen and the number of fine points hitting the space of interest (P1) and the number of coarse points hitting the reference space (P2) were counted. The volume fraction was estimated according to:

$$V_v = (P1)/(P2 \times 16) \times 100 \quad (1)$$

Interstitial space was defined as the area between tubular membranes. Points intersecting tubular basal membrane were considered as tubular points.

Arterial intimal volume fraction ($V_{\text{intima/artery}}$) was also estimated by means of a point counting technique at $400\times$ magnification using the same graticule. An arterial section was defined as the space inside the adventitia. The intima was defined as the space lying between the inner elastica and the lumen. In arteries showing reduplication of the inner elastica, the intima was considered the vascular space inside the outer layer of the inner elastica.

Donor and protocol biopsies were not available to clinicians and consequently were not employed to take any clinical decision.

Statistics

Results are expressed as the mean \pm standard deviation. Comparison between groups was performed by means of the chi-square test for categorical data, Friedman test for nonparametric data (Kendall test for individual comparisons) and the analysis of variance for repeated measures in case of continuous variables (Scheffé test for individual comparisons). The Spearman correlation coefficient (ρ) was employed to study the relationship between ordinal data. Simple regression analysis and stepwise multiple regression analysis were employed to study the relationship between quantitative clinical variables and histomorphometric parameters. All p-values were two-tailed and a p-value <0.05 was considered significant.

Power calculations were performed to estimate minimal sample size in a hypothetical primary intervention trial in which intimal thickening and interstitial widening at 4 months and 1 yr of the follow-up was considered the primary efficacy variable. These calculations were done considering an α error of 5%, and two different β errors (20% and 10%).

Results

Patients

A total of 107 donor biopsies were performed at our hospital during the study period. In 50 patients, the first protocol biopsy was not performed for the following reasons: early graft failure ($n=5$), serum creatinine $>300\mu\text{mol/L}$ ($n=7$), proteinuria $>1\text{ g/d}$ ($n=8$), technical problems ($n=12$) and re-

Table 1: Demographic characteristics of patients in whom the donor, first and second protocol biopsies were available

	Mean \pm SD	Range
Number of patients	27	
Donor age (yr)	31 \pm 14	14–63
Donor sex (male/female)	18/9	
Donor type (HBD/non-HBD)	24/3	
Recipient age	44 \pm 13	22–68
Recipient sex	13/14	
Transplant (1st/2nd)	25/2	
Last PRA (%)	2.9 \pm 6.5	0–25
A + B + DR mismatches	3.0 \pm 0.9	1–5
Cold ischemia time (h)	22 \pm 5	10–37
DGF (no/yes)	22/5	
Acute rejection (no/yes)	20/7	

HBD = heart beating donor; PRA = panel reactive antibodies.

fused consent (n = 18). Thus, the first protocol biopsy was done in 57 patients.

A donor and a first protocol biopsy with sufficient cortical tissue were available in 40 out of these 57 patients. In this set of 40 patients, a second protocol biopsy was performed in 35 cases and sufficient cortical tissue for evaluation was available in 27 cases. In the other five cases, the protocol biopsy at 1 yr was not done owing to technical problems (n = 2), patient death with a functioning graft (n = 1) and acute graft dysfunction owing to biopsy proven late rejection at the time of second protocol biopsy (n = 2). The first protocol biopsy was performed at approximately 4 months (128 \pm 68 d) and the second protocol biopsy at approximately 1 yr (435 \pm 88 d).

Table 2: Temporal evolution of histological Banff scores

	Donor biopsy	1st biopsy	2nd biopsy	p
g	0	0.15 \pm 0.36	0.04 \pm 0.19	NS
i	0	0.70 \pm 0.82 ^a	0.52 \pm 0.64 ^a	0.0003
t	0	0.59 \pm 0.80 ^a	0.22 \pm 0.51	0.0002
v	0	0	0	NS
Acute index	0	1.44 \pm 1.55 ^a	0.78 \pm 1.32 ^a	0.0001
ah	0.15 \pm 0.46	0.22 \pm 0.51	0.26 \pm 0.53	NS
cg	0.07 \pm 0.27	0.15 \pm 0.36	0.41 \pm 0.57 ^{a,b}	0.0055
ci	0.11 \pm 0.32	0.30 \pm 0.46	0.81 \pm 0.74 ^{a,b}	0.0001
ct	0.07 \pm 0.27	0.30 \pm 0.54	0.81 \pm 0.74 ^{a,b}	0.0001
cv	0.04 \pm 0.19	0.11 \pm 0.42	0.07 \pm 0.27	NS
Chronic index	0.30 \pm 0.95	0.85 \pm 1.38	2.10 \pm 1.97 ^{a,b}	0.0001

^a 1st or 2nd biopsy vs. donor biopsy p < 0.05.

^b 2nd biopsy vs. 1st biopsy p < 0.05.

g: glomerulitis, i: interstitial infiltrate, t: tubulitis, v: vasculitis, ah: arteriolar hyalinosis.

Table 3: Temporal evolution of histological lesions in the 27 patients in whom the donor biopsy, first and second protocol biopsies were available

	Donor biopsy	1st biopsy	2nd biopsy	p
Vvinterstitium/cortex (%)	11.1 \pm 3.5	15.8 \pm 7.6 ^a	17.5 \pm 7.4 ^a	0.0015
Vvintima/artery (%)	11.6 \pm 7.6	18.0 \pm 8.1 ^a	18.5 \pm 9.0 ^a	0.0001

^a 1st or 2nd biopsy vs. donor biopsy p < 0.05.

Temporal evolution of renal lesions

In the first part of the study, the temporal evolution of renal lesions during the first year of the follow-up was studied. This analysis was done in the 27 patients in whom the donor, first and second protocol biopsies were available; their demographic characteristics are summarized in Table 1. Serum creatinine at the time of the first and second protocol biopsies were 138 \pm 42 μ mol/L and 134 \pm 35 μ mol/L [p = NS (not significant)]. Proteinuria at the time of the first and second protocol biopsies was 0.27 \pm 0.18 g/d and 0.29 \pm 0.33 g/d (p = NS).

The mean number of glomeruli in the zero biopsy, in the first and second protocol biopsies were 14 \pm 9, 16 \pm 8 and 14 \pm 7. The mean number of arterial sections in the three biopsies were 2.4 \pm 1.2, 2.5 \pm 1.4 and 2.7 \pm 1.5, respectively. The evolution of Banff scores during this period of time is summarized in Table 2. Chronic renal damage increased during the whole observation period, while mild acute lesions present at 4 months tended to decrease at 1 yr.

Morphometric analysis showed that Vvinterstitium/cortex and Vvintima/artery were significantly increased at the time of the first protocol biopsy, but no further significant increase of these parameters was observed at 1 yr of the follow up (Table 3).

Banff scores and histomorphometry

The relationship between Banff scores of vascular damage and Vvintima/artery, as well as Banff scores of interstitial damage and Vvinterstitium/cortex were evaluated. There was no correlation between Vvintima/artery and v-score or cv-score in any of the three studied set of biopsies.

Vvinterstitium/cortex in the donor and in the second protocol biopsies was associated with ci-score ($\rho = 0.48$, $p = 0.0025$ and $\rho = 0.57$, $p = 0.0034$, respectively), while Vvinterstitium/cortex in the first protocol biopsy was associated with i-score ($\rho = 0.52$, $p = 0.001$).

Predictors of renal damage

Taking into consideration that the most important widening of the arterial intima and interstitial space was observed in the first protocol biopsy and that the second protocol biopsy was not available in all patients, the statistical analysis focused on the study of the predictors of Vvintima/artery and Vvinterstitium/cortex at 4 months of the follow-up. The demographic characteristics of these 40 patients are summarized in Table 4. Donor renal lesions and recipient clinical parameters were considered the independent variables, while Vvintima/artery and Vvinterstitium/cortex at 4 months of the follow-up were considered the dependent variables. There was no correlation between Vvintima/artery and Vvinterstitium/cortex and, accordingly, factors associated with intimal and interstitial expansion were analyzed separately.

Predictors of Vvintima/artery at 4 months

The univariate analysis identified three variables associated with Vvintima/artery in the first protocol biopsy: Vvintima/artery in the donor biopsy ($r = 0.57$, $p = 0.0001$), the number of HLA mismatches ($\rho = 0.34$, $p = 0.032$) and total serum cholesterol at the time of the first protocol biopsy ($r = 0.31$, $p = 0.047$).

Eleven out of 40 patients experienced an episode of acute rejection before performing the protocol biopsy. In eight out of these 11 patients, a biopsy with sufficient tissue was obtained and the histological diagnosis were: borderline ($n = 1$), grade Ia ($n = 1$), grade Ib ($n = 1$), grade IIa ($n = 4$) and grade IIb ($n = 1$). The biopsy was insufficient for diagnosis in two cases and was not done in one patient. The influence of acute rejection before the first protocol biopsy on Vvintima/artery at 4 months was analyzed. Although Vvintima/artery was higher in patients who experienced an episode of acute

rejection ($19.4 \pm 10.3\%$) than in rejection-free patients ($16.4 \pm 6.2\%$), this difference did not reach statistical significance.

Multivariate stepwise regression analysis was done in order to identify independent predictors of Vvintima/artery in the first protocol biopsy. For this purpose, only variables showing a significant association with Vvintima/artery at 4 months in the univariate analysis were considered. Vvintima/artery in the donor biopsy was the only independent predictor of Vvintima/artery at 4 months.

Predictors of Vvinterstitium/cortex at 4 months

Univariate analysis identified two predictors of Vvinterstitium/cortex at 4 months: recipient BSA ($r = 0.44$, $p = 0.004$) and DGF. Vvinterstitium/cortex was $24.5 \pm 10.8\%$ in patients with DGF and $15.7 \pm 7.3\%$ in patients with early function ($p = 0.016$).

Once again, stepwise multivariate regression analysis was done in order to identify independent predictors of Vvinterstitium/cortex in the 4-month protocol biopsy. For this purpose, DGF was transformed into two dummy variables. This analysis showed that BSA was the only independent predictor of Vvinterstitium/cortex at 4 months.

Intimal thickening and interstitial widening as a primary efficacy variable in clinical trials

Intimal thickness increased from $11.6 \pm 7.6\%$ in the donor biopsy to $18.0 \pm 8.1\%$ in the 4-month protocol biopsy. Thus, we calculated the minimum sample size to detect a 50% reduction of intimal thickening from 18.0% to 14.8%. For such a hypothetical trial, 49 ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) or 65 ($\beta = 10\%$, $\alpha = 5\%$) patients in the control and treatment groups would be necessary. A similar sample size, 50 ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) or 67 ($\beta = 10\%$, $\alpha = 5\%$) patients in the control and treatment groups, would be necessary in the case of 1-yr protocol biopsies being considered the primary efficacy end-point.

Interstitial volume fraction increased from $11.1 \pm 3.5\%$ in the donor biopsy to $15.8 \pm 7.6\%$ in the first protocol biopsy. Thus, minimum sample size to detect a 50% reduction of Vvinterstitium/cortex from 15.8 to 13.4%, would be 63 ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) or 84 ($\beta = 10\%$, $\alpha = 5\%$) patients in the control and treatment groups. The same calculation in the case of 1-yr biopsy being considered the primary efficacy variable, shows that 42 ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) or 57 ($\beta = 10\%$, $\alpha = 5\%$) patients in the control and treatment groups would be necessary.

Discussion

The natural history of transplant vasculopathy has been well characterized in the heart transplant owing to the prospective surveillance of intimal thickening by means of coronary angiographies and/or intravascular ultrasounds. This information has been crucial to identify risk factors associated with transplant vasculopathy and to develop efficient therap-

Table 4: Demographic characteristics of patients in whom the donor and first protocol biopsies were available

	Mean \pm SD	Range
Number of patients	40	
Donor age (yr)	34 \pm 15	14–58
Donor sex (male/female)	22/18	
Donor type (HBD/non-HBD)	35/5	
Recipient age	44 \pm 13	20–68
Recipient sex	21/19	
Transplant (1st/2nd)	37/3	
Last PRA (%)	3.5 \pm 7.4	0–26
A + B + DR mismatches	3.1 \pm 1.0	1–5
Cold ischemia time (h)	22 \pm 5	10–37
DGF (no/yes)	34/6	
Acute rejection (no/yes)	29/11	

HBD = heart beating donor; PRA = panel reactive antibodies.

ies (20–23). In the kidney, the natural history of CAN is not so well characterized, mainly owing to the lack of tools to monitor the appearance and progression of chronic lesions in the different renal compartments. This situation represents an important limitation in order to develop strategies either to prevent or treat CAN.

Different centers have prospectively evaluated histologic renal lesions by means of protocol biopsies, showing that the early diagnosis of CAN implies a poor outcome (6,8,9,24). Recently, it has been documented in 4-month protocol biopsies that CAN associated with transplant vasculopathy implies a poorer prognosis than CAN without vessel narrowing (10). Furthermore, an association between pre-existing chronic vascular damage in the donor and decreased renal allograft survival has been described (11,12). These observations point out the importance of renal transplant vasculopathy as a major predictor of outcome and raise the question whether protocol biopsies could be employed to monitor the appearance and progression of transplant vasculopathy in the kidney in a similar way to how intracoronary ultrasounds have been employed in the heart (25). However, only a few arterial sections are obtained in a renal biopsy, as the sampling efficacy of this procedure is lower than intracoronary ecography. Furthermore, intimal thickness is estimated with a quantitative parameter in the heart and with a semiquantitative parameter in the kidney. Taking into account these limitations, we explored the utility of the quantification of intimal thickness in sequential protocol renal biopsies. Because in any study of serial biopsies the probability to obtain a sufficient sample in all biopsies taken from the same patient decreases as the number of biopsies increases, we included biopsies with a minimal sample size (at least seven glomeruli and one arterial section) as defined in the 1997 Banff criteria (3). In this study, the probability to obtain a minimal sample in one biopsy was approximately 0.84. Thus, the probability to obtain a minimal sample in the donor, first and second protocol biopsies was 0.59. These data reflect why only in 27 out of 57 patients, sufficient tissue was obtained in the three sequential biopsies. If we had considered only adequate samples according to 1997 Banff criteria (at least 10 glomeruli and two arterial sections), only 10 patients would have been included.

In the present study, no correlation between intimal widening and the Banff scores of acute or chronic vascular damage was observed. This is an expected result because the degree of intimal widening in the majority of patients was under the threshold of the diagnosis of mild chronic vascular damage (cv-score). A significant widening of the intima was seen at 4 months of the follow-up, while only a minimal and nonsignificant further increase occurred at 1 yr. This temporal pattern shows that intimal widening occurs very early after transplantation and points out that any therapeutical maneuver aimed to modify the natural history of transplant vasculopathy should start as early as possible. Vascular thickening at 4 months was associated with pre-existing donor chronic vascular damage, the degree of histocompatibility and total

serum cholesterol. The association between pre-existing donor and recipient vascular damage in protocol biopsies was an expected result that has already been described (7). On the contrary, the association between the degree of histocompatibility and arterial narrowing at 4 months was less expected. The degree of histocompatibility is a major risk factor for late renal allograft survival (26). In different studies of protocol biopsies it has been shown that acute rejection, but not histocompatibility, is a major risk factor for the early diagnosis of CAN (6,7,9,24). Thus, the present data suggest that even in rejection-free patients, the alloimmune response is determinant in the early development of intimal thickening.

The importance of serum cholesterol in the development and progression of transplant vasculopathy is beyond doubt in the transplanted heart (21). Nevertheless, the potential role of serum cholesterol as a determinant of chronic vascular damage in the kidney has been more elusive (6,27). Only recently, in a study including a large number of early protocol biopsies, has it been possible to show that recipient total serum cholesterol is an independent predictor of chronic vascular damage (10). In the present study, total serum cholesterol was associated with intimal widening, pointing out that hypercholesterolemia after transplantation may contribute to the early development of transplant vasculopathy in the kidney. Thus, treatment with cholesterol lowering agents could prevent the appearance and/or progression of transplant vasculopathy in the kidney as it has been previously demonstrated in the heart (21).

Interstitial space also increased at 4 months, while only a small further increase occurred at 1 yr. Nicholson et al. have described a similar temporal evolution of Vvinterstitium/cortex in a study of serial protocol biopsies (16). They showed that Vvinterstitium/cortex at 6 months, but not earlier, was associated to late allograft survival when patients with the histological diagnosis of acute rejection were excluded. In our study, we showed that Vvinterstitium/cortex mainly measured the degree of interstitial fibrosis in donor and late protocol biopsies, while this parameter correlated with the degree of interstitial infiltrate in early protocol biopsies. Thus, our data show that Vvinterstitium/cortex in protocol biopsies reflects acute or chronic interstitial damage depending on the timing of protocol biopsy. Consequently, Vvinterstitium/cortex does not seem an adequate surrogate marker of CAN, pointing out the necessity to define accurate measures of interstitial fibrosis in allograft biopsies. Different attempts have been made to improve the accuracy of interstitial fibrosis measurement. For example, it has been shown that the quantification of the stained area with collagen III or sirius red in protocol biopsies obtained at 6 months post-transplant correlates with long-term graft function (17,18). Moreover, it has been shown that image analysis allows a very precise quantification of chronic renal damage in sirius red stained biopsies obtained from patients with different chronic nephropathies (28,29). Taking into consideration that interstitial fibrosis measured according to Banff criteria constitutes a powerful predictor of late renal allograft outcome (6,8–10),

the definition of an appropriate quantitative measure of chronic graft damage deserves further study.

Interstitial widening was associated with recipient BSA and DGF. Recipient BSA, a surrogate measure of metabolic demand, was the most important predictor of interstitial widening. In large epidemiological studies, it has been shown that graft survival is decreased in extremely large recipients (30). Furthermore, in a study analyzing the influence of recipient BSA differences in transplanted pairs of kidneys harvested from the same donor, it has also been shown that relatively small differences in recipient BSA influence renal allograft evolution (31). Thus, in the present study, we show that recipient size not only implies functional, but also anatomical, detrimental consequences on the allograft.

As it has been previously described, we observed that the presence of DGF was a predictor of interstitial widening at 4 months (7). This result could be anticipated taking into consideration that DGF is associated with an increased recruitment of inflammatory cells and an increased risk for the development of acute rejection (32,33). Even in rejection-free patients, DGF is an independent risk factor for late graft failure owing to CAN (34).

The observation that different risk factors were associated with Vvintima/artery and with Vvinterstitium/cortex points out that the susceptibility of the different renal allograft compartments to a given insult is rather variable (7,10,35) and raises the possibility that strategies aimed to prevent transplant vasculopathy could be rather inefficient to prevent the glomerular or tubulointerstitial chronic damage.

In a previous study, protocol biopsies performed at 4 months and evaluated according to the Banff schema were used to estimate the minimum sample size in a primary intervention trial aimed to demonstrate a 50% reduction in the incidence of CAN or to demonstrate a 50% reduction of transplant vasculopathy (cv-score ≥ 1). Estimated minimum sample size ($\beta = 20\%$, $\alpha = 5\%$) was 285 and 1142 patients in the treatment and control groups, respectively (10). These figures are still too large suggesting that a semiquantitative evaluation of histologic damage is not the optimal approach. In contrast, in the present study, only 49 patients in each group would be necessary to detect a 50% reduction in the progression of intimal thickening at 4 months ($\alpha = 5\%$, $\beta = 20\%$). Even if we consider a more restrictive criteria to estimate minimum sample size ($\alpha = 5\%$, $\beta = 10\%$), only 65 patients per group would be necessary. Although similar figures were obtained when Vvinterstitium/cortex was considered the primary efficacy variable, the utility of this parameter to monitor interstitial fibrosis should be considered with caution. Thus, in the present study, we not only reinforce the notion that evaluation of chronic renal damage in protocol biopsies can become a useful tool to monitor clinical trials aimed to modify the natural history of CAN, but we also show that evaluation of biopsies with a rather simple morphometric approach may allow an important reduction in the minimum sample size.

In summary, we show that intimal thickening and interstitial widening occur rapidly during the first 4 months after transplantation and progress slowly thereafter. The observation that recipient factors, such as degree of histocompatibility and elevated total serum cholesterol, are associated with Vvintima/artery suggest that policies to improve HLA matching and the administration of cholesterol lowering agents might have a beneficial effect in the prevention of early transplant vasculopathy. Morphometric evaluation of intimal thickening and/or interstitial widening may allow an important reduction in the minimum sample size in trials aimed to prevent the progression of CAN.

Acknowledgments

This study was supported by FIS grant 96/0865, by a PENZA grant from Esteve Laboratories and a grant from Fundació La Marató TV3.

References

1. Dunn J, Golden D, Van Buren CT, Lewis RM, Lawen J, Kahan B. Causes of graft loss beyond two years in the cyclosporine era. *Transplantation* 1990; 49: 349–353.
2. Paul LC, Häyry P, Foegh M et al. Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: Proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc* 1993; 25: 2020–2023.
3. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713–723.
4. Kasiske BL, Massy ZA, Guijarro C, Ma JZ. Chronic renal allograft rejection and clinical trial design. *Kidney Int* 1995; 48 (Suppl. 52): S116–S119.
5. Hunsicker LG, Bennett LE. Design of trials of methods to reduce late renal allograft loss: the price of success. *Kidney Int* 1995; 48 (Suppl. 52): S120–S123.
6. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 1995; 9: 79–84.
7. Kuypers DRJ, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RDM, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at 3 months. *Transplantation* 1999; 67: 1222–1230.
8. Nickerson P, Jeffery J, Gough J et al. The identification of clinical and histopathological risk factors of diminished renal function 2 years post-transplant. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 482–487.
9. Serón D, Moreso F, Bover J et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 310–317.
10. Serón D, Moreso F, Ramón JM et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2000; 69: 1849–1855.
11. Wang H, Solez K, Kjellstrand CM, Cockfield SM. The importance of donor vascular pathology in determining renal allograft outcome (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 702A.
12. Bosmans JL, Woestenburg A, Ysebaert DK et al. Fibrous intimal thickening at implantation as a risk factor for outcome of cadaveric renal allografts. *Transplantation* 2000; 69: 2388–2394.
13. Serón D, Carrera M, Griño JM et al. Relationship between donor renal interstitial surface and post-transplant function. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 539–543.
14. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO.

- Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation* 1995; 60: 334–339.
15. Abdi R, Slakey D, Kittur D, Burdick J, Racusen L. Baseline glomerular size as a predictor of function in human renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 329–333.
 16. Nicholson ML, McCulloch TA, Harper SJ et al. Early measurement of interstitial fibrosis predicts long renal function and graft survival in renal transplantation. *Br J Surg* 1996; 83: 1082–1085.
 17. Nicholson ML, Bailey E, Williams S, Harris KPG, Furness PN. Computerized histomorphometric assessment of protocol renal transplant biopsy specimens for surrogate markers of chronic rejection. *Transplantation* 1999; 68: 236–241.
 18. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, McKenna RM, Gough J, Rush D. Protocol biopsy prediction of long term renal allograft survival: using computerized image analysis of Sirius red stained fibrosis (Abstract). *Transplantation* 2000; 69: S363.
 19. Mosteller RD. Simplified calculation of body surface area (Letter). *N Engl J Med* 1987; 317: 1098.
 20. Uretsky BF, Murali S, Reddy PS et al. Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy cyclosporine and prednisone. *Circulation* 1987; 76: 827–834.
 21. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H et al. Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995; 333: 621–627.
 22. Shroeder JS, Gao SZ, Alderman EL et al. A preliminary study of diltiazem in the prevention of coronary artery disease in heart transplant recipients. *N Engl J Med* 1993; 328: 164–170.
 23. Lamich R, Ballester M, Martí V et al. Efficacy of augmented immunosuppressive therapy for early vasculopathy in heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 413–419.
 24. Isoniemi HM, Krogerus L, Von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well functioning long term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41: 155–160.
 25. Rickenbacher PR, Pinto FJ, Lewis NP et al. Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasounds after cardiac transplantation. *Circulation* 1995; 92: 3445–3452.
 26. Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS scientific registry. In: Terasaki PI, Cecka JM, eds. *Clinical Transplants 1993*. Los Angeles, USA: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1994, pp. 1–18.
 27. Isoniemi HM, Taskinen E, Häyry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 1195–1198.
 28. Moreso F, Serón D, Vitrià J et al. Quantification of interstitial chronic renal damage by means of texture analysis. *Kidney Int* 1994; 46: 1721–1727.
 29. Masseroli M, O'Valle F, Andújar M et al. Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest* 1998; 78: 511–522.
 30. Terasaki PI, Koyama H, Cecka JM, Gjerson DW. The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 1459–1464.
 31. Moreso F, Serón D, Anunciada AI et al. Recipient body surface area as a determinant a post-transplant renal allograft evolution. *Transplantation* 1998; 65: 671–676.
 32. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 1997; 64: 945–947.
 33. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; 59: 962–968.
 34. Moreso F, Serón D, Gil-Vernet S et al. Donor age and delayed graft function as predictors of renal allograft survival in rejection free patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 930–935.
 35. Kupin W, Nakhleh R, Lee M et al. Separate risk factors for the development of transplant glomerulopathy vs chronic tubulointerstitial rejection. *Transplant Proc* 1997; 29: 245–246.

Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies

Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM

Kidney Int. 61: 727-733, 2002.

Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies

DANIEL SERÓN, FRANCESC MORESO, XAVIER FULLADOSA, MIGUEL HUESO, MARTA CARRERA, and JOSEP M. GRINYÓ

Nephrology and Pathology Departments, Hospital de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies.

Background. Chronic allograft nephropathy (CAN) progresses rapidly during the first few months and slowly thereafter. Although the presence of CAN in protocol renal biopsies is a predictor of outcome, the reliability of this diagnosis according to Banff criteria has not been characterized.

Methods. Renal lesions were evaluated according to the Banff criteria in sequential protocol biopsies performed at 4 and 14 months in 310 biopsies obtained from 155 patients.

Results. CAN progressed from 40 to 53% ($P = 0.001$) while serum creatinine remained stable (146 ± 44 vs. 147 ± 48 $\mu\text{mol/L}$, $P = \text{NS}$). Graft survival in patients with and without CAN in the first biopsy was 74 versus 91% ($P < 0.05$), and in the second biopsy 75 versus 94% ($P < 0.05$). In 54 patients (35%) no CAN was present in both biopsies, 39 (25%) showed progression to CAN, 19 (12%) showed regression of CAN, and 43 (28%) showed CAN in both biopsies. Graft survival was: 100%, 81.6%, 82.6% and 69.4%, respectively ($P < 0.01$). Assuming that CAN does not regress and sampling error is normally distributed, we estimated that 25% of biopsies cannot be properly classified.

Conclusions. The increase in the incidence of CAN between the 4th and 14th month is lower than the proportion of misclassified biopsies. Thus, monitoring the progression of CAN by means of two sequential biopsies at 4 and 14 months is inaccurate. We suggest that progression of scarring be monitored by means of a donor and a protocol biopsy performed during the first year evaluated with a quantitative approach.

Chronic allograft nephropathy (CAN) is the most common cause of late renal allograft failure [1] clinically characterized by a slow deterioration of renal function [2]. Histologically, CAN is defined according to the Banff schema, a classification system that relies on the semi-quantitative evaluation of chronic renal damage in the

different renal compartments [3]. Histological confirmation of CAN in patients with slowly deteriorating renal function usually shows that the degree of renal scarring is advanced, probably beyond the threshold of reversibility. Accordingly, it seems unreasonable to expect that at this stage of scarring a therapeutic maneuver may significantly slow renal function deterioration [4].

Some centers have performed protocol biopsies as an attempt to diagnose CAN at an earlier stage. In these studies, the timing of histological evaluation has been targeted during the first two years after transplant. Nevertheless, CAN was a frequent finding in all of the studies, ranging between 25 and 70% [5–9]. In studies of sequential protocol biopsies it has been observed that the incidence and severity of CAN is time dependent [10–14]. Furthermore, in all of the previously mentioned studies there is agreement that the presence of CAN in stable grafts is an independent predictor of renal allograft outcome. Taken together, these results suggest that the presence of scarring in protocol biopsies could be considered as a primary efficacy variable in a hypothetical clinical trial aimed to prevent CAN [15, 16]. However, neither the accuracy of the diagnosis of CAN in sequential protocol biopsies nor the ideal timing of biopsies to detect patients at risk of graft failure have been properly evaluated.

The present study analyzed the evolution of renal lesions evaluated according to the Banff schema in two sequential protocol biopsies performed at 4th and 14th months after transplantation.

METHODS

Patients

Since June 1988 a prospective study of protocol renal allograft biopsies has been conducted in our center [7, 15]. A first protocol renal allograft biopsy was performed at approximately 3 months in patients who gave their informed consent and fulfilled the following criteria: (a) serum creatinine < 300 $\mu\text{mol/L}$; (b) proteinuria

Key words: Banff criteria, transplantation, graft outcome, renal lesions, kidney graft, classification of biopsies.

Received for publication May 30, 2001
and in revised form September 10, 2001
Accepted for publication September 25, 2001

© 2002 by the International Society of Nephrology

<1 g/24 h; and (c) stable renal function, defined as variability of serum creatinine of less than 15% during two weeks before and after biopsy. A second protocol biopsy was performed at approximately one year of follow-up regardless of serum creatinine or proteinuria. For the present study, only patients biopsied until December 1996 were included.

Definition of clinical variables

The following variables were evaluated in each patient at the time of surgery: donor type (heart beating or non-heart beating), age and sex of the donor and the recipient, presence of hepatitis C virus antibodies, etiology of end-stage renal disease, time on dialysis, last panel reactive antibodies, number of HLA mismatches, and cold ischemia time (CIT). After surgery, the presence of delayed graft function and acute rejection were evaluated. At the time of protocol biopsies and during follow-up, serum creatinine, calculated glomerular filtration rate (GFR) by means of the Cockcroft-Gault formula [17], proteinuria, blood pressure, cyclosporine (CsA) dose and CsA levels were recorded. Mean CsA level and dose at the time of the first biopsy were calculated as a weighted-time mean from CsA levels and doses at one week, two weeks, one month, two months, and CsA level and dose at the time of the first biopsy. Mean CsA level and dose between biopsies were calculated from CsA levels and doses at four, six, 12 months, and CsA level and dose at the time of the second biopsy.

Total number of HLA mismatches was calculated as the addition of the number of mismatches in the A, B and DR loci. Delayed graft function was defined as hemodialysis requirements during the first week after surgery once accelerated or hyperacute rejection, vascular complications and urinary tract obstruction were ruled out. The diagnosis of acute rejection was defined as an acute rise of serum creatinine >30% that responded to antirejection therapy. A diagnostic biopsy at the time of serum creatinine worsening was done in 75% of patients. Hypertension before and after transplantation was defined as a mean arterial pressure >107 mm Hg (blood pressure of ~140/90 mm Hg) and/or the requirement of antihypertensive drugs. During this period of time, different combinations of immunosuppressive drugs have been employed: (a) CsA and prednisone ($N = 10$), (b) concomitant induction therapy with antilymphocytic antibodies, CsA and prednisone ($N = 87$); (c) triple standard regimen with CsA, azathioprine and prednisone ($N = 18$); (d) triple regimen with CsA, mycophenolate mofetil and prednisone ($N = 35$); and (e) induction therapy with antilymphocytic antibodies, mycophenolate mofetil and prednisone ($N = 5$) [15].

Biopsies

Biopsies were performed and processed for routine light microscopy as previously described [7]. Tissue was

embedded in paraffin, cut into 4- μ m sections and stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, Masson's trichrome and silver methenamine. Renal lesions were graded and diagnosed according to the 1997 Banff schema by two observers in the absence of any clinical information [3]. Protocol biopsies were not available to clinicians and consequently were not employed to make any clinical decisions.

Statistics

Results are expressed as the mean \pm standard deviation. Comparison between paired data was performed by means of Chi square test, Wilcoxon test and *t* test for repeated measures. Comparison between unpaired data was performed by means of the chi-square test, Student *t* test, Mann-Whitney U test, and the analysis of variance (ANOVA) with the Scheffé test for individual comparisons. Spearman's correlation was employed to analyze the relationship between ordinal parameters. Kaplan-Meier analysis was used to calculate graft survival and the Mantel-Cox log-rank test was used to compare survival between groups. For survival analysis, patients dying with a functioning graft were censored. All *P* values were two-tailed and a *P* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Patients

During the study period a first and second protocol biopsy were done in 191 patients. Sufficient tissue for histological evaluation was not obtained in 17 first and 19 second biopsies. Thus, 310 biopsies performed in 155 patients were included. Follow-up time ranged between 5 and 12 years. Demographic characteristics of patients are summarized in Table 1.

Biopsies and sampling adequacy

The first biopsy was performed at approximately 4 months (113 ± 46 days) and the second biopsy was done just after the first year (435 ± 70 days). Mean number of glomeruli was 12 ± 7 and 11 ± 7 , respectively. All biopsies contained at least one glomerular and one arterial section and sample size distribution according to 1997 Banff criteria in the 310 biopsies was: 173 (55.8%) biopsies were adequate (≥ 10 glomeruli, ≥ 2 arteries), 72 (23.2%) biopsies represented minimum sample adequacy (between 7 and 9 glomeruli and at least one arterial section) and 65 (21.0%) biopsies were inadequate (between 1 and 6 glomeruli and at least one arterial section).

Temporal evolution of renal lesions

During this period of time no significant modification in the intensity of acute lesions was observed while the

Table 1. Patient characteristics

Variable	Mean \pm SD	Range
Donor age years	35 \pm 17	6–76
Donor sex male/female	107/48	
HBD/NHBD	140/15	
Recipient age years	43 \pm 13	15–71
Recipient sex male/female	94/61	
Number of transplant 1 st /2 nd /3 rd	138/16/1	
HCV positive/negative	23/132	
Etiology of end-stage renal disease		
Glomerular	57 (37%)	
Interstitial	37 (24%)	
APKD	23 (15%)	
Nephrosclerosis	8 (5%)	
Unknown	30 (19%)	
Time on dialysis months	29 \pm 30	0–195
Last PRA %	8 \pm 18	0–100
HLA A+B+DR mismatches	2.9 \pm 1.1	0–5
Cold ischemia time hours	24 \pm 6	10–46
Delayed graft function yes/no	28/127	
Acute rejection yes/no	32/123	

Abbreviations are: HBD, heart-beating donor; NHBD, non-heart beating donor; HCV, hepatitis C virus antibodies; APKD, adult polycystic kidney disease; PRA, panel reactive antibodies.

Table 2. Evolution of histologic lesions

Lesion type	First protocol biopsy	Second protocol biopsy	P
g	0.10 \pm 0.34	0.13 \pm 0.46	NS
i	0.69 \pm 0.73	0.58 \pm 0.64	NS
t	0.44 \pm 1.0	0.30 \pm 0.50	NS
v	0	0	NS
ah	0.17 \pm 0.4	0.21 \pm 0.48	NS
cg	0.17 \pm 0.38	0.35 \pm 0.56	0.0036
ci	0.46 \pm 0.61	0.73 \pm 0.77	0.0003
ct	0.46 \pm 0.63	0.69 \pm 0.75	0.0028
cv	0.06 \pm 0.27	0.16 \pm 0.50	0.035

Abbreviations are: g, glomerulitis; i, interstitial infiltrate; t, tubulitis; v, vasculitis; ah, arteriolar hyalinosis; cg, chronic glomeruli; ci, chronic interstitium; ct, chronic tubuli; cv, chronic vascular.

severity of chronic lesions increased in all renal compartments (Table 2). Despite progression of renal scarring, serum creatinine and calculated GFR as well as mean arterial pressure at the time of the first and second protocol biopsies remained unchanged. A significant but slight increase of proteinuria was observed. According to usual clinical practice, CsA doses and CsA levels were lower at the time of the second protocol biopsy (Table 3).

To study the degree of correlation between Banff scores in the first and second biopsies, a matrix correlation between Banff scores in both biopsies was built. The following significant positive correlations were observed: g-score in the first and second biopsy ($\rho = 0.20$, $P = 0.01$), i-score in the first and second biopsy ($\rho = 0.31$, $P = 0.001$), ah-score in the first and second biopsy ($\rho = 0.18$, $P = 0.03$), ci-score in the first and second biopsy ($r = 0.30$, $P = 0.0002$) and ct-score in the first and second biopsy ($\rho = 0.28$, $P = 0.004$). No

Table 3. Evolution of clinical parameters

	First protocol biopsy	Second protocol biopsy	P
Creatinine $\mu\text{mol/l}$	146 \pm 44	147 \pm 48	NS
Calculated GFR mL/min/1.73 m^2	53 \pm 14	54 \pm 14	NS
Mean arterial pressure mm Hg	101 \pm 12	104 \pm 12	NS
Proteinuria g/24 hr	0.31 \pm 0.21	0.38 \pm 0.52	0.044
CsA dose mg/kg/day	5.4 \pm 2.3	4.1 \pm 1.5	0.0001
CsA level ng/mL	216 \pm 74	159 \pm 48	0.0001

Abbreviations are: GFR, glomerular filtration rate; CsA, cyclosporine.

Table 4. Concordance between the diagnosis of chronic allograft nephropathy (CAN) in the first and second biopsies ($P = 0.01$)

	2 nd biopsy without CAN	2 nd biopsy with CAN
1 st biopsy without CAN	54 (34.8%)	39 (25.2%)
1 st biopsy with CAN	19 (12.2%)	43 (27.7%)

correlation was found between the degree of acute lesions in the first biopsy and chronic lesions in the second biopsy. There was a positive correlation between ci-score and ct-score in the first and cv-score in the second biopsy ($\rho = 0.23$, $P = 0.004$, and $\rho = 0.21$, $P = 0.007$, respectively).

Temporal evolution of histological diagnostic categories

Histological diagnoses according to the Banff criteria in the first protocol biopsy were: normal ($N = 66$), borderline ($N = 24$), acute rejection ($N = 3$), CAN ($N = 38$), CAN associated with borderline changes ($N = 20$) and CAN associated with acute rejection ($N = 4$). Histological diagnoses in the second protocol biopsy were: normal ($N = 64$), borderline ($N = 8$), acute rejection ($N = 1$), CAN ($N = 53$), CAN associated with borderline changes ($N = 28$), and CAN associated with acute rejection ($N = 1$). Thus, in the first protocol biopsy CAN was diagnosed in 62 of 155 (40.0%) patients and in the second protocol biopsy in 82 of 155 (52.9%) patients ($P = 0.001$). Not only the proportion but also the severity of CAN increased in the second biopsy. Grading of CAN in the first was: absent in 93 (60.0%) patients, mild in 53 (34.2%), moderate in 9 (5.8%), and no cases showed severe CAN. In the second biopsy CAN was: absent in 73 (47.1%), mild in 54 (34.8%), moderate in 27 (17.4%), and severe in 1 (0.6%; $P = 0.01$).

A 2×2 contingency table in which the histological diagnosis was summarized as presence or absence of CAN was employed to study the concordance of the diagnosis of CAN in both biopsies (Table 4). In 97 patients (62.5%) there was agreement in the diagnosis obtained in both sequential biopsies. In 39 patients (25.2%)

Table 5. Evolution of CAN in patients with two biopsies containing ≥ 7 glomeruli (minimum sample adequacy in both biopsies) and in patients with at least one biopsy containing < 7 glomeruli (inadequate sampling) ($P = NS$)

	≥ 7 glomeruli	< 7 glomeruli
Both biopsies without CAN	34 (35.1%)	20 (34.4%)
Progression to CAN	22 (22.6%)	17 (30.9%)
Regression of CAN	12 (12.4%)	7 (12.1%)
Both biopsies with CAN	29 (29.9%)	14 (24.1%)
Total	97	58

not showing CAN in the first protocol biopsy, CAN was diagnosed in the second. In 19 patients (12.2%) CAN was diagnosed in the first biopsy but not in the second. In the group of patients not showing CAN in the first biopsy, 27 patients progressed to CAN grade I and 12 patients progressed to CAN grade II or III. On the contrary, all but one of the 19 patients who apparently regressed were diagnosed of CAN grade I in the first biopsy.

Sample size adequacy and diagnosis of CAN

To evaluate whether apparent regression of CAN in the second biopsy is due to inadequate sampling, the concordance of the diagnosis of CAN was studied in patients with at least 7 glomeruli (minimum sample adequacy) in both biopsies and in patients with at least one biopsy containing < 7 glomeruli (inadequate sample). As shown in Table 5, evolution of CAN was not different in both groups.

Concordance of the diagnosis of CAN and outcome

To evaluate whether apparent regression of CAN in a proportion of patients represents the inaccuracy of the diagnostic criteria or a real regression of chronic lesions, serum creatinine, proteinuria at the time of first and second protocol biopsies and renal allograft survival were compared in the four previously mentioned groups. As shown in Table 6, serum creatinine and proteinuria values were low in patients not displaying CAN in both biopsies, intermediate in patients showing either progression or regression of CAN and high in patients diagnosed of CAN in both biopsies. Similarly, renal allograft survival was excellent in patients without CAN, intermediate in patients in whom CAN apparently progressed or regressed, and poor in patients displaying CAN in both biopsies (Table 6). Despite patients who progressed and patients who regressed showed a similar clinical evolution, the probability to progress was higher than the probability to regress (25% vs. 12%, $P < 0.05$).

Clinical and histological variables associated with the progression of CAN

Patients were classified as progression or no progression of CAN. Progression of CAN was defined as the

presence of CAN in the second biopsy in patients with a first biopsy not showing CAN or the increase in the CAN grade between the first and second biopsy. The degree of chronic lesions in the first biopsy was lower in patients who progressed. Mean CsA level until the first biopsy was similar in both groups while the mean CsA level between the first and second biopsies was lower in patients who progressed. However, the CsA dose until the first biopsy and between biopsies was similar in both groups (Table 7). None of the following variables was different between the no progression and progression groups: donor age (35 ± 18 vs. 37 ± 15 years) and sex (29 vs. 35% females), recipient age (44 ± 14 vs. 43 ± 12 years) and sex (37 vs. 43% females), last panel reactivity antibodies (6 ± 20 vs. $10 \pm 20\%$), number of HLA mismatches (2.8 ± 1.1 vs. 2.9 ± 1.0), cold ischemia time (24 ± 7 vs. 23 ± 6 hours), the proportion of patients treated with mycophenolate mofetil (25 vs. 27%), delayed graft function (19 vs 16%), acute rejection (21 vs. 20%), serum creatinine (144 ± 41 vs. $148 \pm 49 \mu\text{mol/L}$), calculated GFR (54 ± 14 vs. $52 \pm 14 \text{ mL/min/1.73 m}^2$), mean arterial blood pressure (101 ± 11 vs. $102 \pm 14 \text{ mm Hg}$) or proteinuria (0.28 ± 0.19 vs. $0.32 \pm 0.21 \text{ g/day}$) at the time of the first biopsy.

Prediction of graft survival

In order to study which timing of protocol biopsy allowed a better prediction of outcome, graft survival according to the presence or absence of CAN in the first and second protocol biopsies was studied separately by means of Kaplan-Meier analysis. Graft survival in patients with and without CAN was 74 and 91% in the first biopsy ($P < 0.05$) and 75 and 94% in the second biopsy ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The present study shows that chronic renal allograft lesions progress between the 4th and 14th month, while serum creatinine, calculated GFR and arterial pressure remain stable. The only clinical modification between the two protocol biopsies was a slight increase of proteinuria that, despite reaching statistical significance, was too small to be considered of any clinical relevance. During this period of time, the CsA dose was tapered and accordingly CsA levels decreased. This modification may partly explain the lack of deterioration in renal function despite the progression of renal scarring [18]. Together these results point out that the correlation between histological damage and clinical parameters in transplanted patients is not good enough to consider either renal function or proteinuria as a reliable marker of the progression of CAN [6, 7, 15]. This observation reinforces the notion that protocol biopsies allow information to be obtained that is not contained in clinical data.

Table 6. Serum creatinine ($\mu\text{mol/L}$) and proteinuria ($\text{g}/24 \text{ h}$) in the first and second protocol biopsy in patients displaying: both biopsies without CAN, progression of CAN, regression of CAN and both biopsies with CAN

	No CAN	Progression	Regression	CAN in both biopsies	P
N	54	39	19	43	
1 st biopsy					
S _{Cr}	131 \pm 31	147 \pm 51	158 \pm 48 ^a	158 \pm 44 ^a	0.001
Proteinuria	0.22 \pm 0.12	0.31 \pm 0.17 ^a	0.34 \pm 0.17 ^a	0.39 \pm 0.28 ^a	0.0003
2 nd biopsy					
S _{Cr}	128 \pm 32	151 \pm 48 ^a	151 \pm 37	169 \pm 60 ^a	0.0003
Proteinuria	0.18 \pm 0.12	0.29 \pm 0.22	0.38 \pm 0.42	0.71 \pm 0.85 ^{a,b,c}	0.0001
Survival %	100	81.6	82.6	69.4	0.0020

Abbreviations are: CAN, chronic allograft nephropathy; S_{Cr}, serum creatinine.

^{a, b, and c} P < 0.05 between that value and No CAN group, progression and regression groups respectively (Scheffé test)

Table 7. Clinical and histological characteristics of patients according to the progression of CAN between the first and second biopsies

	No progression of CAN	Progression of CAN	P
N	104	51	
First biopsy Banff scores			
g-score	0.11 \pm 0.37	0.10 \pm 0.30	NS
i-score	0.71 \pm 0.76	0.67 \pm 0.68	NS
t-score	0.36 \pm 0.57	0.16 \pm 0.21	NS
v-score	—	—	
ah-score	0.17 \pm 0.18	0.16 \pm 0.21	NS
cg-score	0.19 \pm 0.39	0.14 \pm 0.35	NS
ci-score	0.57 \pm 0.65	0.23 \pm 0.43	<0.001
ct-score	0.57 \pm 0.68	0.25 \pm 0.44	<0.001
cv-score	0.07 \pm 0.30	0.06 \pm 0.26	NS
N	102	48	
Mean CsA dose at 1 st biopsy	5.2 \pm 1.7	5.3 \pm 2.1	NS
Mean CsA dose between biopsies	4.0 \pm 1.3	4.2 \pm 1.8	NS
Mean CsA levels at 1 st biopsy	218 \pm 72	217 \pm 74	NS
Mean CsA levels between biopsies	165 \pm 50	149 \pm 41	0.04

Cyclosporine (CsA) levels (ng/mL) were determined in 102 and 48 patients in the no progression of CAN and progression of CAN groups, respectively, since five patients did not receive cyclosporine.

The severity of acute and chronic lesions observed in a renal compartment in the first biopsy correlated with the same type of lesion in the same compartment in the second biopsy. In contrast with the progression of chronic lesions, acute lesions remained stable. In sequential protocol biopsies, Rush, Jeffery and Gough [10] and Legendre et al [12] observed that acute lesions peak during the first few months and decrease thereafter, while chronic lesions progress during the first year. In contrast, Nankivell et al showed that acute lesions peak at three months while chronic lesions remain stable during the first year [19]. We previously observed that the number of interstitial infiltrating cells assessed with monoclonal antibodies decreased during the first year, while acute lesions assessed with an ordinal scale apparently remained stable [20]. We did not find any correlation between acute lesions in the early biopsy and chronic lesions in the second one, in contrast to other reports [10, 14, 19, 21]. It is difficult to find a reasonable explanation for these differences, but the timing of biopsies, patient characteristics and immunosuppression were not the same in the different centers. Also, inter-observer

variability could account for some of these differences [22].

In a subset of patients diagnosed of CAN at four months no chronic lesions were observed in the one-year biopsy. This result raises the question whether apparent regression of CAN reflects sampling error, intraobserver variability or a real regression of chronic damage. The present study's biopsies were evaluated according to Banff criteria, which have been devised to evaluate diagnostic but not protocol biopsies. Despite that CAN represents a continuum, according to the Banff schema it is diagnosed when tubular atrophy is present and interstitial fibrosis is observed in more than 5% of the biopsy [3]. The extension of interstitial fibrosis and tubular atrophy is used to grade CAN as mild (up to 25%), moderate (26–50%) and severe (>50%). In such a grading system, intra- and interobserver variability increases as the extension of damage approaches the cut-off separating two categories. In the present study, the majority of patients displayed either no CAN or grade I CAN. Accordingly, in a proportion of biopsies, the degree of chronic damage should have been in the cut-off separating both catego-

ries. This notion is reinforced by the observation that graft survival was low in patients displaying CAN in both biopsies, excellent in patients not displaying CAN in any biopsy, and intermediate in patients with progression or regression of CAN. We interpret that in patients displaying CAN in both biopsies, the degree of interstitial fibrosis and tubular atrophy was clearly over the threshold of 5% and in patients not displaying CAN in both biopsies, no chronic lesions were present at all. In patients with either apparent progression or regression, the degree of chronic lesions was around the cut-off separating CAN from no CAN, and accordingly the probability to misclassify such a pair of biopsies was the highest.

Progression of CAN was observed in 25% of patients while regression was observed only in 12%, confirming that the probability to progress was higher than the probability to regress. Approximately half of the patients who progressed displayed CAN grade II or III in the second biopsy while the other half displayed CAN grade I. Nearly all patients with apparent regression displayed CAN grade I in the first biopsy. Accordingly, this result suggests that apparent regression reflects the difficulty to properly classify biopsies with mild interstitial fibrosis and tubular atrophy.

The present data allow an evaluation of the accuracy of Banff criteria to diagnose CAN in protocol biopsies. If we assume that during the study period real regression of scarring has not occurred, then 12% of the patients with apparent regression of CAN were misclassified. A similar proportion of patients with progression to CAN must also have been misclassified if we assume that the distribution of sampling error follows a normal distribution. Thus, in our hands the evaluation of protocol biopsies with Banff criteria implies a misclassification of approximately 25% of the cases. This number represents both sampling error associated with the performance of two sequential biopsies and intraobserver variability.

Despite the estimated error of 25% in the diagnosis of CAN, we studied which clinical variables and histological lesions in the first biopsy were associated with the progression of CAN. Patients displaying less severe chronic lesions at four months had a higher probability to progress. This result is probably a consequence of the grading system employed. Mild progression of fibrosis in patients not displaying CAN in the first biopsy (interstitial fibrosis in less than 5% of biopsy surface) will result in progression to CAN. On the contrary, in patients already displaying CAN grade I (interstitial fibrosis affecting 6 to 25%) mild progression of interstitial fibrosis, for example from 10 to 20%, will not result in the progression of CAN. On the other hand, an association between progression of CAN and lower mean CsA levels between the first and second biopsy was observed. The interpretation of this result is difficult since the immunosuppression

was heterogeneous in the studied set of patients, but raises concern about a possible detrimental effect of low cyclosporine levels during the first year [23].

According to Banff schema an adequate sample must contain at least ten glomeruli and two arteries. This condition has been defined to properly diagnose acute rejection but not CAN, since the distribution of acute lesions is rather variable [3]. No relationship could be established between biopsy adequacy and the frequency distribution of the diagnosis of CAN, suggesting that the sample size requirement for a diagnosis of CAN may be less than for acute rejection. This observation suggests that even small samples can be considered viable to evaluate the extension of chronic tubulointerstitial damage, especially if they are evaluated by means of quantitative measures [11, 16, 24–26].

The incidence of CAN progressed from 40 to 53% during the study period in the overall group. This increase is relatively moderate if we take into consideration that the incidence of lesions that mimic CAN in blindly evaluated donor biopsies at our center is 15% [15]. Thus, renal allograft scarring progresses rapidly during the first few months and slowly thereafter. This observation may have important implications in the design of trials aimed to prevent renal scarring. In a trial in which progression of scarring is evaluated by means of two sequential biopsies, the ideal timing of biopsies to reduce sample size requirements will be defined according to the shortest follow-up period in which the highest progression occurs. The present data do not favor the utilization of two protocol biopsies done during the first year, but suggest that the best strategy to monitor progression of chronic lesions is to perform a donor and a protocol biopsy during the first year [15, 16].

In summary, only a moderate increase in the incidence and severity of CAN occurs between the 4 and 14 month. Moreover, in approximately 25% of biopsies the diagnosis of CAN is misclassified. Taken together, these data suggest that evaluation of two sequential biopsies by means of the Banff schema is not the ideal strategy to monitor progression of renal scarring. Thus, we suggest monitoring the progression of scarring by means of a donor and a protocol biopsy performed during the first year and evaluated with a quantitative approach.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the FIS 2000/0368 and Fundació La Marató TV3 grants.

Reprint requests to Prof. Daniel Serón, Nephrology Department, Hospital de Bellvitge, C/Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet, 08907 Barcelona, Spain.
E-mail: 17664dsm@comb.es

REFERENCES

1. DUNN J, GOLDEN D, VAN BUREN CT, et al: Causes of graft loss beyond two years in the Cyclosporine era. *Transplantation* 49:349-353, 1990
2. PAUL LC, HÄYRY P, FOEGH M, et al: Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: Proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc* 25: 2020-2023, 1993.
3. RACUSEN LC, SOLEZ K, COLVIN RB, et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713-723, 1999
4. HUNSICKER LG, BENNETT LE: Design of trials of methods to reduce late renal allograft loss: The price of success. *Kidney Int* 48(Suppl 52):S120-S123, 1995
5. ISONIEMI HM, KROGERUS L, VON WILLEBRAND E, et al: Histopathological findings in well functioning long term renal allografts. *Kidney Int* 41:155-160, 1992
6. DIMÉNY E, WAHLBERG J, LARSSON E, FELLSTRÖM B: Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 9:79-84, 1995
7. SERÓN D, MORESO F, BOVER J, et al: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51:310-317, 1997
8. KUYPERS DRJ, CHAPMAN JR, O'CONNELL PJ, et al: Predictors of renal transplant histology at 3 months. *Transplantation* 67:1222-1230, 1999
9. SOLEZ K, VINCENTI F, FILO RS: Histopathologic findings from 2 year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus Cyclosporine. *Transplantation* 66:1736-1740, 1998
10. RUSH ND, JEFFERY JR, GOUGH J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. *Transplantation* 50:511-514, 1995
11. NICHOLSON ML, MCCULLOCH TA, HARPER SJ, et al: Early measurement of interstitial fibrosis predicts long renal function and graft survival in renal transplantation. *Br J Surg* 83:1082-1085, 1996
12. LEGENDRE C, THERVET E, SKHIRI H, et al: Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 65:1506-1509, 1998
13. BOSMANS JL, WOESTENBURG A, YSEBAERT DK, et al: Fibrous intimal thickening at implantation as a risk factor for outcome of cadaveric renal allografts. *Transplantation* 69:2388-2394, 2000
14. NICKERSON P, JEFFERY J, GOUGH J, et al: Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years post-transplant. *J Am Soc Nephrol* 9:482-487, 1998
15. SERÓN D, MORESO F, RAMÓN JM, et al: Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69:1849-1855, 2000
16. MORESO F, LOPEZ M, VALLEJOS A, et al: Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts. *Am J Transplant* 1:82-88, 2000
17. COCKROFT DW, GAULT MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41, 1976
18. BENNET WM, DEMATTOS A, MEYER MM, et al: Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 50:1089-1100, 1996
19. NANKIVELL BJ, FENTON-LEE CA, KUYPERS DRJ, et al: Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 71:515-523, 2001
20. SERÓN D, MORESO F, CONDOM E, et al: Evaluation of interstitial lesions in well-functioning renal allografts. *Transplant Proc* 27: 2213-2214, 1995
21. RUSH D, NICKERSON P, GOUGH J, et al: Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: A randomized study. *J Am Soc Nephrol* 9:2129-2134, 1998
22. MARCUSSEN N, OLSEN TS, BENEDIKTSSON H, et al: Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation* 60:1083-1089, 1995
23. ALMOND PS, MATAS AJ, GILLINGHAM KJ, et al: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 55:752-756, 1993
24. MORESO F, SERÓN D, VITRIÀ J, et al: Quantification of interstitial chronic renal damage by means of texture analysis. *Kidney Int* 46:1721-1727, 1994
25. NICHOLSON ML, BAYLEY E, WILLIAMS S, et al: Computerized histomorphometric assessment of protocol renal transplant biopsies specimens for surrogate markers of chronic rejection. *Transplantation* 68:236-241, 1999
26. GRIMM PC, NICKERSON P, GOUGH J, et al: Quantitation of allograft fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Pediatr Transplant* 3:257-270, 1999

Relationship between subclinical rejection and genotype, renal mRNA and plasma protein TGF- β_1 levels

Hueso M, Navarro E, Moreso F, Beltrán-Sastre V, Ventura F, Grinyó JM, Serón D

Transplantation. En trámite para su publicación.

Relationship between subclinical rejection and genotype, renal mRNA and plasma protein TGF- β 1 levels

Journal:	<i>Transplantation</i>
Manuscript ID:	TPA-2005-0954.R1
Manuscript Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hueso, Miguel; IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Nephrology Navarro, Estanis; IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Centre d'Oncologia Molecular Moreso, Francesc; IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Nephrology Beltrán-Sastre, Violeta; IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Centre d'Oncologia Molecular Francesc, Ventura; IDIBELL, Facultat de Medicina, Universitat Barcelona, Ciències Fisiològiques II Grinyo, Josep; IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Nephrology Seron, Daniel; ; IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Nephrology
Classifications:	02.08 Hyperacute and acute rejection < 02 Complications of Clinical Transplantation, 01.01 Kidney/Renal < 01 Clinical Transplantation (Adult), 01 Clinical Transplantation (Adult)
Keywords:	Renal transplantation, TGF- β 1, single nucleotide polymorphisms, subclinical rejection, protocol biopsies

1
2
3 **Relationship between subclinical rejection and genotype, renal mRNA and plasma**
4
5 **protein TGF- β_1 levels**
6
7

8
9
10 **Running title: Subclinical rejection and TGF- β_1**
11
12

13
14
15
16
17 Miguel Hueso^{1,2}, Estanis Navarro², Francesc Moreso¹, Violeta Beltrán-Sastre², Francesc
18 Ventura³, Josep M. Grinyó¹, Daniel Serón^{1,4}.
19
20

21
22 1 IDIBELL, Departament de Nefrologia, Hospital Universitario Bellvitge. L'Hospitalet de
23 Llobregat. Barcelona. Spain

24 2 IDIBELL, Centre d'Oncologia Molecular, Institut de Recerca Oncologica (COM-IRO).
25 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. Spain

26 3 IDIBELL, Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Universitat de
27 Barcelona. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. Spain

28 4 Corresponding author at :
29
30

31 Daniel Serón

32 IDIBELL, Departament de Nefrologia, Hospital Universitario Bellvitge.

33 Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E08907, Spain

34 Telf: +34-932607602

35 FAX: +34-932607607

36 Email: 17664dsm@comb.es
37
38
39
40
41

42 Abstract word count: 150 words

43
44
45 Text word count: 1495 words
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background: TGF- β_1 is increased in allograft rejection and its production is associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Methods:** We explore the contribution of SNPs at codons 10 and 25 of the TGF- β_1 gene to renal allograft damage in 6-month protocol biopsies and their association with TGF- β_1 production. TGF- β_1 genotypes were evaluated by PCR-RFLP. Intra-graft TGF- β_1 mRNA was measured by real-time PCR and TGF- β_1 plasma levels by ELISA. **Results:** Eighty consecutive patients were included. Allele T at codon 10 (RR: 6.4, p=0.02) and an episode of acute rejection before protocol biopsy (RR: 5.6, p=0.01) were independent predictors of subclinical rejection (SCR). TGF- β_1 plasma levels, but not TGF- β_1 mRNA were increased in patients with SCR (2.59 ± 0.91 , n=22 vs. 2.05 ± 0.76 ng/mL, n=43; p=0.01). There was no association between allele T and TGF- β_1 plasma or intra-graft levels. **Conclusion:** Allele T at codon 10 of the TGF- β_1 gene is associated with a higher incidence of SCR.

KEYWORDS:

Renal transplantation, protocol biopsies, subclinical rejection, single nucleotide polymorphisms, TGF- β_1 .

ABBREVIATIONS:

CAN: Chronic Allograft Nephropathy

PCR-RFLP: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique

SCR: Subclinical rejection.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

1
2
3
4
5
6 TGF- β_1 is a cytokine involved in the regulation of the immune response that has
7
8 been related to the onset of allograft rejection and fibrosis (1-4). Eight single nucleotide
9
10 polymorphisms (SNPs) have been described in the TGF- β_1 gene (5,6), with those detected
11
12 in the first exon showing a relationship with allograft rejection (7-10). Exon 1
13
14 polymorphisms are a T to C transition at position +869, resulting in the change of leucine to
15
16 proline at codon 10, and a G to C transversion at position +915, that resulted in a change of
17
18 arginine to proline at codon 25. The homozygous presence of the C allele at codon 10 and
19
20 of the G allele at codon 25 has been associated with higher TGF- β_1 levels “in-vitro” and in
21
22 non-transplanted patients (7,11,12). In renal transplantation, it is not clear whether SNPs of
23
24 TGF- β_1 gene are associated with TGF- β_1 production and with pathological lesions in
25
26 clinical stable patients. Since the presence of subclinical rejection and chronic allograft
27
28 nephropathy evaluated by means protocol biopsies is associated with poorer graft survival,
29
30 we evaluate the association between SNPs of the TGF- β_1 gene and the presence of SCR or
31
32 CAN in protocol biopsies.

33
34
35 We conducted a prospective, exploratory study on consecutive single renal
36
37 transplants performed between 1999-2001. Patients recruited fulfilled the following criteria:
38
39 serum creatinine < 300 $\mu\text{mol/l}$, proteinuria < 1 g/day, stable renal function and 6 month
40
41 protocol biopsy available. This study was approved by the Ethics Committee of our
42
43 hospital and a written informed consent was obtained.

44
45
46 Two cores of tissue were obtained, one was processed for conventional histology
47
48 and the other one was immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for
49
50 RNA extraction. Renal lesions were evaluated according to 1997 Banff criteria (13).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The determination of SNPs at exon 1 of the TGF- β_1 gene was performed on
4 genomic DNA from peripheral white blood cells using a PCR-RFLP method. Each PCR
5 contained 50-200 ng of genomic DNA and 0.2 μ M of the following primers: sense
6 $5'$ CACCACACCAGCCCTGTTC and antisense $5'$ TCACCAGCTCCATGTGGATAG. DNA
7 was amplified for 35 cycles at 94°C for 45 s, 58°C for 45 s and 72°C for 2 min, followed by
8 a final extension at 72°C for 7 min. A PCR product of 178 bp was obtained, whose identity
9 was confirmed by sequencing. To determine the allelic variants of the TGF- β_1 gene, 10 μ L
10 of the amplified DNA were digested with 10 U of MspAII (codon 10) or BglII (codon 25)
11 for 2 h at 37°C. Digested products were fractionated in 10% polyacrylamide gels and
12 visualized by ethidium bromide staining.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 Isolation of total RNA and reverse transcription were done as previously described
28 (14). Steady-state levels of TGF- β_1 were determined by triplicate, by real-time PCR (ABI
29 Prism 7700, Applied Biosystems) on 0.5 μ g of cDNA using the following primers: forward
30 primer $5'$ TGCTTGAACCTTGTCATAGATTTCGT at 300 nM, reverse primer
31 $5'$ GCCGACTACTACGCCAAGGA at 900 nM, and the TaqMan probe $5'$ FAM-
32 TGGGTTTCCACCATTAGCACGCG-TAMRA at 200 nM. As internal control for
33 normalization, we amplified a fragment of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
34 transcript with a commercial pair of primers (PDARS ID number: 4310884E; Applied
35 Biosystems). To determine absolute levels of TGF- β_1 mRNA we constructed a standard
36 curve with a cloned fragment of the TGF- β_1 transcript that included the sequence amplified.
37 In subsequent quantifications, this plasmid was used to create an absolute standard curve
38 that was run in parallel with the amplification of all unknown samples. TGF- β_1 mRNA
39 were expressed as log number of copies.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Fasting plasma samples were obtained at the time of protocol biopsy and total
4
5 TGF- β_1 protein levels were measured in platelet-poor plasma by ELISA (Quantikine, R&D
6
7 Systems, Abingdon, UK). The intra-assay coefficient of variation of duplicated samples
8
9 was 6%.

10
11
12 Results were expressed as the mean \pm standard deviation. Differences between
13
14 categorical data were evaluated with a 2x2 contingency table and the Fisher's exact tests.
15
16 Student's t-test and the analysis of variance were employed to compare normally
17
18 distributed quantitative data. Mann-Whitney U-test and Kruskal-Wallis test were applied
19
20 for non-parametric data. Univariate and multivariate logistic regression were employed to
21
22 identify variables associated with histological diagnosis. P-values were corrected for the
23
24 number of variables compared according to the Bonferroni method.
25
26
27
28

29
30 We analysed protocol biopsies from 80 recipients of a cadaveric graft. Recipient age
31
32 was 47 \pm 13 years, there were 52 males and 11 retransplants. Thirty three patients received
33
34 cyclosporine (CsA) and prednisone, associated with antilymphocytic antibodies (n=7),
35
36 azathioprine (n=1), mycophenolate mofetil (n=17) or sirolimus (n=4). Other 47 patients
37
38 received tacrolimus and prednisone, associated with mycophenolate mofetil (n=44) or
39
40 sirolimus (n=3). TGF- β_1 SNPs distribution of 72 cadaveric donors served as controls (age
41
42 44 \pm 16 years, 62% males).
43
44
45

46
47 Protocol biopsies were performed at 168 \pm 58 days. Histological diagnosis were:
48
49 normal (n=28), borderline changes (n=8), acute rejection (n=5), CAN (n=24), CAN with
50
51 borderline changes (n=12) and CAN with acute rejection (n=3). CAN was mild in 29 cases,
52
53 moderate in 9 cases and severe in one case. Patients with borderline changes (n=20) or
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 acute rejection (n=8) were categorized as subclinical rejection (SCR) (35%). There were 39
4
5 patients (49%) diagnosed of CAN regardless of SCR.
6
7

8 Characteristics of patients according to TGF- β_1 genotypes are shown in Table 1.
9
10 The distribution of SNP at codon 10 was not different between transplanted patients and
11 controls (CC=18, CT=33, TT=26 vs. CC=11, CT=23, TT=22; p=ns). Similarly, there were
12
13 no differences in the distribution of SNPs at codon 25 (CC=3, CG=9, GG=68 vs. CC=2,
14
15 CG=9, GG=47; p=ns). The distribution of genotypes of the TGF- β_1 gene followed the
16
17 Hardy-Weinberg equilibrium.
18
19
20
21

22 The prevalence of SCR was different in transplanted patients according to TGF- β_1
23 SNP at codon 10 (TT=46%, CT=46%, CC=8% in grafts with SCR vs TT=28%, CT=41%,
24
25 CC=31% in grafts without SCR; p=0.04) but not at codon 25 (CC=4%, CG=14%, GG=82%
26
27 in SCR vs CC=4%, CG=10%, GG=86% in grafts without SCR; p=ns). On the other hand,
28
29 the prevalence of CAN was not associated with SNP at codon 10 (TT=31%, CT=39%,
30
31 CC=30% in grafts with CAN vs TT=37%, CT=46%, CC=17% in grafts without CAN;
32
33 p=ns) or 25 (CC=3%, CG=13%, GG=84% in CAN vs CC=5%, CG=10%, GG=85% in
34
35 grafts without CAN; p=ns).
36
37
38
39
40

41 To further evaluate the association between SCR and SNP at codon 10, we studied
42
43 risk factors associated with SCR. Multivariate logistic regression analysis showed that
44
45 allele T (RR: 6.4, 95% CI: 1.2 to 33.1; p=0.02) and acute rejection before the protocol
46
47 biopsy (RR: 5.6, 95% CI: 1.5 to 21.1; p=0.01) were independent predictors of SCR.
48
49

50 TGF- β_1 plasma levels were determined in 65 patients and intragraft mRNA TGF- β_1
51
52 in 61 patients. TGF- β_1 plasma levels were increased in patients with SCR (2.59 \pm 0.91, n=22
53
54 vs. 2.05 \pm 0.76 ng/mL, n=43; p=0.01) and in patients receiving CsA in comparison to
55
56
57
58
59
60

1
2
3 tacrolimus (2.58 ± 0.98 , $n=20$ vs. 2.08 ± 0.74 ng/mL, $n=45$; $p=0.02$). Two way ANOVA
4
5 showed that only SCR was independently associated with TGF- β_1 plasma levels ($p=0.03$).
6
7 On the contrary, mRNA TGF- β_1 renal levels were not significantly different in patients
8
9 with or without SCR (2.58 ± 0.76 , $n=23$ vs. 2.31 ± 0.65 log copies, $n=38$; $p=0.15$), or in
10
11 patients treated with CsA or tacrolimus (2.42 ± 0.67 , $n=23$, vs. 2.41 ± 0.73 log copies, $n=38$;
12
13 $p=ns$). Allele T at codon 10 was not associated with plasma TGF- β_1 levels (2.14 ± 0.83 ,
14
15 $n=50$ vs. 2.45 ± 0.87 ng/mL, $n=13$; $p=ns$) or mRNA TGF- β_1 levels (2.41 ± 0.67 , $n=49$ vs.
16
17 2.50 ± 0.85 log copies, $n=11$; $p=ns$).
18
19
20
21
22

23 In the present study, we observed an independent association between recipient
24
25 allele T at codon 10 and SCR at 6 months. This association is in agreement with the
26
27 observation that this allele is also more prevalent in other inflammatory diseases and in
28
29 liver allograft rejection (10,15-17). In renal transplant patients, an association between
30
31 either donor or recipient SNP at codon 10 and an increased incidence of clinical acute
32
33 rejection has been reported (8,9). These data suggest that SNP at codon 10 may influence
34
35 graft inflammation, although the relative contribution of donor or recipient is at present not
36
37 well established. On the contrary, in a large epidemiological study there was no association
38
39 between SNPs at codon 10 or 25 and 3-year renal allograft survival (18). Since the
40
41 detrimental effect of SCR on graft failure can only be demonstrated in patients with long
42
43 term follow up, it cannot be discarded that SNPs at codon 10 may have an influence on
44
45 long term graft outcome (19).
46
47
48
49
50

51 It has been proposed that TGF- β_1 genotype at codon 10 is associated with TGF- β_1
52
53 production. However, TT genotype has been associated either with higher or with lower
54
55 TGF- β_1 mRNA and protein levels (7,11,12,20). In renal allograft biopsies obtained in
56
57
58
59
60

1
2
3 pediatric patients with chronic allograft dysfunction, Melk et al. failed to observe any
4
5 association between TGF- β_1 SNPs and their intrarenal expression (20). In our study,
6
7 performed in stable grafts, we also failed to observe this association. However, we observed
8
9 that the presence of SCR and immunosuppressive treatment was associated with
10
11 circulating TGF- β_1 protein levels, suggesting that SNPs may play only a modest role in
12
13 TGF- β_1 production in renal transplantation. Furthermore, we cannot discard that the
14
15 association between allele T and SCR may be due to other genes in linkage disequilibrium
16
17 with TGF- β_1 .
18
19
20
21
22

23 In summary, we suggest that TGF- β_1 genotype may influence the susceptibility for
24
25 SCR in renal transplantation.
26
27
28
29

30 **ACKNOWLEDGMENTS**

31
32

33 This work was supported by grants to Daniel Serón (FIS PI040086, SEN-2004,
34 Marató TV3 001210), Miguel Hueso (FIS 2000/0368), Estanis Navarro (FIS PI020766,
35 Marató TV3005310) and Francesc Moreso (FIS PI040177), and fellowships to Miguel
36
37 Hueso and Violeta Beltrán-Sastre from Fundació Catalana de Transplantament. We are
38
39 grateful to Dr. Jordi Bover for discussions on the topic of this work.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N. Eng. J. Med* 2000; 342:1350.
2. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N. Eng. J. Med* 1994; 331:1286.
3. Baboolal K, Jones GA, Janezic A, *et al.* Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 2002; 61: 686.
4. Wahl SM. Transforming Growth Factor β : The good, the Bad and the Ugly. *J Exp. Med* 1994; 180:1587.
5. Cambien F, Ricard S, Troesch A, *et al.* Polymorphisms of the transforming growth factor- β_1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de L'Infarctus du Myocarde (ECTIM) study. *Hypertension* 1996; 28:881.
6. Pociot F, Hansen PM, Karlsen AE, *et al.* TGF- β_1 Gene Mutations in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol* 1998; 9:2302.
7. Awad MR, El Gamel A, Hasleton P, *et al.* Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: Association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66:1014.
8. Alakulppi NS, Kyllönen LE, Jäntti VT, *et al.* Cytokine Gene Polymorphisms and risk of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78:1422.

- 1
2
3 9. Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, *et al.* Donor genomics influence graft events: The
4
5 effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy.
6
7 Kidney Int 2004; 66:1686.
8
9
- 10 10. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, *et al.* Cytokine gene polymorphisms and acute
11
12 liver graft rejection. Liver Transpl. 2002; 8:603.
13
14
- 15 11. Suthanthiran M, Li B, Song JO, *et al.* Transforming growth factor- β ₁ hyperexpression
16
17 in African.American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target
18
19 organ damage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97:3479.
20
21
- 22 12. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, *et al.* Association of a Polymorphism of the
23
24 Transforming Growth Factor- β ₁ Gene with Genetic Susceptibility to Osteoporosis in
25
26 Postmenopausal Japanese Women. J Bone Miner. Res 1998; 13:1569.
27
28
- 29 13. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al.* The Banff 97 working classification of renal
30
31 allograft pathology. Kidney Int 1999; 55: 713.
32
33
- 34 14. Hueso M, Beltran V, Moreso F, *et al.* Splicing alterations in human renal allografts:
35
36 detection of a new splice variant of protein kinase Par1/Emk1 whose expression is
37
38 associated with an increase of inflammation in protocol biopsies of transplanted
39
40 patients. Biochim. Biophys. Acta (Molecular Basis of Disease) 2004; 1689:58.
41
42
- 43 15. Sugiura Y, Niimi T, Sato S, *et al.* Transforming growth factor- β ₁ gene polymorphism
44
45 in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis 2002; 61:826.
46
47
- 48 16. Buckwalter MS, Wyss-Coray T. Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo. J
49
50 Neuroinflammation 2004; 1: 10.
51
52
- 53 17. Chan CC, Reed GF, Kim Y, *et al.* A correlation of pregnancy term, disease activity,
54
55 serum female hormones, and cytokines in uveitis. Br. J. Ophthalmol. 2004; 88:1506.
56
57
58
59
60

- 1
2
3 18. Mytilineos J, Laux G, Opelz G. Relevance of IL10, TGF β 1, TNF α and IL4R α Gene
4 Polymorphisms in Kidney Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report.
5
6 Am. J. Transplant 2004; 4:1684.
7
8
9
10 19. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in
11 living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. Am J
12 Transplant 2005; 5:1354
13
14
15
16
17 20. Melk A, Henne T, Kollmar T, *et al.* Cytokine single nucleotide polymorphism and
18 intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. Kidney Int
19 2003; 64:314.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLES

Table 1. Baseline characteristics of patients according to TGF- β ₁ genotypes at codons 10 and 25.

	codon 10			<i>P</i> <i>corrected</i>	codon 25			<i>P</i> <i>corrected</i>
	TT	CT	CC		GG	CG	CC	
n	26	33	18		68	9	3	
Recipient gender (Male/Female)	20/6	20/13	11/7	<i>ns</i>	46/22	6/3	0/3	<i>ns</i>
Donor gender (Male/Female)	21/5	25/8	11/7	<i>ns</i>	53/15	6/3	0/3	<i>ns</i>
Recipient age (yr)	46 ± 9	45 ± 15	50 ± 15	<i>ns</i>	46 ± 13	50 ± 16	45 ± 17	<i>ns</i>
Donor age (yr)	38 ± 11	35 ± 16	46 ± 19	<i>ns</i>	37 ± 14	46 ± 21	43 ± 17	<i>ns</i>
First transplant/retransplantation	24/2	27/6	16/2	<i>ns</i>	60/7	5/4	3/0	<i>ns</i>
HLA A+B+DR mismatches	3.1±1.0	3.1±1.1	3.3±1.0	<i>ns</i>	3.2±1.0	2.6±1.0	3.3±0.6	<i>ns</i>
PRA >20% (no/yes)	25/1	30/3	18/0	<i>ns</i>	64/4	8/1	3/0	<i>ns</i>
CIT (hours)	19 ± 5	20 ± 5	21 ± 3	<i>ns</i>	20 ± 5	19 ± 3	22 ± 5	<i>ns</i>
Cyclosporine/Tacrolimus	9/17	15/18	8/10	<i>ns</i>	25/43	5/4	3/0	<i>ns</i>
DGF (no/yes)	21/5	27/6	17/1	<i>ns</i>	57/11	8/1	3/0	<i>ns</i>
Acute rejection (no/yes)	20/6	28/5	15/3	<i>ns</i>	56/12	8/1	1/2	<i>ns</i>

Abbreviations: CIT, cold ischemia time; PRA, panel reactive antibodies; DGF, delayed graft function.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TGF- β_1 gene expression in protocol biopsies from patients with stable renal allograft function

Hueso M, Bover J, Espinosa L, Moreso F, Serón D, Cañas C, Raulf F, Blanco A, Gil-Vernet S, Carreras M, Castelao AM, Grinyó JM, Alsina J

Transplant Proc. 33 :342-4, 2001.



TGF- β_1 Gene Expression in Protocol Biopsies From Patients With Stable Renal Allograft Function

M. Hueso, J. Bover, L. Espinosa, F. Moreso, D. Serón, C. Cañas, F. Raulf, A. Blanco, S. Gil-Vernet, M. Carreras, A.M. Castelaio, J.M. Grinyó, and J. Alsina

CHRONIC transplant nephropathy (CTN) is mainly characterized by the presence of interstitial fibrosis, and it may already be present in early protocol biopsies before it is clinically apparent.¹ A sustained expression of TGF- β_1 , a multifunctional cytokine involved in fibrogenesis and tissue repair following injury, has been suggested in some experimental studies as a common pathway leading to renal fibrosis.² In human diagnostic biopsies performed in allografts with renal dysfunction, it has been reported an association between the qualitative expression of TGF- β_1 mRNA or the increase in TGF- β protein levels and the presence of either fibrosis or chronic transplant rejection.^{3,4} Recently, higher TGF- β_1 protein levels have been significantly related to an increased rate of decline in renal function.⁵ However, it is not known whether an increase in intragraft TGF- β_1 mRNA expression is associated with early histologic features of CTN.

Thus, the goal of our study was to analyze the relationship between histological or clinical findings and the quantitative expression of TGF- β_1 mRNA in protocol allograft biopsies from patients with stable renal function.

PATIENTS AND METHODS

We analyzed protocol biopsies obtained 1 year after transplantation in patients who gave their informed consent and fulfilled the following criteria: (1) serum creatinine <200 μ mol/L; (2) proteinuria <1 g/d; (3) stable renal function, defined as variability of serum creatinine lower than 15% during 2 weeks before and after the biopsy; and (4) cortical renal sample adequate for both histological and molecular biology studies. We also analyzed diagnostic biopsies obtained from allografts displaying pure CTN.

Renal lesions were classified according to the Banff working classification criteria. Protocol biopsies exhibiting subclinical acute rejection or recurrent glomerulonephritis were excluded.

Total RNA was isolated from the biopsy tissue by a commercially available Silica-Gel-membrane based method (RNeasy kit, Qiagen, Chatsworth, Calif) after homogenization and sieving in Qiasredder columns (Qiagen).

Reverse transcription was done as previously described,⁶ and cDNA was amplified by a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) (Taq-Man, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer) using fluorogenic probes. Transforming growth factor was amplified in a 50- μ L reaction mix containing 300 nmol/L of forward primer 5'-GCC GAC TAC T AC GCC AAG GA-3'; 900 nmol/L of reverse primer 5'-TGC TTG AAC TTG

TCA TAG ATT TCG T-3'; 200 nmol/L of TaqMan probe labeled with 6-carboxy-fluorescein and 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine as 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dyes (5'-FAM-TGG GTT TCC ACC ATT AGC ACG CG-TAMRA-3'); and TaqMan Universal PCR master mix. Primers and probe were designed using the Primer Express software v. 1.0 (PE Applied Biosystems). The GAPDH housekeeping gene was used as an internal reference to normalize the initial cDNA amount (TaqMan GAPDH control reagents kit, PE Applied Biosystems). The comparative threshold cycle method (C_T) was applied. A preliminary standardization experiment showed that the efficiencies of the TGF- β_1 and GAPDH amplifications were approximately equal (slope of log input amount vs ΔC_T < 0.1). Normalized TGF- β_1 represents the relative abundance of TGF- β_1 expression to GAPDH and the expression of a normal nongrafted kidney (human renal RNA Promega, Madison, Wisc). The final results show how much TGF- β_1 mRNA is contained in a sample compared with a normal nongrafted kidney.

Results are presented as mean \pm standard error (SEM). Categorical data were compared using the Chi square and Fisher's exact tests. Quantitative data were compared by the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests as appropriate. A *P* value <.05 was considered significant.

RESULTS

A total of 51 protocol biopsies fulfilled the inclusion criteria. Biopsies were obtained 429 ± 9 days after transplantation and the mean follow-up after transplantation was 4.07 ± 0.16 years (range 1.94 to 6.07 years). Most patients (88%) were treated with cyclosporine-based immunosuppression. Baseline characteristics and clinical param-

From the Nephrology Department, CSUB, L'Hospitalet de Llobregat (M.H., J.B., L.E., F.M., D.S., A.B., S.G.-V., A.M.C., J.M.G., J.A.), Barcelona, Spain; Radiology Department, CSUB, L'Hospitalet de Llobregat (C.C.), Barcelona, Spain; Novartis Pharma, Inc., Research Transplantation (F.R.), Basel, Switzerland; and Pathology Department, CSUB, L'Hospitalet de Llobregat (M.C.), Barcelona, Spain.

Partially supported by a grant from Novartis Pharma Inc. and by FISs grants (99/0842) and (00/0368). Miguel Hueso is supported by a fellowship from the Fundació Catalana de Transplantament.

Address reprint requests to Dr J. Bover, Hosp Prinzeps D'Espanya (Bellvitge), Nephrology Service, L'Hospitalet De Llobregat, c/Feixa Llarga S/N, 08907 Barcelona, Spain.

© 2001 by Elsevier Science Inc.
655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010

0041-1345/01/\$-see front matter
PII S0041-1345(00)02039-X

Orig. Op.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	COMMENTS	ARTNO:
1st kmm, 2nd lml-s	smithv	3					10676

Table 1. Baseline Clinical Characteristics of Patients According to the Banff Criteria

	Normal	Borderline	CTN	CTN + Borderline	P
Number of patients	19	5	16	11	
Donor age (years)	43 ± 4	38 ± 10	30 ± 3	46 ± 6	ns
Donor sex (male/female)	12/7	2/3	14/2	7/4	ns
Recipient age (years)	48 ± 3	43 ± 5	47 ± 3	47 ± 3	ns
Recipient sex (male/female)	12/7	3/2	9/7	7/4	ns
Number of transplant (1st, non 1st)	18/1	5/0	12/4	10/1	ns
PRA >20%	2 (10%)	0	2 (12%)	2 (18%)	ns
HLA DR mismatches	0.5 ± 0.1	0	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	ns
HLA DR identities	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	ns
HLA A mismatches	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1 ± 0.2	ns
HLA B mismatches	1.0 ± 0.1	1 ± 0	1.1 ± 0.2	1 ± 0.2	ns
CIT (hours)	21 ± 1	23 ± 2	23 ± 2	19 ± 1	ns
DGF (yes/no)	5/14	0/5	5/11	1/10	ns
AR (yes/no)	3/16	2/3	5/11	2/9	ns

Results are expressed as mean ± SEM.

PRA = panel reactive antibodies, CIT = cold ischemia time, DGF = delayed graft function, AR = acute rejection.

eters of patients at the time of the protocol biopsy are shown in Tables 1 and 2.

Twenty-five diagnostic biopsies were also evaluated because of deteriorating renal function or proteinuria. Seven biopsies did not contain glomeruli, and nine biopsies were excluded (CTN with superimposed grade I acute rejection 1, CTN and borderline changes 2, de novo membranous nephropathy 3, and recidives of a primary glomerulonephritis 3). Thus, nine biopsies displaying only CTN were used for comparison. These biopsies were obtained 1878 ± 364 days after transplantation.

Histological Diagnosis Molecular Biology

The mean number of glomeruli was 11 ± 0.7. According to the Banff criteria, 28 biopsies were adequate, 7 were minimal, and 16 were marginal. The mean glomerular number in minimal and marginal specimens was 7.8 ± 0.2 and 4.5 ± 0.4 glomeruli, respectively.

TGF-β₁ transcription was detected in all biopsies. The relationship between 1-year histological findings classified according to the Banff schema and the quantitative expression of TGF-β₁ mRNA in protocol biopsies is shown in Fig 1. Despite grouping the biopsies only according to the presence or absence of interstitial fibrosis, differences were

not apparent between groups (1.29 ± 0.39 vs 1.17 ± 0.25, respectively). Furthermore, we did not find any association between any histological finding and the quantitative expression of TGF-β₁ mRNA. However, when protocol (n = 16) and diagnostic biopsies (n = 9) displaying pure CTN were compared, diagnostic biopsies expressed higher TGF-β₁ mRNA levels (2.04 ± 0.51, P = .04).

From the clinical point of view, in protocol biopsies we did not find any correlation between TGF-β₁ mRNA expression and mean arterial pressure, creatinine, or proteinuria at the time of biopsy or any clinical parameter during follow-up.

DISCUSSION

A sustained overexpression of TGF β₁ has been proposed as the main pathogenic factor leading to parenchymal fibrosis and CTN, mostly in experimental studies.^{2,7} Nevertheless, very little is known in the setting of human transplantation, where most of the available data has been obtained from diagnostic biopsies in dysfunctioning grafts.^{3,4} Since CTN may already be present early after renal transplantation, the aim of our study was to analyze whether quantitative expression of TGF-β₁, using a novel real-time PCR method, is associated with early histological

Table 2. Clinical Parameters at the Time of Renal Biopsy

	Normal	Borderline	CTN	CTN + Borderline	P
Number of patients	19	5	16	11	
Serum creatinine (μmol/L)	132 ± 7	127 ± 13	128 ± 7	143 ± 12	ns
Proteinuria (mg/24 hours)	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.001	0.25 ± 0.04	0.31 ± 0.06	ns
MBP (mmHg)	102 ± 3	108 ± 2	102 ± 3	104 ± 3	ns
ACEI (yes/no)	1/18	0/5	2/14	2/9	ns
CsA (yes/no)	16/3	5/0	15/1	9/2	ns
CsA mean dose (mg/kg per day)	3.6 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.6 ± 0.5	3.3 ± 0.4	ns
CsA mean levels (ng/mL)	163 ± 20	101 ± 17	142 ± 11	136 ± 16	ns
MMF (yes/no)	8/11	3/2	3/13	4/7	ns

Results are expressed as mean ± SEM.

CsA = cyclosporine, MMF = mycophenolate mofetil, MBP = mean blood pressure, ACEI = angiotensin converting-enzyme inhibitors.

Orig. Gp.	OPERATOR:	Session	PROOF:	PE's:	AA's:	COMMENTS	ARTNO:
1st kmm, 2nd lml-s	smithv	3					10676

zjs=Mechanisms of allograft rejection

zjss=Mechanisms of allograft rejection

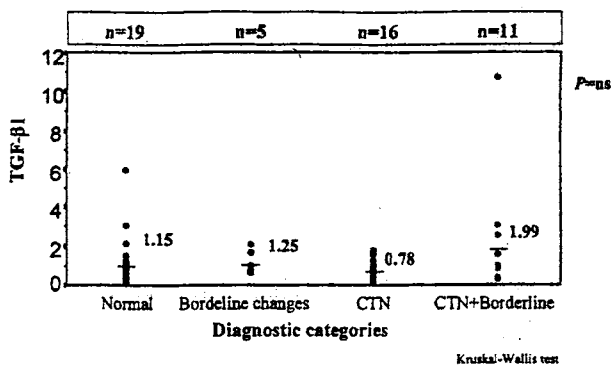


Fig 1. Individual normalized TGF- β_1 expression according to different histological diagnosis in protocol biopsies. The results show how much TGF- β_1 mRNA is contained in a sample compared with a normal nongrafted kidney. CTN = chronic transplant nephropathy, NS = not significant Kruskal-Wallis test.

features of CTN in protocol allograft biopsies from patients with stable renal function.

We found that chronic transplant nephropathy was present in 53% of these protocol biopsies, as it has been previously described.¹ Additionally, unlike previous reports, which have found that TGF- β_1 mRNA by qualitative PCR is associated with CTN in diagnostic allograft biopsies,⁴ we did not find differences among quantitative TGF- β_1 mRNA expression and interstitial fibrosis or other stratified histological diagnosis in protocol biopsies. Thus, we show that CTN may be present in stable transplant patients in the absence of intragraft TGF- β_1 mRNA overexpression. Since TGF- β_1 mRNA was indeed higher in our subgroup of diagnostic biopsies with CTN as shown by others,⁴ it needs to be considered that this increase of TGF- α_1 mRNA in dysfunctioning grafts may just reflect an ongoing overt reparative process.

Our results suggest that a sustained overexpression of TGF- β_1 may not be mandatory to induce early CTN. Fibrosis is a complex process involving the interaction between multiple humoral factors and cell types so that

other factors may play a role.⁸ Actually, in renal transplants and among other chronically rejected organs, several reports did not find differences in TGF- β expression⁹⁻¹¹ and, recently, the severity of CTN was found to be independent of the levels of TGF- β within the allograft in an experimental mouse model.¹² However, it has to be borne in mind that the activity of TGF- β_1 is also regulated posttranscriptionally,⁷ so that we cannot completely rule out a potential role for TGF- β_1 .

We conclude that CTN is present in 53% of this subset of protocol biopsies. Nevertheless, TGF- β_1 mRNA expression is not associated with any histological change or clinical data at the time of the protocol biopsy or follow-up, but it is higher in diagnostic biopsies with CTN. These results suggest that a sustained overexpression of TGF- β_1 mRNA may not precede the development of CTN, and hence TGF- β_1 mRNA expression may not be a properly sensitive surrogate marker of subclinical CTN.

REFERENCES

1. Serón D, Moreso F, Bover J, et al: *Kidney Int* 51:310, 1997
2. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, et al: *Kidney Int* 45:916, 1994
3. Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, et al: *J Am Soc Nephrol* 6:286, 1995
4. Sharma VK, Bologa RM, Xu G-P, et al: *Kidney Int* 49:1297, 1996
5. Cuhaci B, Kumar MSA, Bloom RD, et al: *Transplantation* 68:785, 1999
6. Herrero I, Torras J, Riera M, et al: *Nephrol Dial Transplant* 14:872, 1999
7. Brenchley PEC, Short CD, Roberts ISD: *Nephrol Dial Transplant* 13:548, 1998
8. Eddy AA: *J Am Soc Nephrol* 7:2495, 1996
9. Lantz I, Dimény E, Larsson E, et al: *Transpl Immunol* 4:209, 1996
10. Horvath LZ, Friess H, Schilling M, et al: *Kidney Int* 50:489, 1996
11. Kouwenhoven EA, Stein-Oakley AN, Joblonski P, et al: *Dig Dis Sci* 44:1117, 1999
12. Mannon RB, Kopp JB, Ruiz P, et al: *Kidney Int* 55:1935, 1999

Angiotensin Converting Enzyme Genotype and Chronic Allograft Nephropathy in Protocol Biopsies

Hueso M, Alía P, Moreso F, Beltrán-Sastre V, Riera L, González C, Navarro MA, Grinyó JM, Navarro E, Serón D

J. Am. Soc. Nephrol. 15:2229-2236, 2004.

Angiotensin Converting Enzyme Genotype and Chronic Allograft Nephropathy in Protocol Biopsies

MIGUEL HUESO,*† PEDRO ALÍA,‡ FRANCESC MORESO,*
VIOLETA BELTRÁN-SASTRE,† LUIS RIERA,§ CARLOTA GONZÁLEZ,||
MIGUEL ÁNGEL NAVARRO,‡ JOSEP MARIA GRINYÓ,* ESTANIS NAVARRO,† and
DANIEL SERÓN*

*Nephrology Department, Hospital Universitario Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain;

†Centre d'Oncologia Molecular, Institut de Recerca Oncològica (COM-IRO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ‡Biochemistry Department, Hospital Universitario Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; §Urology Department, Hospital Universitario Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; and ||Transplant Coordination Unit, Hospital Universitario Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract. Genotype DD of the angiotensin-converting enzyme (ACE) is not associated with an increased incidence of native renal diseases, although it could modulate progression to renal failure in patients who already display chronic lesions. Because its role in renal allograft degeneration is not well characterized, whether ACE genotype was associated with the prevalence of chronic allograft nephropathy (CAN) was studied, in a group of protocol biopsies from 180 patients, or with the incidence of CAN in 152 patients with at least two sequential biopsies. As a control group, ACE genotype was also studied in 41 donors and 72 healthy subjects. For analyzing the influence of ACE genotype in graft survival, patients were grouped into six categories (II-normal biopsy, ID-normal, DD-normal, II-CAN, ID-CAN and DD-CAN). Finally, relative renal ACE mRNA levels were measured in 67 cases by real-time PCR using the delta threshold cycle method. ACE-DD genotype was more

frequent in patients who received a transplant than in control subjects (43.3% versus 30.1%, $P = 0.026$), but prevalence (DD = 42.7% versus non-DD = 42.2%) or incidence (DD = 24.6% versus non-DD = 29.9%) of CAN was not different regarding recipient ACE genotype. Furthermore, patients with the ACE-DD genotype and CAN had the poorest graft survival (II-normal = 100%, ID-normal = 91%, DD-normal = 84%, II-CAN = 100%, ID-CAN = 66%, and DD-CAN = 36%; $P = 0.034$) and higher ACE mRNA levels than non-DD and CAN (DD = -3.36 ± 2.35 versus non-DD = -5.65 ± 1.72 -fold in ACE copies; $P = 0.012$). It is concluded that ACE-DD genotype is not associated with an increased prevalence or incidence of CAN but is actually associated with higher ACE mRNA levels and poorer graft survival in patients who already display CAN.

Chronic allograft nephropathy (CAN) is the main cause of late graft loss (1), and its appearance and progression is a complex issue that has been associated with the activation of factors either related or unrelated to the alloantigenic challenge (2). Moreover, a number of genetic factors from donors and recipients also have been proposed to modulate the detrimental effect of different risk factors for the development of CAN (3,4).

One of the gene systems that could have a relevant role in the pathogenesis of CAN is the renin angiotensin system (RAS), because its blockade has clearly demonstrated a bene-

ficial effect in different chronic nephropathies (5,6). Consequently, the molecular characterization of gene polymorphisms of the RAS represents an area of intense research to evaluate the susceptibility of the kidney to different diseases and the response to RAS blockade therapies (7), especially regarding the angiotensin I-converting enzyme (ACE), the key regulatory step in the conversion of angiotensin I to angiotensin II. Thus, it is not surprising that a number of polymorphisms of the ACE gene had been associated with the progressive deterioration of the renal function in different kidney diseases (8–10) but not with the increase of their prevalence or incidence (7).

In transplanted kidneys, scant information is currently available on the association of the different ACE genotypes and the appearance of CAN. In this sense, it has been reported that recipient ACE-DD genotype is associated with an increased serum creatinine level at 3 yr, although histologic diagnosis was not available (11). Furthermore, an association between recipient DD genotype and graft survival has been reported in patients with deteriorating renal function, as well as in pediatric recipients, although this association has not been confirmed

Received March 25, 2004. Accepted May 18, 2004.

Correspondence to Dr. Daniel Serón, Nephrology Department, Hospital Universitario Bellvitge, Feixa Llarga s/n, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E08907, Spain. Phone: +34-932607602; Fax: +34-932607607; E-mail: 17664dsm@comb.es

1046-6673/1508-2229

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 2004 by the American Society of Nephrology

DOI: 10.1097/01.ASN.0000135054.54810.75

by others, suggesting that DD genotype could modulate the evolution of renal transplants only in kidneys that already display structural damage (12–15).

Protocol biopsies are currently used to study the natural history of CAN and its relationship to potential risk factors (1,16) and also are useful to design studies aimed to prevent or treat CAN, because they increase the statistical power in comparison with classical epidemiologic studies based on clinical surrogates of long-term graft survival (17,18). Thus, the aim of this study was to analyze whether ACE genotype is associated with the prevalence or incidence of CAN in protocol biopsies or with renal allograft survival. Furthermore, we evaluated the association between renal ACE mRNA levels and ACE genotype.

Materials and Methods

Patients

A prospective study of protocol renal allograft biopsies was conducted in our center since 1988. In this study, an early protocol biopsy was performed at 3 to 6 mo in patients who gave their informed consent and fulfilled the following criteria: (1) serum creatinine <300 $\mu\text{mol/L}$; (2) proteinuria <1 g/d; and (3) stable renal function, defined as variability of serum creatinine of <15% during 2 wk before and after biopsy (1). Until 1999, a second protocol biopsy was performed at ~1 yr after transplantation regardless of serum creatinine or proteinuria (17,18). Donor biopsies were obtained between 1995 and 1997 and since 1999.

Since 1999, blood samples from kidney allograft donors and recipients were obtained to determine ACE genotype. ACE genotype was also determined in all recipients from which a protocol biopsy was available and came to the outpatient clinic between October and December 2001, regardless of graft function or graft loss. A sample of 72 healthy volunteers and 41 cadaver donors served as controls to study the distribution of ACE genotype in the general population. This study was approved by the Ethics Committee of our hospital, and written informed consent was obtained from all patients.

Study Design

The prevalence of CAN during the first year was estimated considering all patients for whom at least one protocol biopsy was available. In patients with an early and a late protocol biopsy, only the first one was considered for the prevalence analysis.

To estimate the incidence of CAN, we considered only patients with at least two sequential biopsies: (1) a donor and an early protocol biopsy and (2) a donor and late protocol biopsy or (3) an early and a late protocol biopsy. Incidence of CAN was defined as the appearance of CAN in a protocol biopsy in patients with a previous biopsy not displaying CAN.

Definition of Clinical Variables

The following variables were evaluated before transplantation: age and gender of the donor and recipient, number of HLA mismatches, panel-reactive antibodies, and cold ischemia time. After transplantation, we assessed the following variables: immunosuppressive treatment, acute tubular necrosis, acute rejection (defined as an acute rise of serum creatinine that responded to antirejection therapy), serum creatinine, creatinine clearance calculated by means of the Cockcroft-Gault formula (19), proteinuria, mean arterial pressure at the time of biopsy, use of antihypertensive drugs and ACE inhibitors, and mean cyclosporine (CsA) or tacrolimus levels at renal biopsy.

Biopsies

We performed wedge preimplantation biopsies and protocol biopsies with a spring-loaded, 16-gauge, automated gun under ultrasound guidance. Two cores of tissue were obtained. One core was processed for conventional histology (1), and the other one was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction. Renal lesions were scored according to the 1997 Banff working classification criteria (20). All biopsies contained at least one glomerular and one arterial section.

Determination of ACE Polymorphisms

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells according to standard methods (21). Detection of the deletion (D) and insertion (I) alleles of the ACE gene was performed by amplification of a fragment within intron 16 (22) with 1 μmol of the following primers: (sense 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' and antisense 5'-GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT-3') in a final volume of 25 μl that contained 50 to 200 ng of genomic DNA. DNA was amplified for 35 cycles at 94°C for 45 s, 60°C for 60 s, and 72°C for 60 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were resolved in 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide (band sizes were 192 bp for allele D and 472 bp for allele I). For avoiding mistyping of I/D as a result of insufficient amplification of I allele, an insertion-specific PCR was performed with primers ACE/II-UP 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' and ACE/II-DOWN 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3' in the same conditions stated above, except that the extension temperature was 65°C . These primers amplified a 335-bp band.

Real-Time Quantitative PCR Analysis of ACE

Total RNA isolation and reverse transcription were done as described previously (23). Approximately 500 ng of cDNA was amplified (in triplicate) by real-time quantitative PCR (Taq-Man, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer) using optimized Assays-on-Demand gene expression products (ECA Assay, ID number: Hs00174179_m1; Applied Biosystems). Amplification reactions included 900 nM primers and 250 nM probe (FAM dye-labeled TaqMan-MGB probe) in TaqMan Universal PCR master mix and were performed at universal thermal cycling conditions (a first step of 2 min at 50°C to activate AmpErase-UNG enzyme, a second step of 10 min at 95°C to activate AmpliTaq polymerase, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C) following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). As internal control for normalization, we amplified the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase housekeeping gene with a commercial pair of primers (PDARS; Applied Biosystems). All amplification batches included controls without template and cDNA aliquots from two samples that served as positive controls and were repeatedly quantified to assess interassay variability. ACE mRNA levels were quantified using the delta threshold cycle (C_T) method, based in the relative quantification of ACE expression normalized to the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after determining the first cycle of fluorescence detection (threshold cycle) and calculating the differences of these threshold cycles (24,25). Samples with C_T values ≥ 36 were excluded from analysis because they were outside the proven linear dynamic range of the assays.

Statistical Analyses

Results were expressed as the mean \pm SD. We used the frequency of I/D alleles to perform a Hardy-Weinberg equilibrium test on the patients and the χ^2 test to compare the expected and observed geno-

type frequencies. χ^2 test was also used to compare qualitative data. *T* test and ANOVA were used to compare normally distributed quantitative data. Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis test were applied to compare nonparametric data. Patient survival, death-censored graft survival, and death-censored graft survival excluding graft loss for any other reason than CAN were calculated by Kaplan Meier analysis, and the statistical significance of the differences was assessed by the log-rank test. A two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Baseline Characteristics

This study included 180 recipients of cadaver kidney grafts, 117 men and 63 women, with a mean age of 47 ± 12 yr. Of these patients, 152 received a first, 26 a second, and two a third renal transplant. A total of 122 patients followed a CsA and prednisone treatment associated with antilymphocytic antibodies ($n = 45$), azathioprine ($n = 14$), mycophenolate mofetil ($n = 46$), or sirolimus ($n = 4$). Forty-nine patients received tacrolimus and prednisone associated with mycophenolate mofetil ($n = 43$) or sirolimus ($n = 6$). In addition, nine patients were treated with antilymphocytic antibodies, mycophenolate mofetil, and prednisone. Finally, at the time of protocol biopsy, the maintenance immunosuppression used was based on CsA in 123 patients and on tacrolimus in 52 patients, and five patients received an anticalcineurinic-free treatment.

The frequency of the D and I alleles of the ACE gene in patients who received a transplant was 66.1% and 33.9%, respectively, with the ACE genotype distribution being in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium.

To study the distribution of ACE genotypes in the normal population, we used 113 control samples, obtained from 72 volunteers without renal disease and from 41 cadaveric renal allograft donors (mean age, 42 ± 13 yr; 49.6% men and 50.4% women). The distribution of ACE genotype in patients who received a transplant was close to being statistically different from the control group (DD = 43.3%, ID = 45.6%, II = 11.1% versus DD = 30.1%, ID = 54.9%, II = 15%, respectively; $P = 0.072$), although a higher proportion of the

ACE-DD genotype was observed in the group that received a transplant (DD = 43.3%, non-DD = 56.7% in patients who received a transplant versus DD = 30.1%, non-DD = 69.9% in controls; $P = 0.026$).

The baseline characteristics of patients are shown in Table 1. The cause of the ESRD and the immunosuppressive therapy used were not different in the groups defined by the different ACE genotypes.

ACE Genotypes and CAN Prevalence

To evaluate CAN prevalence, we performed protocol biopsies at 175 ± 90 d. Mean glomerular number per biopsy was 13 ± 7 , and sample size distribution according to 1997 Banff criteria was as follows: 119 (66.1%) biopsies were adequate (≥ 10 glomeruli, more than two arteries), 34 (18.9%) biopsies represented minimum sample adequacy (between seven and nine glomeruli and at least one arterial section), and 27 (15%) biopsies were inadequate (between one and six glomeruli and at least one arterial section).

Banff diagnosis distribution was not different in the recipients grouped according to ACE genotype (Table 2). When patients were classified according to the presence or absence of CAN, ACE genotype distribution was also not different (data not shown). Furthermore, there was no association between CAN grade and ACE genotype distribution. Banff scores of the biopsies, grouped according to the ACE genotype of recipients, were also not different (Table 3). Finally, no significant differences were observed in the characteristics of patients at the time of biopsy between the various ACE genotype groups (Table 4).

The prevalence of CAN according to ACE genotype in patients who received induction therapy (DD = 41.2%, ID = 42.9%, II = 60%) and in patients without induction therapy (DD = 40.9%, ID = 41%, II = 40%) was not different. Similar results were observed taking into consideration the maintenance immunosuppressive therapy (DD = 44.2%, ID = 44.2%, II = 11.5% in patients with CsA versus DD = 40.9%, ID = 45.5%, II = 13.6% in patients with tacrolimus).

Table 1. Baseline characteristics of patients according to the ACE genotype^a

	II	ID	DD	<i>P</i>
<i>n</i>	20	82	78	
Recipient gender (men/women)	12/8	54/28	51/27	NS
Donor gender (men/women)	16/4	55/27	55/23	NS
Recipient age (yr)	43 ± 14	47 ± 12	48 ± 12	NS
Donor age (yr)	35 ± 14	40 ± 17	40 ± 16	NS
First transplant/retransplantation	17/3	72/10	63/15	NS
HLA A+B+DR mismatches	2.95 ± 1.23	3.20 ± 0.95	2.95 ± 1.16	NS
PRA >20%	15%	11%	16.7%	NS
CIT (h)	21 ± 4	20 ± 5	21 ± 5	NS
DGF (no/yes)	17/3	66/16	63/15	NS
Acute rejection (no/yes)	17/3	63/19	60/18	NS
Follow-up (mo)	55 ± 33	53 ± 28	65 ± 33	NS

^a ACE, angiotensin-converting enzyme; CIT, cold ischemia time; PRA, panel reactive antibodies; DGF, delayed graft function.

Table 2. Banff diagnosis distribution according to ACE genotype^a

	II	ID	DD	P
<i>n</i>	20	82	78	
Normal	8 (40%)	40 (48.8%)	38 (48.7%)	
Borderline	1 (5%)	3 (3.7%)	8 (10.3%)	
Subclinical acute rejection	2 (10%)	5 (6.1%)	0	
CAN	9 (45%)	34 (41.4%)	32 (41.0%)	NS

^a CAN, chronic allograft nephropathy.

Table 3. Severity of acute and chronic lesions according to ACE genotype^a

	II	ID	DD	P
<i>n</i>	20	82	78	
g	0.20 ± 0.52	0.09 ± 0.34	0.17 ± 0.49	NS
i	0.55 ± 0.83	0.49 ± 0.61	0.46 ± 0.62	NS
t	0.35 ± 0.67	0.45 ± 0.71	0.28 ± 0.51	NS
v	0	0.03 ± 0.19	0.01 ± 0.11	NS
ah	0.25 ± 0.55	0.26 ± 0.52	0.22 ± 0.50	NS
cg	0.05 ± 0.22	0.16 ± 0.46	0.23 ± 0.42	NS
ci	0.65 ± 0.81	0.57 ± 0.74	0.56 ± 0.66	NS
ct	0.70 ± 0.73	0.61 ± 0.73	0.58 ± 0.66	NS
cv	0.40 ± 0.68	0.38 ± 0.83	0.19 ± 0.49	NS

^a g, glomerulitis; i, interstitial infiltrate; t, tubulitis; v, vasculitis; ah, arteriolar hyalinosis; cg, chronic glomerular lesion; ci, chronic interstitial lesion; ct, chronic tubular lesion; cv, chronic vascular lesion.

Table 4. Characteristics of patients at the time of protocol biopsy according to the ACE genotype^a

	II	ID	DD	P
<i>n</i>	20	82	78	
Serum creatinine level (μmol/L)	129 ± 30	140 ± 39	137 ± 48	NS
Creatinine clearance (ml/min)	59 ± 12	56 ± 17	58 ± 19	NS
Proteinuria (g/d)	0.29 ± 0.18	0.31 ± 0.23	0.30 ± 0.19	NS
Cholesterol (mmol/L)	5.51 ± 1.17	5.68 ± 0.89	5.89 ± 0.96	NS
MAP (mmHg)	103 ± 10	102 ± 13	102 ± 11	NS
Antihypertensive drugs (yes/no)	13/7	48/34	42/36	NS
ACEI (yes/no)	1/19	6/76	7/71	NS
CsA/tacrolimus	14/6	54/26	55/20	NS
CsA levels (ng/ml)	159 ± 52	170 ± 59	167 ± 74	NS
Tacrolimus levels (ng/ml)	10.28 ± 4.80	8.63 ± 3.22	9.24 ± 3.79	NS
Time of biopsy (d)	184 ± 97	168 ± 85	175 ± 90	NS

^a MAP, mean arterial pressure; CsA, cyclosporine; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor.

ACE Genotype and CAN Incidence

To evaluate the association between ACE genotype and CAN incidence, we analyzed 152 patients with at least two sequential biopsies: (1) a donor and an early protocol biopsy (*n* = 77), (2) a donor and a late protocol biopsy (*n* = 55), and (3) an early and a late protocol biopsy (*n* = 20). Early protocol biopsies were performed 153 ± 46 d and late protocol biopsies at 456 ± 93 d after transplantation. Progression to CAN was observed in 42 patients, 83 cases did not progress, and 27 cases

showed CAN in both biopsies. We did not observe any significant difference in the ACE genotype between patients with progression to CAN (DD = 38.1%, ID = 47.6%, II = 14.3%), patients without progression to CAN (DD = 44.6%, ID = 48.2%, II = 7.2%), and patients who showed CAN in both biopsies (DD = 44.5%, ID = 40.7%, II = 14.8%). Even when patients were grouped as DD or non-DD, the incidence of CAN was also not different.

The incidence of CAN according to ACE genotype in the 45

patients who received induction therapy (DD = 62.5%, ID = 37.5%, II = 0%) and in the 107 patients who did not receive induction therapy (DD = 32.4%, ID = 50%, II = 17.6%) was not different. Similar results were observed taking into consideration the maintenance immunosuppressive therapy (DD = 28.6%, ID = 53.6%, and II = 17.8% in 104 CsA-treated patients *versus* DD = 57.1%, ID = 35.7%, II = 7.2% in 44 tacrolimus-treated patients).

ACE Genotypes and Graft Survival

At 12 yr of follow-up, 29 patients lost their graft for the following reasons: CAN (*n* = 14), acute rejection after protocol biopsy (*n* = 5), glomerulonephritis associated with hepatitis C virus (*n* = 4), recurrence of the primary disease (*n* = 3), nontreatment compliance (*n* = 2), and chronic pyelonephritis (*n* = 1).

Patient survival (DD, 95%; ID, 98%; II, 90%; NS), death-censored graft survival (DD, 33%; ID, 64%; II, 70%; NS), and death-censored graft survival excluding patients who lost their graft for reasons other than CAN (DD, 51%; ID, 78%; II, 100%; NS) were not different in patients who were grouped according to ACE genotypes.

Taking into consideration that the presence of CAN in the protocol biopsy is an independent predictor of graft survival, we analyzed the possible influence of ACE genotype to modulate the progression to renal failure. For this purpose, patients were grouped into six categories: II-normal biopsy, ID-normal biopsy, DD-normal biopsy, II-CAN, ID-CAN, and DD-CAN. As shown in Table 5, there were no clinical differences among groups. However, death-censored graft survival excluding patients who lost their graft for any other reason than CAN was significantly lower in DD-CAN patients.

ACE Genotype and Relative Quantification of Renal ACE mRNA

The association between renal ACE mRNA levels in the protocol biopsy and the recipient ACE genotype was analyzed in 67 cases. In addition, the association between renal ACE

mRNA levels and donor ACE genotype was analyzed in 40 cases. Three cases were excluded from the analysis because of a *C_T* value >36.

We did not observe significant differences in the ACE mRNA levels in protocol biopsies according to recipient ACE genotype (DD = -3.91 ± 2.64-fold, *n* = 23; ID = -4.57 ± 2.70-fold, *n* = 34; II = -4.84 ± 1.98-fold in ACE copies, *n* = 7; NS). Similar results were obtained when patients who were treated with ACE inhibitors (*n* = 6) were excluded from the analysis (data not shown).

Taking into consideration the influence of ACE genotype in graft survival, we reanalyzed whether ACE mRNA levels were different in the six diagnostic categories (II-normal biopsy, ID-normal biopsy, DD-normal biopsy, II-CAN, ID-CAN, and DD-CAN) despite the small sample size in some groups, and we did not observe any statistical difference among groups (Figure 1). To increase the statistical power, we grouped patients as DD and non-DD genotype according to the histologic diagnosis and observed higher ACE mRNA levels in allografts displaying CAN and ACE-DD genotype when compared with allografts displaying CAN and non-DD genotype (DD = -3.36 ± 2.35, *n* = 9; non-DD = -5.65 ± 1.72 folds in ACE copies, *n* = 15; *P* = 0.012).

In addition, we analyzed the possible association between the immunosuppression in ACE mRNA levels according to ACE genotype, but we did not observe significant differences regarding the maintenance therapy (tacrolimus-DD = -4.97 ± 0.73-fold, *n* = 12; tacrolimus-ID = -3.97 ± 2.84-fold, *n* = 20; tacrolimus-II = -4.39 ± 1.84-fold in ACE copies, *n* = 5; CsA-DD = -2.75 ± 3.45-fold, *n* = 11; CsA-ID = -5.44 ± 2.32-fold, *n* = 14; CsA-II = -5.97 ± 2.55-fold in ACE copies, *n* = 2; NS). We could not analyze the relationship between the induction therapy and ACE mRNA levels because only six tissue samples from patients after induction therapy were available to determine ACE mRNA levels.

Finally, when we analyzed ACE mRNA levels in the protocol biopsies, considering the different ACE genotypes from donors, we did not observe any significant difference (DD =

Table 5. Clinical characteristics of patients at the time of protocol biopsy grouped according to the ACE genotype and presence or absence of CAN

	II-Normal	ID-Normal	DD-Normal	II-CAN	ID-CAN	DD-CAN	<i>P</i>
<i>n</i>	8	42	42	8	34	31	
Serum creatinine level (mmol/L)	118 ± 24	130 ± 27	130 ± 45	137 ± 35	149 ± 47	147 ± 53	NS
Creatinine clearance (ml/min)	59 ± 4	59 ± 14	57 ± 17	55 ± 18	53 ± 19	59 ± 23	NS
Proteinuria (g/d)	0.28 ± 0.23	0.25 ± 0.18	0.28 ± 0.18	0.25 ± 0.14	0.37 ± 0.26	0.31 ± 0.21	NS
Cholesterol (mmol/L)	5.40 ± 1.02	5.69 ± 0.92	5.69 ± 0.97	5.83 ± 1.19	5.62 ± 0.87	6.10 ± 0.97	NS
MAP (mmHg)	109 ± 8	102 ± 13	100 ± 12	102 ± 10	104 ± 13	103 ± 10	NS
Antihypertensive drugs (yes/no)	6/2	22/20	20/22	4/4	23/11	20/11	NS
ACEI (yes/no)	1/7	5/37	4/38	0/8	0/34	2/29	NS
CsA/tacrolimus	6/2	26/15	28/11	5/3	23/10	22/9	NS
CsA levels	151 ± 46	175 ± 59	151 ± 60	166 ± 66	170 ± 62	184 ± 88	NS
Tacrolimus levels	12.7 ± 4.1	9.9 ± 2.4	8.5 ± 1.6	11.5 ± 1.4	7.1 ± 3.6	10.2 ± 5.5	NS
Survival (%)	100	91	84	100	66	36	0.034

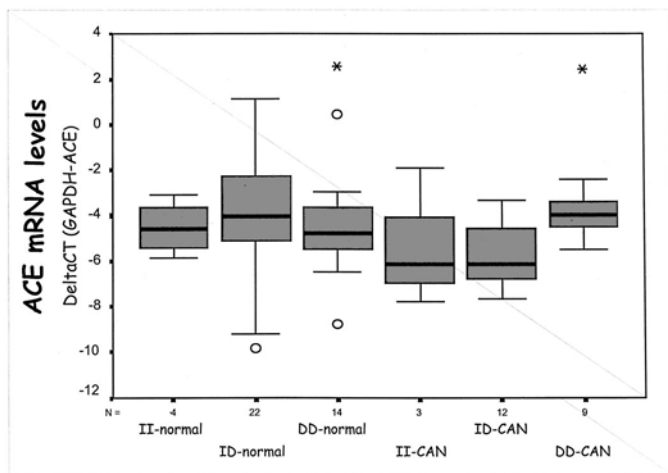


Figure 1. Box plot summarizing the relative quantification of intrarenal angiotensin-converting enzyme (ACE) mRNA levels. Each box shows the median, quartiles, the outliers (○), and the extreme values (*). The box represents the interquartile range that contains 50% of values. The whiskers are lines that extend from the box to the highest and lowest values, excluding outliers. A line across the box indicates the median. ACE mRNA levels were calculated using the threshold cycle (C_T) method normalized for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as the difference in their C_T . Values represent the n-fold differences in the number of ACE transcripts.

-4.64 ± 2.17 -fold, $n = 12$; ID = -4.40 ± 3.16 -fold, $n = 22$; II = 0.72 ± 0.41 -fold in ACE copies, $n = 3$; NS). There were no differences between groups when patients who were treated with ACE inhibitors were excluded (data not shown).

Discussion

The role of ACE polymorphisms in the appearance and progression of CAN is not yet well defined. The possible detrimental effect of the DD genotype in renal transplantation has relied on the evolution of renal function but not on histologic assessment of renal damage, and available studies have reported contradictory results regarding this topic. In the present study, protocol biopsies were used to analyze the impact of donor and recipient ACE genotypes in the prevalence and incidence of CAN, as well as on graft survival. Protocol biopsies allow the early diagnosis of CAN, even in patients without proteinuria and normal renal function, as well as the assessment of the progression of CAN (in sequential protocol biopsies) with reasonable accuracy (16,26). A number of studies showed that the presence of CAN in protocol biopsies is an independent predictor of long-term renal allograft survival (1) and that protocol biopsies could be used as a primary efficacy variable in trials aimed to prevent CAN, because they allow the sample size to be reduced (18).

In the present study, we observed a higher proportion of homozygous DD alleles in renal transplant recipients when compared with a control population without known renal disease. This result is not surprising when we take into consideration that the ACE-DD genotype is more prevalent in patients

on dialysis (27), and it has been associated with the progression of chronic renal failure in different renal diseases such as diabetic nephropathy, IgA nephropathy, and polycystic kidney disease (8–10). It is important to remark that ACE-DD genotype has not been related to an increased prevalence or incidence of any of the above mentioned renal diseases but to a poorer outcome once renal structural damage has already appeared. These observations suggest that ACE genotype modulates progression to chronic renal failure only in patients who already display chronic lesions, but that does not increase the susceptibility to renal disease. In our study, we failed to observe any association between ACE genotype and the prevalence or incidence of CAN. In previous studies, it has been shown that donor age, acute rejection, CsA toxicity, and delayed graft function were associated with the presence of CAN in protocol biopsies (1,16). In addition, we did not observe any association among the various immunosuppressive treatments used and the prevalence or incidence of CAN in the various ACE genotype groups. Thus, our data indicate that ACE genotype is not a major risk factor for developing CAN.

Various reports have failed to establish any association between ACE genotype and graft survival in the general population of transplant recipients (12,14,15). However, it has been reported that recipient—but not donor—ACE-DD genotype has a negative impact on the long-term graft survival in patients who are at high risk for graft loss, such as patients with creatinine clearance <50 ml/min or proteinuria ≥ 0.5 g/d at 12 mo after transplantation (12). A similar observation has been made in pediatric recipients, a population with a higher risk for developing allograft dysfunction as a result of their increased immune alloresponsiveness, high renin activity, and the ability to activate the RAS pathway after injuries (13). These observations suggest that the ACE genotype would act as a genetic modifier of the progression to chronic renal failure once structural damage is already present. However, in these studies, renal histology was not available, and, consequently, it is not possible to rule out that other causes of graft dysfunction such as nephrotoxicity, acute rejection, and recurrent or “*de novo*” glomerulonephritis were responsible for renal function deterioration in patients who display the ACE-DD genotype. In our study, we observed that the ACE-DD genotype was associated with a reduced graft survival in patients who already display CAN in the protocol biopsy but not in patients without chronic renal lesions.

Finally, we observed that ACE-DD recipients who displayed CAN in the protocol biopsy had higher renal ACE mRNA levels than non-DD patients with CAN. This result is in agreement with the observation that the ACE-DD genotype is associated with increased ACE levels, although in normal allografts, we failed to find this observation, suggesting that there are other factors that modulate ACE gene expression (28–30). On the contrary, we did not observe any association between ACE mRNA levels and ACE genotype in donors. These observations are in agreement with the observation that recipient—but not donor—ACE genotype had been associated with graft survival (12). Moreover, current data suggest that graft-infiltrating mononuclear cells are the major source of ACE

activity in renal tissue after renal transplantation (12), and other potential sources of ACE mRNA, such as epithelial or endothelial cells, may also have a recipient origin (31–33). Thus, we may speculate that patients who have the ACE-DD genotype and already display CAN in the protocol biopsy may obtain the maximum benefit from RAS blockade.

In summary, we observed that the ACE-DD genotype in renal transplant recipients is not associated with an increased prevalence or incidence of CAN. However, the DD genotype in patients with CAN diagnosed by means of a protocol biopsy is associated with higher ACE mRNA levels and poorer graft survival.

Acknowledgments

This work was supported by FIS grants to M.H. (2000/0368) and E.N. (PI 020766) and La Marató TV3 grants to D.S. (001210) and E.N. (005310).

References

- Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, Fulladosa X, Torras J, Carrera M, Grinyó JM, Alsina J: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51: 310–316, 1997
- Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 55: 752–757, 1993
- Turner D, Grant S, Yonan N, Sheldon S, Dyer P, Sinnott P, Hutchinson I: Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 64: 776–779, 1997
- Awad M, El-Gamel A, Hasleton P, Turner D, Sinnott P, Hutchinson I: Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. *Transplantation* 66: 1014–1020, 1998
- Aros C, Remuzzi G: The renin-angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *J Hyperten* 20[Suppl 3]: S45–S53, 2002
- Taal MW, Brenner B: Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57: 1803–1817, 2000
- Navis G, de Jong PE, De Zeeuw D: I/D polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene: A clue to the heterogeneity of renal disease and in the renal response to therapy? *Nephrol Dial Transplant* 12: 1097–1100, 1997
- Jacobsen P, Tarnow L, Cartensen B, Hovind P, Poirer O, Parving H: Genetic variation in the renin-angiotensin system and progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 2843–2850, 2003
- Harden PN, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RS, Junor BJ, Briggs JD, Connell JM, Jardine AG: Polymorphisms in the angiotensin-converting enzyme and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345: 1540–1542, 1995
- Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holamans P, Coles GA, Williams JD: Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 52: 607–613, 1997
- Abdi R, Huong T, Zee R, Brenner B, Milford E: Angiotensin gene polymorphism as a determinant of posttransplantation renal dysfunction and hypertension. *Transplantation* 72: 726–729, 2001
- Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, Tegzess AM, Zeeuw D, De Jong P: Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: A role for Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) polymorphism? *J Am Soc Nephrol* 9: 2075–2081, 1998
- Barocci S, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Nocera A: Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients. *Transplantation* 67: 534–538, 1999
- Beige J, Scherer S, Weber A, Engeli S, Offermann G, Opelz G, Distler A, Sharma AM: Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 8: 1319–1323, 1997
- Beige J, Offermann G, Distler A, Sharma AM: Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype and long term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 13: 735–738, 1998
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman J: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326–2333, 2003
- Moreso F, Lopez M, Vallejos A, Giordani C, Riera L, Fulladosa X, Hueso M, Alsina J, Grinyó JM, Serón D: Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts. *Am J Transplant* 1: 82–88, 2000
- Serón D, Moreso F, Ramon JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castela AM, Alsina J, Grinyó JM: Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69: 1849–1855, 2000
- Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16: 31–41, 1976
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713–723, 1999
- Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343–1346, 1990
- Hueso M, Beltran V, Moreso F, Ciriero E, Fulladosa X, Grinyó JM, Serón D, Navarro E: Splicing alterations in human renal allografts: Detection of a new splice variant of protein kinase Par1/Emk1 whose expression is associated with an increase of inflammation in protocol biopsies of transplanted patients. *Biochim Biophys Acta* 1689: 58–65, 2004
- Von Schnakenburg C, Strehlau J, Ehrich J, Melk A: Quantitative gene expression of TGF- β 1, IL-10, TNF- α Fas ligand in renal cortex and medulla. *Nephrol Dial Transplant* 17: 573–579, 2002
- Melk A, Henne T, Kollmar T, Strehlau J, Latta K, Offner G, Jhangri G, Ehrich JHH, Von Schnakenburg C: Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. *Kidney Int* 64: 314–320, 2003

26. Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM: Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int* 61: 727–733, 2002
27. Schmidt S, Strojek K, Grzeszczak W, Bergis K, Ritz E, Diabetic Nephropathy Study Group: Excess of DD homozygotes in haemodialysed patients with type II diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 12: 427–429, 1997
28. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F: Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51: 197–205, 1992
29. Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Iwamoto M, Miyagi M, Sakai K, Aikawa A, Ohara T, Yamada K, Shimatake H, Hasegawa A: Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int* 60: 1124–1130, 2001
30. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhec-Gelas F: Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: Genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 290: 33–40, 1993
31. Lagaaij E, Cramer-Knijenburg G, Van Kemenade F, Van Es L, Brujin J, Van Krieken J: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357: 33–37, 2001
32. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA: Bone marrow contributes to renal turnover and regeneration. *J Pathol* 195: 229–235, 2001
33. Cornacchia F, Fornoni A, Plati AR, Thomas A, Wang Y, Inverardi L, Striker LJ, Striker GE: Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors. *J Clin Invest* 108: 1649–1656, 2001

**Access to UpToDate on-line is available for additional clinical information
at <http://www.jasn.org/>**

Splicing alterations in human renal allografts: detection of a new splice variant of protein kinase Par1/Emk1 whose expression is associated with an increase of inflammation in protocol biopsies of transplanted patients

Hueso M, Beltran V, Moreso F, Ciriero E, Fulladosa X, Grinyó JM, Serón D, Navarro E
Biochim. Biophys. Acta (Molecular Basis of Disease) 1689:58-65, 2004

Splicing alterations in human renal allografts: detection of a new splice variant of protein kinase Par1/Emk1 whose expression is associated with an increase of inflammation in protocol biopsies of transplanted patients

Miguel Hueso^{a,b}, Violeta Beltran^b, Francesc Moreso^a, Eva Ciriero^b, Xavier Fulladosa^a, Josep Maria Grinyó^a, Daniel Serón^a, Estanis Navarro^{b,*}

^aNephrology Department, Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^bCentre d'Oncologia Molecular, Institut de Recerca Oncològica (COM-IRO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona E08907, Spain

Received 29 August 2003; received in revised form 16 January 2004; accepted 27 January 2004

Available online 21 February 2004

Abstract

Protein kinase Emk1/Par1 (GenBank accession no. X97630) has been identified as a regulator of the immune system homeostasis. Since immunological factors are critical for the development of chronic allograft nephropathy (CAN), we reasoned that expression of Par1/Emk1 could be altered in kidney allografts undergoing CAN. In this paper, we have analysed the association among renal allograft lesions and expression of Par1/Emk1, studied by RT-PCR on total RNA from 51 protocol biopsies of transplanted kidneys, five normal kidneys, and five dysfunctional allografts. The most significant result obtained has been the detection of alterations in the normal pattern of alternative splicing of the Par1/Emk1 transcript, alterations that included loss of expression of constitutively expressed isoforms, and the inclusion of a cryptic exon to generate a new Emk1 isoform (Emk1C). Expression of Emk1C was associated with an increase in the extension of the interstitial infiltrate (0.88 ± 0.33 in Emk1C⁺ vs. 0.41 ± 0.50 in Emk1C⁻; $P < 0.011$), and with a trend to display higher interstitial scarring (0.66 ± 0.70 vs. 0.29 ± 0.52 ; $P = 0.09$) in protocol biopsies when evaluated according to the Banff schema. Moreover, a higher mean arterial pressure (MAP) was also observed (110 ± 11 vs. 99 ± 11 mm Hg; $P = 0.012$). From these results we propose that Par1/Emk1 could have a role in the development of CAN in kidney allografts.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Kidney allograft; Banff 97 schema; Protocol biopsy; Chronic allograft nephropathy (CAN); ser/thr protein kinase Par1/Emk1; Splicing alteration; Cryptic exon

1. Introduction

Chronic allograft nephropathy (CAN) is the main cause for late graft loss, and although its ethiopathogenics is not yet well understood, immunological factors seem to play a critical role in its development [1]. Early diagnosis of CAN is important to establish therapeutic strategies that improve allograft survival [2]. In this sense, protocol biopsies of renal allografts are currently being used as early warning tools to detect the first signs of allograft dysfunction [3], although further improvements are needed to assess early protocol allograft biopsies, and to increase their clinical utility. Cur-

rently, new techniques of molecular biology are being applied to the study of protocol biopsies with the aim to detect and characterize genes that could be useful either to understand the molecular mechanisms responsible for renal diseases, or to identify new surrogate markers that might precede histological lesions, and hence that could be used in diagnostic procedures [4,5]. In this sense, high-density DNA arrays facilitate the simultaneous expression analysis of many different genes, whose involvement in the development of renal pathologies can be further studied using the new tools of functional genomics and knock-out mice model [6].

Ser/thr protein kinase Emk1/Par1 (GenBank accession no. X97630) has been identified as a key regulator of immune system homeostasis, specially of T and B cell function [7]. In a recent paper, Emk1^{-/-} null mutant mice were shown to display a complex phenotype with two

* Corresponding author. Tel.: +34-932-607-424; fax: +34-932-607-426.

E-mail address: enavarro@iro.es (E. Navarro).

prominent traits: immune dysfunctions and renal alterations. T lymphocytes from $Emk1^{-/-}$ mice showed a deregulated surface expression of CD44 and CD62L, as well as an overproduction of IFN- γ , while kidneys from $Emk1^{-/-}$ mice showed a lymphocyte infiltrate that could be the consequence of an autoimmune reaction or of defects in homing and cell adhesion of kidney cells or lymphocytes [7].

We recently cloned the human form of *Emk1* and described the presence of *Emk1* isoforms that differed in their 5' end (*Emk1A* and *Emk1B*), and in the use of alternative exon 16, whose regulated splicing originated other two *Emk1* isoforms, *Emk1D* and *Emk1E* [8,9]. Given that $Emk1^{-/-}$ null mutant mice displayed gross phenotypic abnormalities in kidneys and lymphocytes, and that no data are currently available on the alterations of *Emk1* expression in transplanted organs, we have studied the pattern of *Emk1* expression in renal protocol biopsies of transplanted patients with stable function. Our aim was to detect alterations that could be associated with the early development of renal lesions.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Our group has been performing protocol renal biopsies in stable grafts during the first year of follow-up, with the aim to characterize early renal damage and the molecular mechanisms involved in its development [3,10]. In the present study, we analysed data from a cohort of protocol biopsies and from five diagnostic biopsies, from which total RNA was available. Normal control tissues were obtained from five patients undergoing nephrectomy because of renal tumours. These studies were approved by the Hospital Ethics Committee, and written informed consent from the patients were obtained in all the cases.

2.2. Definition of clinical variables

The following variables were evaluated for each patient: age and sex of recipient, age of donor, degree of HLA matching (total number of mismatches in the A, B and DR loci), presence of panel-reactive antibodies over 20%, cold ischemia time (CIT), and immunosuppressive treatment used. After transplantation, the following variables were also assessed: acute tubular necrosis, acute rejection, serum creatinine, proteinuria, mean arterial pressure (MAP), number of antihypertensive drugs at the time of biopsy, evolution of serum creatinine and proteinuria during follow-up, and mean CsA dose and CsA levels until renal biopsy.

Post-transplant acute tubular necrosis was defined as the need for haemodialysis during the first week after surgery, once an alternative diagnosis was ruled out (e.g., hyper

acute or accelerated rejection). Acute rejection was defined as an acute rise in serum creatinine that was subsequently treated. Immunosuppressive regimens employed were the following: (a) CsA in monotherapy ($n=2$); (b) triple standard regimen with CsA, azathioprine and PDN ($n=13$); (c) concomitant induction therapy with antilymphocytic antibodies, CsA and PDN ($n=21$); (d) triple regimen with CsA, mycophenolate mofetil (MMF) and PDN ($n=13$); (e) concomitant induction therapy with antilymphocytic antibodies, MMF and PDN without CsA ($n=2$). Modifications of CsA doses were performed considering the whole blood CsA trough levels measured by radio immunoassay with an anti-CsA monoclonal antibody (CYCLO-Trac-SP, Incstar, Stillwater, MN). Mean CsA dose and levels received were calculated from CsA dose and measured levels at days 7, 14, 30, 60, 90, and the day of the biopsy.

2.3. Histological study of biopsies

Renal biopsies, either protocol or diagnostic, were performed with a spring-loaded, 16-gauge, gun (Pro-Mag 2.2; Manan Medical Products, Northbrook, IL) with ultrasound guidance. Additionally, we obtained control biopsies from histologically normal, nephrectomized tissues before vascular clamping. For all the biopsies, two cores of tissue were obtained, one of them was processed for conventional histological staining as previously described [3], while the second one was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction. Renal acute and chronic lesions were scored according to the 1997 Banff working classification criteria [11]. For immunohistochemical studies, paraffin-embedded specimens from available samples were sliced at $4\ \mu\text{m}$, incubated with mouse monoclonal antibodies against human CD3 (clone PS1; Novocastra, Newcastle, UK), CD20 (clone L26; Master Diagnóstica SL, Granada, Spain), and CD68 (clone KP1; Master Diagnóstica), and subsequently stained with a goat-antimouse secondary antibody labelled with horseradish peroxidase (Envision System[®], Dako) in an automated immunohistochemical stainer (Lab Vision, Fremont, CA, USA). Positively stained cells were counted at $400\times$, and the results were expressed as the percentage of each population regarding the total number of interstitial infiltrating cells.

2.4. RNA extraction and reverse transcription (RT)

Total RNA was isolated from frozen cores with the "Rneasy" kit (Qiagen, Chatsworth, CA) after homogenizing and sieving in Qiasredder columns (Qiagen). Reverse transcription was done as previously described [12], using random hexamers and Superscript[®] reverse-transcriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Germany), on samples treated with RNase-free DNase I (Roche Diagnostics, Schweiz Rotkreutz, Switzerland).

2.5. PCR amplification of *Emk1* isoforms

For the specific amplification of isoforms *Emk1A* and *Emk1B* we used a nested PCR approach with the following primers:

Emk1Aup (5'TACCGGCGCCATGTCCAG),
Emk1Aup/nested
 (5'GTTGGACTTACTGCTGGGCTTGG),
Emk1Bup (5'TCTCTCTGCTAGTGGTGGTTTCGG),
Emk1Bup/nested (5'CGACACCGTCCAGGTTCCC),
Emk1ABdown (5'GCTGAGTTGCGGCCCCGAATC),
Emk1ABdown/nested (GTTGGACTTACTGCTGGG-
 CTTGG).

First PCR was performed using approx. 0.5 µg of cDNA, and 0.2 µM of each primer in the following conditions: 2 min at 94 °C, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, 90 s at 72 °C, and finally 10 min at 72 °C, using Taq polymerase (Master Mix, PROMEGA Corp., Madison, WI, USA). For the nested PCR, 1–5 µl of the first reaction were amplified using the above “nested” primers at the same conditions as first PCR, except that only 20 cycles were performed.

For the specific amplification of exon 16, we used the following primers:

Emk1/exon15 (5'CCCCTCCACGAACAGCGTCC),
Emk1/exon17 (5'AAGTTAGTTCGGTCTGGGGCTC).

Amplification was performed in the conditions described above for the *Emk1A/B* first PCR. Over 10 µl of PCR products were resolved in agarose gels and ethidium bromide stained.

2.6. Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was applied to analyse the normal distribution of variables. Student's *t*-test was used in normal variables, and Mann–Whitney *U*-test was applied to those not following a normal distribution and to ordinal variables. Differences between categorical data were assessed using a 2 × 2 contingency table analysis and the Fisher's exact tests. Results are expressed as mean ± standard deviation. All *P* values were two-tailed, and a *P* value <0.05 was considered significant.

3. Results

We analysed *Par1/Emk1* expression on 51 kidney protocol biopsies from 51 recipients at 234 ± 148 days after transplantation. According to the gender, the population studied was composed by 34 males and 17 females, with a mean age of 44 ± 15 years. Sample size distribution of the 51 biopsies, according to 1997 Banff criteria, was as

follows: 29 (56.9%) biopsies were adequate (≥ 10 glomeruli, ≥ 2 arteries), 12 (23.5%) biopsies represented a minimum sample adequacy (between seven and nine glomeruli, and at least one arterial section), and 10 biopsies (19.6%) were inadequate (between one and six glomeruli, and at least one arterial section). Mean number of glomeruli in the biopsy cores processed for optical microscopy was 11 ± 8, and all biopsies contained at least one arterial section. Histological diagnoses, categorized according to the Banff 97 schema, were the following: normal (*n*=24), borderline changes (*n*=9), and CAN (*n*=18). CAN was mild (grade I) in 14 cases, moderate (grade II) in four cases, and was associated with borderline changes in nine cases. In addition, five diagnostic biopsies were also analysed. Three of them were obtained from patients with mild acute rejection, and the other two from patients with mild chronic rejection.

3.1. Alternative splicing of the *Emk1/Par1* transcript generates *Emk1/Par1* isoforms

We recently cloned the human form of ser/thr protein kinase *Emk1/Par1* [8]. RT-PCR analysis of *Emk1/Par1* expression in a number of tissues showed the presence of different isoforms originated by the usage of two putative promoters and of an alternative exon (exon 16, see Fig. 1A) [9]. Differential usage of the two promoters resulted in the expression of two isoforms, *Emk1A* and *Emk1B*, that differed only in their first exons at the 5' end (Fig. 1B). Furthermore, regulated splicing of exon 16 originated other two isoforms, one that included exon 16 (isoform *Emk1D*), and another one lacking it (isoform *Emk1E*), that could be detected as two bands (350 and 190 bp) when amplified with flanking primers [9] (Fig. 1B). Expression analysis in different tissues and cell lines, among them five samples from nephrectomized kidneys, showed that all these isoforms were constitutively expressed, at similar steady-state levels, in all samples tested. Representative samples of these normal patterns of expression can be seen in Fig. 1: *Emk1B* give a single band over 290 bp (see samples RP, BH, GP, SA in Fig. 1C), and *Emk1D* and *Emk1E* a doublet of 190 and 350 bp, respectively (samples PM, MM, OC in Fig. 1D). No data is shown for *Emk1A* since no alterations in its expression were found, and therefore it is not reported in this work.

3.2. Alterations in the normal patterns of alternative splicing of the *Par1/Emk1* transcript in protocol biopsies of renal allografts

We analysed the expression of the different *Emk1* isoforms in the 51 patients enrolled in the study. When analysing expression of exon 16, we found 43 samples (84.4%) that co-expressed isoforms *Emk1D* and *Emk1E*, i.e., which showed the pattern of expression previously defined as normal. To confirm the nature of these bands,

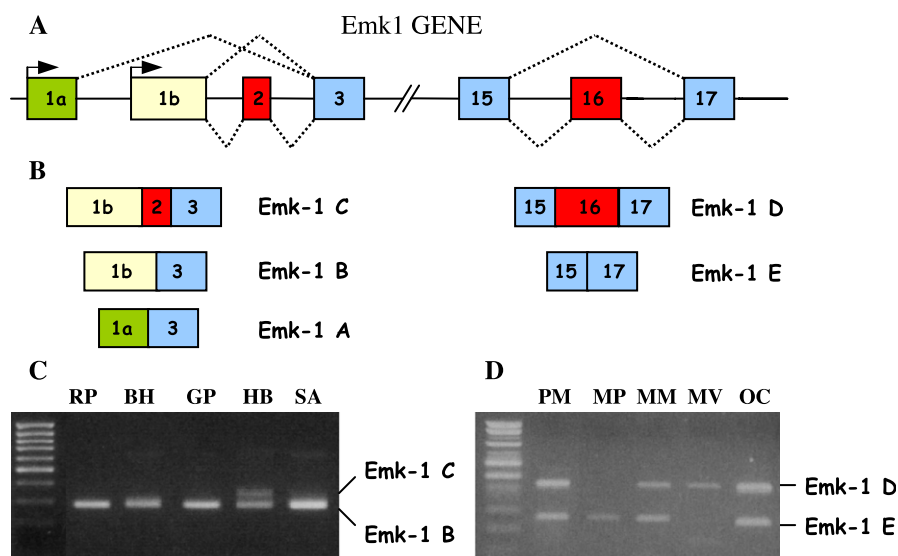


Fig. 1. Splicing alterations of the *Emk1/Par1* gene in human renal allografts. (A) Structure of the *Emk1* gene and of its alternative splicing products. Boxes show the different exons studied in this work. Solid lines represent introns, and dotted lines correspond to the splicing events detected in the *Emk1* gene (exons and introns are not drawn to scale). Exons are numbered as in the text. Arrows show the two predicted transcription origins and promoters. (B) Diagram of the *Emk1* isoforms studied in this work. Shown are the isoforms generated by splicing of alternative exons 2 and 16 (in red), and those generated by the use of the *Emk1A* and *Emk1B* promoters (yellow and green). The length of the different exons is not drawn to scale. *Emk1C* shows the exon structure of the new *Emk1* isoform detected in this study. (C) RT-PCR analysis of alternative splicing events of the *Emk1* gene detected in representative allograft samples. Shown are the bands encoding isoforms *Emk1C*, and *Emk1B*. Amplification of *Emk1A* is not shown since expression of this isoform was found to be constitutive, and no expression changes were detected in the population studied. (D) RT-PCR analysis of alternative splicing events of the *Emk1* gene detected in representative allograft samples. Shown are the bands encoding isoforms *Emk1D* and *Emk1E*. Samples *MP* and *MV* show the alterations in the splicing patterns characterized by the lack of isoforms *Emk1D* and *Emk1E*, respectively.

these were purified, cloned and sequenced from a few random samples, and the sequences were shown to actually correspond to the *Emk1D* and *Emk1E*. Strikingly, eight other cases displayed alterations in the pattern of *Emk1D/E* splicing that resulted in the complete lack of expression of a single specific isoform. In this sense, *Emk1D* was not detected in four samples, while *Emk1E* was lacking in another four (see Fig. 1D for representative cases *MP* and *MV*). No sample lacking both isoforms was detected among our patients. When we analysed the diagnostic biopsies, the same alterations were detected, with *Emk1E* lacking in one of the two patients with chronic rejection and in one of the three suffering acute rejection.

Expression of isoforms *Emk1A* and *Emk1B* was analysed by a nested PCR approach in two reactions. We used two pairs of isoform-specific upstream primers and a unique, common, pair of downstream primers in the following combinations; for *Emk1A*: *Emk1Aup*, *Emk1ABdown*; and *Emk1Aup/nested*, *Emk1ABdown/nested* for the nested amplification; for *Emk1B*: *Emk1Bup*, *Emk1ABdown*; and *Emk1Bup/nested*, *Emk1ABdown/nested* for the nested amplification (see Materials and methods). While *Emk1A* was detected in all (51/51) the samples tested, *Emk1B* was found only in 44 out of the 51 samples. Nevertheless, we did not observe any histological lesion significantly associated with the loss of *Emk1B* expression, likely because the number of biopsies affected was too small (7/51).

3.3. A new, cryptic, exon is detected in *Emk1/Par1* transcripts from protocol renal allograft biopsies

The most significant result obtained in this work was the detection of a band of lower mobility than *Emk1B* in 10 out of the 51 samples tested (see the upper band in sample *HB* in Fig. 1C). Since this band (herein called *Emk1C*) had not been previously detected, we cloned it and sequenced it. The sequence of *Emk1C* was then compared with the draft of the human genome where it was shown to correspond to the known *Emk1B* plus an extra exon (herein called exon 2) inserted at the precise boundaries of exons 1B and 3 (see Fig. 1B), and showing canonical splice sites (data not shown). Furthermore, when the sequence of exon 2 was used to search the EST database at the GenBank no significant hits were detected, so confirming that this sequence actually corresponded to a cryptic exon not usually expressed, as expected from our inability to detect it in cell lines and tissues from different origins (data not shown). Splicing of this cryptic exon originated two isoforms: one without exon 2 (the already known *Emk1B*) and a new one that included exon 2 and was called *Emk1C* (see Fig. 1A, B). After testing the 51 samples, we found that 10 allografts co-expressed isoforms, B and C, other 34 allografts expressed only isoform B, and in seven cases neither isoforms were expressed and only *Emk1A* was detected. Regarding biopsies performed for graft dysfunction, we observed *Emk1C*^[+] expression in one of the samples with

acute rejection that also co-expressed Emk1D and Emk1E (not shown).

3.4. Protocol biopsies of Emk1C^[+] patients show a higher extension of interstitial mononuclear cell infiltration

Co-expression of splicing isoforms D and E was the most commonly found pattern, both in allografts (84.4%) and in normal kidneys (100%), without any significant difference in their prevalence rates. Consequently, there were very few samples not co-expressing both forms: four (7.8%) that displayed only isoform E (i.e. Emk1D was not detected), and four others (7.8%) that were homozygous for Emk1D and did not express Emk1E. We did not observe any histological lesion significantly associated with the changes in the splicing pattern of exon 16, likely because the number of biopsies expressing a unique isoform was too small, although we detected a tendency to a greater progress of renal lesions among allografts from Emk1D^[−]E^[+], to Emk1D^[+]E^[−] (Table 1).

We then analysed splicing of cryptic exon 2 (Emk1C) in the homogeneous group of 43 biopsies that co-expressed isoforms Emk1D and Emk1E (expression of cryptic exon 2 was detected in only one Emk1D^[−] patient, but in none of the Emk1E^[−] patients). Depending on the presence or absence of cryptic exon 2, these patients were grouped in other two categories: Emk1C^[+] (9 patients) and Emk1C^[−] (34 patients). When we analysed the type of lesions present in the biopsies from the Emk1C^[+] and Emk1C^[−] subgroups, we observed that extension of mononuclear cell interstitial infiltration was higher in Emk1C^[+] than Emk1C^[−] patients (Table 2). Moreover, the degree of inflammation seemed to be also more severe in Emk1C^[+] allografts, because there was a trend to display more infiltrating mononuclear cells in the tubular epithelium. Furthermore, after studying the 51

Table 1

Severity of acute and chronic lesions (defined according to the Banff 97 schema) associated with the presence or absence of exon 16 in Emk1 isoforms in renal allograft protocol biopsies

Lesion type	Emk1D ^[+] E ^[+]	Emk1D ^[−] E ^[+]	Emk1D ^[+] E ^[−]	<i>P</i>
<i>N</i>	43	4	4	
g	0.14 ± 0.41	0.25 ± 0.50	0	ns
i	0.51 ± 0.51	0.50 ± 0.58	1.00 ± 0.00	ns
t	0.35 ± 0.48	0.25 ± 0.50	0.75 ± 0.50	ns
v	0	0	0	ns
ah	0.26 ± 0.49	0	0	ns
cg	0.26 ± 0.44	0	0	ns
ci	0.37 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.75 ± 0.96	ns
ct	0.35 ± 0.53	0.25 ± 0.50	0.75 ± 0.96	ns
cv	0.14 ± 0.47	0	0	ns

Emk1 isoforms are defined as follows (see also Fig. 1B): Emk1D^[+], presence of isoform with exon 16; Emk1D^[−], absence of isoform with exon 16; Emk1E^[+], presence of Emk1 isoform not having exon 16; Emk1E^[−], absence of Emk1 isoform not having exon 16.

Abbreviations are: g, glomerulitis; i, interstitial infiltrate; t, tubulitis; v, vasculitis; ah, arteriolar hyalinosis; cg, chronic glomerular lesion; ci, chronic interstitium lesion; ct, chronic tubuli lesion; cv, chronic vascular lesion.

Table 2

Severity of acute and chronic lesions, according to the Banff 97 schema, associated to the “de novo” presence of exon 2 in Emk1 (isoform Emk1C^[+]) in renal allograft protocol biopsies

Lesion type	Emk1C ^[+]	Emk1C ^[−]	<i>P</i>
<i>N</i>	9	34	
g	0.22 ± 0.44	0.11 ± 0.40	ns
i	0.88 ± 0.33	0.41 ± 0.50	0.01
t	0.55 ± 0.52	0.29 ± 0.46	0.14
v	0	0	ns
ah	0.22 ± 0.44	0.26 ± 0.51	ns
cg	0.33 ± 0.50	0.23 ± 0.43	ns
ci	0.66 ± 0.70	0.29 ± 0.52	0.09
ct	0.55 ± 0.72	0.29 ± 0.46	ns
cv	0.11 ± 0.33	0.14 ± 0.50	ns

Emk1 isoforms are defined as follows (see also Fig. 1B): Emk1C^[+], presence of isoform with exon 2; Emk1C^[−], absence of isoform with exon 2.

protocol biopsies, we observed that those with borderline inflammation also presented a more severe interstitial fibrosis (0.57 ± 0.69 in 28 allograft biopsies with inflammation vs. 0.17 ± 0.38 in 23 allografts without inflammation, *P*=0.022), and a more severe tubular atrophy (0.53 ± 0.63 in 28 allograft biopsies with inflammation vs. 0.17 ± 0.38 in 23 allografts without inflammation, *P*=0.025). In addition, we noticed an increase in interstitial scarring in Emk1C^[+] patients, although this finding did not reach statistical significance (Table 2).

Considering the diagnostic categories defined by the Banff schema, we examined the prevalence of Emk1C^[+] among patients with borderline inflammation with fibrosis (three out of nine), without fibrosis (two out of nine), and with fibrosis without inflammation (two out of nine). Although the proportion of Emk1C^[+] was higher in patients with borderline inflammation with fibrosis than in the other groups (33% vs. 22%) or than in normal allografts (12.5%), this result did not reach statistical significance due to the small number of Emk1C^[+] patients.

We studied the phenotypes of graft-infiltrating cells in biopsies of Emk1C^[+] and Emk1C^[−] patients available for immunohistochemical analysis (*n*=7 and *n*=31, respectively). After staining for CD3 (T lymphocytes), CD20 (B lymphocytes) and CD68 (monocytes and macrophages), we observed that the two groups of biopsies displayed similar proportions of the three cell lineages: 50 ± 10% of CD3+ cells, 20 ± 6% of CD20+ cells, and 30 ± 10% of CD68+ cells in the group of Emk1C^[+] patients vs. 49 ± 11% of CD3+ cells, 21 ± 14% of CD20+ cells and 30 ± 12% of CD68+ cells in the group of Emk1C^[−] patients.

3.5. Clinical variables in Emk1C^[+] patients

Demographic characteristics of patients are summarised in Table 3. At the time of the protocol biopsy, Emk1C^[+] patients displayed a higher MAP (110 ± 11 vs. 99 ± 11 mm Hg, *P*=0.012), and presented a trend towards the use of

Table 3

Clinical characteristics of Emk1D^[+]/E^[+] allografts at baseline, grouped according to the expression/lack of expression of exon 2 (Emk1C^[+] vs. Emk1C^[-]) in renal allograft protocol biopsies

	Emk1C ^[+]	Emk1C ^[-]	<i>P</i>
<i>N</i>	9	34	
Donor age (years)	36 ± 17	44 ± 15	ns
Recipient age (years)	48 ± 10	50 ± 10	ns
Recipient sex (male/female)	7/2	23/11	ns
Number of transplant (1st, 2 d)	8/1	26/8	ns
PRA>20%	2 (22%)	8 (23%)	ns
HLA mismatches	3.11 ± 1.61	2.88 ± 1.17	ns
CIT (hours)	22 ± 4	22 ± 5	ns
ATN (no/yes)	9/0	29/5	ns
Acute rejection (no/yes)	6/3	29/5	ns
Mean CsA dose (mg/kg/d)	5.44 ± 1.51	5.78 ± 1.46	ns
Mean CsA levels (ng/ml)	204 ± 67	225 ± 57	ns
MMF (no/yes)	7/2	25/7	ns

Emk1 isoforms are defined as follows (see also Fig. 1B): Emk1C^[+], presence of the Emk1 isoform that express exon 2; Emk1C^[-], absence of Emk1 isoform with exon 2.

Abbreviations are: CIT, cold ischemia time; PRA, panel reactive antibodies; ATN, acute tubular necrosis; CsA, cyclosporine; MMF, mycophenolate mofetil treatment.

more antihypertensive drugs (1.11 ± 0.92 vs. 0.58 ± 0.70 mean number of antihypertensive drugs per day; $P=0.09$). There were no differences among serum creatinine levels (155 ± 60 $\mu\text{mol/l}$ in Emk1C^[+] patients vs. 144 ± 40 $\mu\text{mol/l}$ in Emk1C^[-] patients, $P=ns$), or proteinuria (0.39 ± 0.29 g/day in Emk1C^[+] patients vs. 0.27 ± 0.20 g/day in Emk1C^[-] patients, $P=ns$). Regarding to immunosuppression, the different groups of treatment were homogeneous, and there were not significant differences among them.

Graft function was followed for 55 ± 23 months. In this time period, four patients lost their grafts, one due to a “de novo” glomerulonephritis in the Emk1C^[-] group 24 months after transplantation, and three other patients died with a functioning graft, one in the Emk1C^[-] group and two in the Emk1C^[+] group. Death of the Emk1C^[-] patient was due to a carcinoma of the lung over 47 months after renal transplantation. The two Emk1C^[+] patients died of acute myocardial infarction, and of multiple myeloma, 27.7 and 31.2 months after transplantation, respectively.

4. Discussion

Ser/thr protein kinase Emk1/Par1 has been identified as a key regulator of immune system homeostasis [7]. In this paper, we report the detection of alterations in the splicing pattern of the Emk1/Par1 gene in early protocol biopsies of kidney allografts. Furthermore, we also demonstrate the association among one of these splicing alterations, the expression of a cryptic exon that originates Emk1C, a new Par1/Emk1 isoform not previously described, with an increase in the extension of interstitial infiltrates. These Emk1C^[+] patients also displayed a trend towards a more severe interstitial fibrosis, already detected in early protocol

biopsies, and a higher MAP. These data extend the span of expression alterations detected in deteriorating kidney allografts to the control of alternative splicing, and suggest a new molecular mechanism that might be involved in CAN pathogenics.

It has been suggested that silent graft inflammation has a role in CAN development [1,13], in part due to the observation that interstitial mononuclear cell infiltrates in protocol biopsies from well-functioning grafts correlated with graft dysfunction [14,15], and with a worsening of the CAN grade in sequential protocol biopsies [16]. In this sense, Lipman et al. [4] described a progressive increase in the expression of immune activation genes proportional to the severity of inflammatory lesions in protocol biopsies. Furthermore, these authors demonstrated the existence of a threshold for the expression of immune-activation genes, particularly of cytotoxic T lymphocyte effectors, among acute sub-clinical and acute clinical rejection, and suggested that even inflammatory borderline changes could play a role in graft degeneration [4]. This hypothesis has been further supported by Kirk et al. [17], who established the association among graft expression of pro-inflammatory cytokines, and of other gene products related to T lymphocyte antigen recognition, with a worsening of allograft function in clinically stable biopsies. Moreover, Rush et al. [2] showed that early treatment of sub-clinical rejection, diagnosed by means of protocol biopsies, resulted in a better outcome of the graft, with less scarring lesions.

Data from the Emk1^{-/-} knock-out mice indicated that protein kinase Emk1 was required to keep CD4+ T cells in a “naïve” state, and that loss of Emk1 resulted in their inappropriate homing and activation in response to self or environmental antigens [7]. In this sense, CD4+ T cells from Emk1^{-/-} mice showed a deregulated surface expression of CD44 and CD62L, while Th1 cells produced threefold more IFN- γ than their wild-type littermates upon activation through the TCR, indicating that these cells were more easily and potently activated by antigens [7]. These functional alterations resulted in the lymphocyte infiltration of kidneys of Emk1^{-/-} mice, among other organs, probably due to the loss of their cell “homing” potential. In addition, it was also observed that heterozygous Emk1^{+/-} mice displayed alterations of the immune system, although less severe, suggesting that even partial Emk1 deficits could alter immune homeostasis.

The major alterations in gene expression found in this work have been the detection of a splicing shift that resulted in the unbalanced expression of isoforms Emk1D and Emk1E, as well as the finding of a cryptic exon whose presence in the Emk1 transcript was significantly associated with an increase in the extension of the interstitial infiltrate of mononuclear cells in early and clinically stable renal allograft biopsies. Although we are aware that expression of the splicing isoform Emk1C could be a consequence of the increase in the number of mononuclear cells in the renal allografts, thus allowing the detection of transcripts usually

expressed at very low levels, we think that it could actually be due to a de-regulation of the splicing machinery. We favour this last hypothesis since levels of Emk1A and Emk1B were not raised in the samples expressing Emk1C (see Fig. 1C) as would be expected if the effect was uniquely due to the number of infiltrating cells; Emk1C was not detected in all samples with interstitial infiltration; we also detected an aberrant splicing of Emk1D/Emk1E in 8/51 biopsies; and, finally, because the sequence of exon 2 is not present in any of the databases of expressed gene products, either ESTs or full-length transcripts, further suggesting that it is actually a cryptic exon usually not expressed.

We have also characterized the phenotype of graft-infiltrating cells, but did not observe a cell type predominant in the infiltrates of the patients positive for the splice variant Emk1C, a fact in agreement with data derived from the mouse knock-out model. In Emk^{-/-} mice, lymphocyte infiltrates consisted of a mixture of cell types accumulated in the perivascular regions of the cortex and medulla of the kidney, suggesting that changes in Emk levels (or in the ratio of isoform expression) would cause a general, not lineage restricted, defect in mononuclear cell adhesion and/or homing [7]. Alternatively, these alterations could also be due to changes in the repertoire of surface molecules in the cells of kidneys. In this sense, Emk has been shown to regulate cell-to-cell adhesion by controlling, at least, the sorting of E-cadherin to the basolateral surface of epithelial kidney cells [18].

Changes in alternative splicing can be caused by mutations in the cis-acting signals that control the correct elimination of introns, in which case only the mutated gene would be affected, or, alternatively, they can be originated by an unbalance in the activity of the splicing trans-acting factors that regulate the process (see Refs. [19,20] for reviews). Should this last be the case, one would expect this would have a pleiotropic effect on other many genes that depended on the balance of activities of splicing factors to accurately process mRNA. This is an interesting point, since methods for expression analysis (as DNA arrays) are suited to detect quantitative variations, but tend to overlook qualitative alterations as those affecting splicing.

We propose that changes in the expression pattern of the Emk1 isoforms, as the “de novo” expression of Emk1C here described, would generate protein variants that altered lymphocyte properties as homing and/or activation. This would eventually result in the infiltration of kidneys with a population of activation-prone, longer resident lymphocytes, with the subsequent disturbance of the immunological homeostasis, the induction of inflammatory events in kidney allografts, and the development of CAN.

In summary, we have detected splicing alterations of the Emk1 transcript in protocol biopsies of kidney allografts. One of these alterations generated a new Emk1 isoform (Emk1C), whose expression was associated with a higher degree of lymphocyte infiltration, with a trend to display a

more severe interstitial fibrosis, as detected in early protocol biopsies, and with a higher MAP, findings all of them related to the development of CAN.

Acknowledgements

This work was supported by Marató de TV3 grants to Estanis Navarro (005310) and Daniel Serón (001210), and FIS grants to Miguel Hueso (2000/0368) and Estanis Navarro (PI 020766). Authors acknowledge Dr. R.G. del Moral and Dr. F. O’Valle (Dept. Pathology, School Medicine, Univ. of Granada) for performing immunohistochemical work.

References

- [1] S. Hariharan, Long-term kidney transplant survival, *Am. J. Kidney Dis.* 38 (2001) S44–S50.
- [2] D. Rush, P. Nickerson, J. Gough, R. McKenna, P. Grimm, M. Cheang, K. Trpkov, K. Solez, J. Jeffery, Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (1998) 2129–2134.
- [3] D. Seron, F. Moreso, J. Bover, E. Condom, S. Gil-Vernet, C. Canas, X. Fulladosa, J. Torras, M. Carrera, J.M. Grinyo, J. Alsina, Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome, *Kidney Int.* 51 (1997) 310–316.
- [4] M.L. Lipman, Y. Shen, J.R. Jeffery, J. Gough, R.M. McKenna, P.C. Grimm, D.N. Rush, Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection, *Transplantation* 66 (1998) 1673–1681.
- [5] K. Baboolal, G.A. Jones, A. Janezic, D.R. Griffiths, W.A. Jurewicz, Molecular and structural consequences of early renal allograft injury, *Kidney Int.* 61 (2002) 686–696.
- [6] M. Kretzler, C.D. Cohen, P. Doran, A. Henger, S. Madden, E.F. Grone, P.J. Nelson, D. Schlondorff, H.J. Grone, Repuncturing the renal biopsy: strategies for molecular diagnosis in nephrology, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 1961–1972.
- [7] J.B. Hurov, T.S. Stappenbeck, C.M. Zmasek, L.S. White, S.H. Ranganath, J.H. Russell, A.C. Chan, K.M. Murphy, H. Piwnicka-Worms, Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 3206–3219.
- [8] E. Navarro, L. Espinosa, T. Adell, M. Tora, G. Berrozpe, F.X. Real, Expressed sequence tag (EST) phenotyping of HT-29 cells: cloning of ser/thr protein kinase EMK1, kinesin KIF3B, and of transcripts that include Alu repeated elements, *Biochim. Biophys. Acta* 1450 (1999) 254–264.
- [9] L. Espinosa, E. Navarro, Human serine/threonine protein kinase EMK1: genomic structure and cDNA cloning of isoforms produced by alternative splicing, *Cytogenet. Cell Genet.* 81 (1998) 278–282.
- [10] D. Seron, F. Moreso, X. Fulladosa, M. Hueso, M. Carrera, J.M. Grinyo, Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies, *Kidney Int.* 61 (2002) 727–733.
- [11] L.C. Racusen, K. Solez, R.B. Colvin, S.M. Bonsib, M.C. Castro, T. Cavallo, B.P. Croker, A.J. Demetris, C.B. Drachenberg, A.B. Fogo, P. Furness, L.W. Gaber, I.W. Gibson, D. Glotz, J.C. Goldberg, J. Grande, P.F. Halloran, H.E. Hansen, B. Hartley, P.J. Hayry, C.M. Hill, E.O. Hoffman, L.G. Hunsicker, A.S. Lindblad, Y. Yamaguchi, et al., The Banff 97 working classification of renal allograft pathology, *Kidney Int.* 55 (1999) 713–723.
- [12] I. Herrero, J. Torras, M. Riera, E. Condom, O. Coll, J.M. Cruzado, M. Hueso, J. Bover, N. Lloberas, J. Alsina, J.M. Grinyo, Prevention of

- cold ischaemia-reperfusion injury by an endothelin receptor antagonist in experimental renal transplantation, *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 (1999) 872–880.
- [13] M. Golbabaie, M. Kayedi, I. Najafi, M.R. Ganji, G.H. Naderi, D. Mehraban, M. Hakemi, Chronic renal allograft dysfunction: immunologic and nonimmunologic risk factors, *Transplant. Proc.* 33 (2001) 2691–2692.
- [14] D.N. Rush, J.R. Jeffery, J. Gough, Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema, *Transplantation* 59 (1995) 511–514.
- [15] P. Nickerson, J. Jeffery, J. Gough, R. McKenna, P. Grimm, M. Cheang, D. Rush, Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (1998) 482–487.
- [16] B.J. Nankivell, R.J. Borrows, C.L.S. Fung, P.J. O'Connell, R.D.M. Allen, J. Chapman, The natural history of chronic allograft nephropathy, *New Engl. J. Med.* 349 (2003) 2326–2333.
- [17] A.D. Kirk, L.M. Jacobson, D.M. Heisey, N.F. Radke, J.D. Pirsch, H.W. Sollinger, Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function, *Transplantation* 68 (1999) 1578–1582.
- [18] H. Bohm, V. Brinkmann, M. Drab, A. Henske, T.V. Kurzchalia, Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity, *Curr. Biol.* 7 (1997) 603–606.
- [19] J.F. Caceres, A.R. Kornblihtt, Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease, *Trends Genet.* 18 (2002) 186–193.
- [20] C.W. Smith, J. Valcarcel, Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 381–388.

V RESULTADOS

1. LAS BIOPSIAS DE PROTOCOLO PERMITEN REDUCIR EL TAMAÑO MUESTRAL DE LA POBLACIÓN EN LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

Los objetivos de los trabajos realizados con las biopsias de protocolo fueron identificar factores de riesgo clínicos asociados a la aparición o progresión de la NCT, evaluar la utilidad de las biopsias de protocolo para reducir el tamaño de la muestra de pacientes requerida en estudios de prevención de la NCT, y por último analizar la reproducibilidad del diagnóstico de NCT en biopsias secuenciales.

1.1 Análisis de las biopsias de protocolo utilizando los criterios de Banff.

En un primer estudio se incluyeron 282 biopsias realizadas a los 3 meses postransplante en 280 pacientes que presentaban en el momento de la biopsia una creatinina plasmática $< 300 \mu\text{mol/L}$, proteinuria $< 1\text{g/día}$, y función renal estable. De acuerdo con los criterios de Banff de 1993 se consideraron adecuadas 221 biopsias (78%) y marginales 61 biopsias. Los diagnósticos histológicos fueron los siguientes: a) normal (n=122), b) lesiones inflamatorias mínimas o “borderline” (n=48), c) rechazo agudo subclínico (n=4), d) NCT (n=62), e) NCT asociada con lesiones “borderline” (n=38), f) NCT asociada con rechazo agudo subclínico (n=8). Además, en 21 casos se detectó vasculopatía del injerto asociada a NCT, estando 8 casos asociadas a lesiones “borderline” y 3 casos asociadas con signos de rechazo agudo subclínico. Finalmente se disponía de la histología del donante en 51 casos.

Se observó que los injertos con NCT y vasculopatía del injerto (n=21) presentaban una supervivencia a los 10 años del 41%, mientras que las biopsias sin NCT (n=174) mostraban una supervivencia del 95%, y en las biopsias con NCT pero sin vasculopatía del transplante (n=87) la supervivencia fue del 82%. El análisis multivariante demostró que sólo el diagnóstico histológico predecía de manera independiente la supervivencia del injerto.

La NCT estaba ya presente en el 15,7% de las biopsias del donante. En consecuencia, teniendo en cuenta que a los 3 meses después del transplante el 38,3% de las biopsias de

RESULTADOS

protocolo presentaban NCT, se asumió que la incidencia de NCT es de un 22,6%. Con estos datos se estimó el tamaño muestral necesario en estudios de prevención primaria para detectar en la biopsia de protocolo practicada a los 3 meses una reducción en la incidencia de NCT de un 50%. La estimación fue de 285 pacientes para cada uno de los grupos (el tratado y el control). Por otro lado, para los estudios de prevención secundaria deberían ser incluidos 217 pacientes con NCT o bien 72 pacientes con vasculopatía del transplante en cada uno de los grupos para detectar un incremento en un 50% de la supervivencia a los 5 años. Sin embargo, es importante tener en cuenta que para seleccionar 570 pacientes con NCT se debería hacer una biopsia a unos 1200 pacientes, y para identificar injertos con vasculopatía crónica se deberían biopsiar aproximadamente 2000 pacientes.

1.2 Análisis de las biopsias de protocolo mediante técnicas de morfometría.

Posteriormente se estudió la evolución de la NCT durante el primer año después del trasplante utilizando técnicas morfométricas con el objetivo de evaluar si esta estrategia permitía reducir aún más el tamaño muestral en estudios de prevención primaria de la NCT. Para ello se incluyeron 40 biopsias realizadas a los 4 meses del transplante (128 ± 68 días) en pacientes estables. En todos los casos se disponía de la biopsia basal del donante y en 27 casos se realizó una segunda biopsia de protocolo al año del transplante (435 ± 88 días).

Se observó que los índices de cronicidad evaluados mediante los criterios de Banff aumentaron durante los 12 primeros meses, mientras que los índices de lesión aguda alcanzaron un máximo a los 4 meses para disminuir después. Aplicando técnicas de morfometría se demostró que la fracción del volumen de la íntima arterial ($V_{\text{íntima/arteria}}$) creció significativamente de $11,6 \pm 7,6\%$ en la biopsia del donante a $18,0 \pm 8,1\%$ en la biopsia de protocolo de los 4 meses. También la fracción del volumen intersticial cortical ($V_{\text{intersticio/cortex}}$) creció significativamente de $11,1 \pm 3,5\%$ en la biopsia del donante hasta $15,8 \pm 7,6\%$ en la biopsia de protocolo de los 4 meses. Posteriormente se estudiaron los factores que se asociaban con el crecimiento de la fracción del volumen de la íntima y con la fracción de volumen intersticial. Se identificó que el único factor predictivo independiente

asociado con la fracción de volumen de la íntima fue la fracción del volumen de la íntima de la arteria del donante, mientras que la superficie corporal del receptor fue la única variable asociada de forma independiente con la fracción de volumen intersticial cortical.

Finalmente se sugirió que las técnicas de morfometría podrían reducir el tamaño mínimo muestral en los estudios de prevención primaria de la NCT. En este sentido, se ha estimado que para demostrar una reducción de un 50% en el engrosamiento de la íntima en la biopsia de protocolo de los 4 meses se necesitarían 49 pacientes en cada uno de los grupos. Sin embargo, en el caso de pretender demostrar una reducción de un 50% de la fracción de volumen intersticial se necesitarían 63 pacientes en el caso de estudiar las biopsias de protocolo realizadas a los 4 meses, y 42 pacientes si se utilizasen las biopsias de protocolo realizadas a los 12 meses.

1.3 Análisis de la reproducibilidad del diagnóstico de la NCT en biopsias secuenciales.

En este estudio se incluyeron 310 biopsias procedentes de 155 pacientes realizadas entre los 4 (113±46 días) y los 12 meses (435±70 días). Según los criterios de Banff de 1997 se consideraron como adecuadas 173 biopsias (55,8%) porque presentaban como mínimo 10 glomérulos y 2 arterias, 72 biopsias (23,2%) presentaban el tamaño mínimo recomendado (entre 7 y 9 glomérulos y al menos una sección arterial), y 65 biopsias (21%) fueron consideradas como inadecuadas (entre 1 y 6 glomérulos y como mínimo una sección arterial).

Se observó que la prevalencia de NCT progresó significativamente de un 40% a los 4 meses a un 53% a los 12 meses. También, progresó la severidad de la NCT y la proteinuria aumentó ligeramente (0,31±0,21 vs 0,38±0,52; p=0,044). Por otro lado, los índices de lesión aguda según los criterios de Banff, el filtrado glomerular (53±14 vs. 54±14 mL/min/1,73 m²; p=ns), y la presión arterial media (101±12 vs. 104±12 mmHg; p=ns) permanecieron estables. La supervivencia del injerto si la biopsia de protocolo de los 4 meses presentaba

NCT fue del 74%, mientras que en los casos sin NCT fue del 91%. En el caso de tener en cuenta el diagnóstico histológico de la biopsia realizada a los 12 meses la supervivencia del injerto con NCT fue de 75% y del 94% si no presentaba NCT.

Cuando se analizó la concordancia de los diagnósticos en las dos biopsias de protocolo se encontró que 54 pacientes (35%) no presentaban NCT en ninguna de las dos biopsias, 39 pacientes (25%) presentaban una progresión de la NCT, en 19 casos (12%) la biopsia del año mostraba una histología que se catalogó como normal mientras que la biopsia realizada a los 4 meses había sido diagnosticada de NCT de grado leve y finalmente, 43 injertos (28%) presentaban NCT las dos biopsias. La supervivencia de los injertos en estos grupos fue de 100%, 81,6%, 82,6% y 69,4% respectivamente. Con estos datos se calculó el posible error en el diagnóstico histológico de la NCT, teniendo en cuenta que las lesiones de NCT son irreversibles y que el error de muestreo se distribuye de forma normal, estimándose que en el 25% de las biopsias el diagnóstico puede ser erróneo.

2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LOS SNPs DEL EXÓN 1 DEL GEN DEL TGF- β_1 CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

El objetivo de este estudio era analizar la posible asociación entre los SNPs del codón 10 y del codón 25 del gen del TGF- β_1 y las lesiones renales precoces presentes en las biopsias de protocolo y explorar su contribución en la producción de TGF- β_1 . Con este fin se incluyeron 80 pacientes (52 hombres y 28 mujeres) trasplantados entre 1999-2001, que autorizaron la realización de una biopsia renal de protocolo. La edad media de los pacientes fue de 47 ± 13 años. En 50 casos se disponía también de una biopsia basal realizada en el momento de la extracción del riñón. El tratamiento inmunosupresor estaba basado en CsA (33 pacientes) y en Tacrolimus (47 casos).

Con el fin de estudiar la distribución de los polimorfismos del codón 10 y 25 en la población normal, se analizó el genotipo de 72 donantes de riñón (edad media 44 ± 16 años,

62 % hombres y 38% mujeres). La frecuencia de los alelos T y C del codón 10, y de los alelos G y C del codón 25 fueron similares entre la población transplantada y los controles sanos. El alelo T se detectó en el 55% de los pacientes trasplantados y en el 61% de los controles, mientras que el alelo G se encontró en el 90% de los pacientes transplantados y en el 90% de los controles. La distribución de los genotipos del gen TGF- β_1 siguió el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las biopsias se realizaron 168 \pm 58 días después del trasplante. El número medio de glomérulos por biopsia fue de 14 \pm 7. De acuerdo con los criterios de Banff, 54 biopsias (67,5%) presentaban una cantidad de tejido renal adecuada para el diagnóstico y 19 biopsias (23,8%) tenían el mínimo tamaño recomendado. El material obtenido en las restantes 7 biopsias (8,7%) se consideró como no adecuado (ente 1 y 6 glomérulos y al menos una sección arterial). Los diagnósticos histológicos fueron los siguientes: normal (n=28), cambios inflamatorios mínimos o “borderline” (n=8), rechazo agudo subclínico (n=5), NCT (n=24), NCT con cambios “borderline” (n=12), y NCT con rechazo agudo subclínico (n=3). La NCT era leve en 29 casos, moderada en 9 y severa en 1 caso. Los 20 pacientes con cambios “borderline” y los 8 con rechazo agudo se agruparon en la categoría de rechazo subclínico (35%). En la categoría de NCT fueron incluidos los 39 pacientes (49%) diagnosticados de NCT independientemente que presentaran también rechazo subclínico.

2.1 El alelo T del codón 10 del gen del TGF- β_1 del receptor se asocia con el rechazo subclínico.

Se observó una asociación significativa entre el rechazo subclínico del injerto y el SNP T/C del codón 10 del gen del TGF- β_1 del receptor (TT=46%, CT=46%, CC=8% en injertos con rechazo subclínico vs TT=28%, CT=41%, CC=31% en injertos sin rechazo subclínico; p=0,04), pero no con el SNP G/C del codón 25 (CC=4%, CG=14%, GG=82% vs CC=4%, CG=10%, GG=86%; p=ns). Por otro lado, la prevalencia de NCT no mostró una asociación significativa con el SNP T/C del codón 10 (TT=31%, CT=39%, CC=30% en injertos con NCT vs TT=37%, CT=46%, CC=17% en los injertos sin NCT; p=ns) ni con el

SNP G/C del codón 25 (CC=3%, CG=13%, GG=84% vs CC=5%, CG=10%, GG=85%, p=ns).

Para demostrar la solidez de la asociación encontrada se evaluó el papel de otros factores clínicos que pudieran tener relación en la aparición del rechazo subclínico. El análisis univariante mostró que sufrir un rechazo agudo previo a la biopsia también se asociaba con la presencia de un rechazo subclínico (riesgo relativo [RR]: 4,4; 95% intervalo de confianza [IC]: 1,3 a 15,0; p=0,028). El análisis multivariante confirmó que tanto la presencia del alelo T (RR: 6,7; 95% IC: 1,3 a 35,7; p=0,02) como haber sufrido un episodio de rechazo agudo (RR: 6,2, 95% IC: 1,5 a 25,0; p=0,01) eran factores predictores independientes de rechazo subclínico.

2.2 El alelo T del codón 10 del gen del TGF- β_1 no se asocia con una mayor producción de TGF- β_1 en los receptores de un trasplante renal.

El TGF- β_1 tisular se cuantificó en 61 biopsias, y los niveles de proteína plasmática en 65 pacientes. El nivel plasmático de TGF- β_1 se encontró aumentado en los pacientes con rechazo subclínico con respecto a los pacientes sin rechazo subclínico (2,59 \pm 0,91 ng/mL, n=22 vs. 2,05 \pm 0,76 ng/mL, n=43; p=0,01) y en los que recibían un tratamiento inmunosupresor basado en la CsA en comparación con los tratados con tacrolimus (2,58 \pm 0,98 ng/mL, n=20 vs. 2,08 \pm 0,74 ng/mL, n=45; p=0,02). El análisis mutivariante mostró que sólo el rechazo subclínico se asociaba de forma independiente con los niveles plasmáticos de TGF- β_1 (p=0,03). Por otro lado, los niveles intrarrenales del ARN mensajero del TGF- β_1 medidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real no variaron significativamente en pacientes con rechazo subclínico con respecto a los pacientes sin rechazo subclínico (2,58 \pm 0,76 copias, n=23, en pacientes con rechazo subclínico vs. 2,31 \pm 0,65 copias, n=38, en pacientes sin rechazo subclínico; p=0,15), ni en pacientes con distinto tratamiento inmunosupresor (2,42 \pm 0,67 copias, n=23, en pacientes tratados con CsA vs. 2,41 \pm 0,73 copias, n=38, si recibían tacrolimus; p=ns). Finalmente, el SNP T/C del codón 10 del gen del TGF- β_1 no se asoció ni con los niveles de proteína en plasma (2,14 \pm 0,83 ng/mL, n=50 en los

pacientes que presentaban el alelo T vs. $2,45 \pm 0,87$ ng/mL, $n=13$, en los pacientes que carecían del alelo T ; $p=ns$), ni con los niveles tisulares de TGF- β_1 ($2,41 \pm 0,67$, $n=49$ con el alelo T vs. $2,50 \pm 0,85$ copias, $n=11$, sin el alelo T; $p=ns$).

3 ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO DEL GEN DE LA ECA CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

El objetivo de este estudio era analizar la posible asociación entre el genotipo de la ECA y las lesiones renales precoces presentes en las biopsias de protocolo y explorar su validez como marcador pronóstico. Para esta parte del estudio se incluyeron 180 pacientes (117 hombres y 63 mujeres) con edad media de 47 ± 12 años. El tratamiento inmunosupresor estaba basado en CsA (122 pacientes) y en Tacrolimus (49 casos). Los restantes 9 pacientes no recibieron fármacos anticalcineurínicos, y su régimen inmunosupresor se basó en un tratamiento de inducción, asociado a micofenolato mofetil y esteroides.

Entre los pacientes trasplantados se observó una frecuencia de los alelos D e I del gen de la ECA del 66,1% y 33,9% respectivamente. La población mantenía el equilibrio de Hardy-Weinberg. Como grupo control para estudiar la distribución del genotipo de la ECA en la población normal se utilizaron 113 muestras de sangre obtenidas de 72 voluntarios sin enfermedad renal y de 41 donantes de riñón (edad media: 42 ± 13 años, 49,6% hombres y 50,4 % mujeres).

La distribución del genotipo de la ECA en los pacientes trasplantados se aproximaba a la significación estadística (DD=43,3%, ID=45,6%, II=11,1% en pacientes trasplantados versus DD=30,1%, ID=54,9%, II=15% en el grupo control; $p=0,072$). Cuando se agruparon los pacientes se observó una mayor proporción del genotipo DD en los pacientes trasplantados que en el grupo control (DD=43,3%, no-DD=56,7% en pacientes trasplantados versus DD=30,1%, no-DD=69,9% en los controles; $p=0,026$).

3.1 El genotipo de la ECA no se asocia con una mayor prevalencia o incidencia de nefropatía crónica del trasplante

La prevalencia de la NCT se estudió en biopsias de protocolo realizadas a los 175 ± 90 días. El número medio de glomérulos por biopsia fue de 13 ± 7 y según los criterios de Banff se consideró que 119 biopsias (66,1%) eran adecuadas para el diagnóstico histológico, 34 (18,9%) presentaban el mínimo número de glomérulos necesarios y 27 biopsias (15%) fueron inadecuadas.

La incidencia de NCT se analizó en 152 pacientes con al menos 2 biopsias secuenciales. En 77 casos se disponía de una biopsia del donante y una biopsia de protocolo precoz, en 55 casos se disponía de la biopsia del donante y de una biopsia de protocolo tardía, y en 20 casos se disponía de una biopsia precoz y de una tardía. Las biopsias precoces se realizaron a los 153 ± 46 días, mientras que las tardías se realizaron a los 456 ± 93 días después del trasplante.

En el grupo de pacientes transplantados el genotipo de la ECA no se asoció con una mayor prevalencia de NCT, ni con su severidad. Tampoco se observó que los diagnósticos de las biopsias, según los criterios de Banff, fueran diferentes según el genotipo de la ECA. Observamos que la NCT había progresado en 42 pacientes, mientras que en 83 casos se mantuvo estable y otros 27 casos la NCT se encontraba en las dos biopsias. Sin embargo, no se observaron diferencias en la distribución del genotipo de la ECA en los pacientes en los que la NCT progresó (DD=38,1%, ID=47,6%, II=14,3%) con respecto a aquellos en los que la NCT no progresó (DD=44,6 %, ID=48,2%, II=7,2 %), ni en los pacientes que mostraron NCT en las dos biopsias (DD=44,5 %, ID=40,7%, II=14,8 %).

3.2 El genotipo de la ECA se asocia con la supervivencia del injerto.

En los 12 años de seguimiento, 29 pacientes perdieron el injerto por las siguientes razones: NCT (n=14), rechazo agudo después de la biopsia de protocolo (n=5), glomerulonefritis asociada con el virus de la hepatitis C (n=4), recidiva de la enfermedad

RESULTADOS

renal primaria (n=3), abandono del tratamiento inmunosupresor (n=2), y pielonefritis crónica (n=1).

La supervivencia de los pacientes estratificados según su genotipo de la ECA fueron similares (DD: 95%, ID: 98%, II: 90%, p=ns), así como la supervivencia del injerto (DD: 33%, ID: 64%, II: 70% p=ns). Por otro lado, teniendo en cuenta que encontrar NCT en la biopsia de protocolo es un factor pronóstico independiente de supervivencia del injerto, analizamos la influencia moduladora del genotipo de la ECA en la progresión de la insuficiencia renal del injerto. Con este propósito los pacientes fueron agrupados en 6 categorías: II-biopsia normal, ID-biopsia normal, DD-biopsia normal, II-biopsia con NCT, ID-biopsia con NCT y DD-biopsia con NCT. Cuando analizamos la supervivencia del injerto censurando los pacientes fallecidos y excluyendo del análisis aquellos pacientes que perdieron el injerto por otros motivos, distintos de la NCT, observamos una peor supervivencia en el grupo con el genotipo DD y NCT en la biopsia de protocolo (II-biopsia normal=100%, ID-biopsia normal=91%, DD-biopsia normal=84%, II-biopsia con NCT=100%, ID-biopsia con NCT=66% y DD-biopsia con NCT=36%, p=0,034).

3.3 El genotipo DD de la ECA se asocia a los niveles intrarrenales del ARN mensajero de la ECA.

Los niveles intrarrenales de ARN mensajero de la ECA se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real en 67 casos, de los que en 40 casos se disponía también del genotipo del donante. En un primer análisis no se observaron diferencias significativas en los niveles intrarrenales del ARN mensajero de la ECA que dependiesen del genotipo de la ECA del receptor (DD=-3,91±2,64; n=23; ID=-4,57±2,70; n=34; II=-4,84±1,98 ciclos, n=7; p=ns). Considerando la influencia en la supervivencia del injerto del genotipo de la ECA y de la presencia de NCT en la biopsia de protocolo, en segundo lugar se estudió si los niveles intrarrenales del ARN mensajero eran diferentes en las 6 categorías diagnósticas. No se encontraron diferencias significativas, en parte debido al escaso número de casos presente en alguno de los grupos. Por este motivo y con el fin de aumentar la potencia estadística,

agrupamos los pacientes en dos grupos según el genotipo (DD y no-DD) y observamos que los injertos con NCT y genotipo DD presentaban mayores niveles de ECA tisular que los injertos con NCT y genotipo no-DD (DD= $-3,36 \pm 2,35$, n=9; vs. no-DD= $-5,65 \pm 1,72$ ciclos, n=15; p=0,012).

4. ESTUDIO DE UN NUEVO MEDIADOR DE LESIÓN RENAL: ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL SPLICING ALTERNATIVO DEL GEN Par1/Emk1 CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

El objetivo fue estudiar la expresión de la ser/thre proteín-quinasa Par1/Emk1 en pacientes transplantados y sus alteraciones respecto a la población normal. Este objetivo se justificaba porque el fenotipo del ratón “knock-out” de Par1/Emk1 mostraba una alteración del sistema inmunológico y un infiltrado inflamatorio de predominio renal que recordaba las lesiones observadas en el rechazo agudo. Dado que el rechazo agudo es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la NCT, nos planteamos estudiar la expresión del gen Par1/Emk1 en las biopsias de protocolo con el fin de encontrar alteraciones que se asociaran con lesiones histológicas observadas en las biopsias de protocolo.

Para esta última parte del estudio se incluyeron 51 pacientes (34 hombres y 17 mujeres) con una media de edad de 44 ± 15 años. Todos los pacientes recibían un tratamiento inmunosupresor basado en la CsA. Las biopsias se realizaron 234 ± 148 días después del trasplante renal. El número medio de glomérulos por biopsia fue de 11 ± 8 , y de acuerdo con los criterios de Banff, 29 biopsias (56,9%) eran adecuadas, y 12 biopsias (23,5%) tenían el mínimo tamaño recomendado para el diagnóstico.

Los diagnósticos histológicos fueron: normal (n=24), cambios “borderline” (n=9), y NCT (n=18). La NCT era leve en 14 casos, moderada en 4 y se asociaba a cambios inflamatorios “borderline” en 9 casos. Además se analizaron 5 biopsias diagnosticas (3 con rechazo agudo y otras 2 con disfunción crónica del injerto).

4.1 El patrón normal de splicing del ARN mensajero del gen Par1/Emk1 está alterado en las biopsias de protocolo.

Se considera que el patrón normal de expresión del gen Par1/Emk1 (Figura 9), caracterizado mediante técnicas de PCR, es la coexpresión de la isoforma Emk1D (cuando se expresa el exón 16) y Emk1E (cuando el exón 16 no se expresa). En los pacientes transplantados, la isoforma Emk1A se encontró en todos los injertos mientras que la isoforma Emk1B sólo en 44 biopsias. Además, 43 biopsias de protocolo (84,4%) expresaban a la vez las isoformas Emk1D y Emk1E. Sin embargo, en 8 casos se observó una alteración de este patrón. En 4 casos (7,8%) la isoforma Emk1D no se detectaba, y en otros 4 casos (7,8%) fue la isoforma Emk1E la que no se detectó. En las biopsias diagnósticas se detectaron las mismas alteraciones, observándose la ausencia de la isoforma Emk1E en uno de los 2 pacientes con disfunción crónica del injerto por NCT, y en uno de los 3 casos con rechazo agudo.

4.2 Detección de una nueva isoforma de Par1/Emk1 debida al splicing alternativo del exón 2.

Analizando el grupo de biopsias de protocolo se detectó una nueva isoforma del ARN mensajero al observarse en el gel de agarosa una banda de mayor peso molecular que la isoforma Emk1B. Esta banda fue purificada y secuenciada, resultando estar formada por la inserción de un nuevo exón (exón 2), generalmente silente, detrás del exón 1B (Figura 9). En consecuencia se obtuvieron dos isoformas: Emk1B cuando no se expresaba el exón 2 y EMK1C cuando el exón 2 se incluía en el ARN mensajero del gen Par1/Emk1. En las biopsias de protocolo observamos que 10 injertos expresaban las isoformas B y C a la vez, en 34 casos únicamente se expresaba la isoforma B y en 7 casos no se expresaba ninguna de las dos isoformas. En las biopsias diagnósticas, se observó que la isoforma Emk1C se expresaba en una de las biopsias con rechazo agudo que también expresaba simultáneamente las isoformas Emk1D y Emk1E.

4.3 La expresión de la isoforma Emk1C en biopsias de protocolo se asocia con la severidad del infiltrado inflamatorio en el injerto renal.

Se pudo detectar la presencia del exón 2 en un solo caso en que se detectaba la isoforma Emk1D en el injerto, pero en ninguno de los injertos que presentaban exclusivamente la isoforma Emk1E. Teniendo en cuenta que la mayoría de los injertos expresaban simultáneamente las isoformas Emk1D y Emk1E, se analizó la potencial función del exón 2 en este grupo. En consecuencia, los pacientes se agruparon en 2 categorías dependiendo de la presencia del exón 2: Emk1C^[+] (9 pacientes) y Emk1C^[-] (34 pacientes). Cuando se analizó el tipo de lesiones presentes en la biopsia, se observó que el infiltrado inflamatorio intersticial fue más extenso y más severo ($i=0,88\pm0,33$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $0,41\pm0,50$ en pacientes Emk1C^[-], $p=0,01$). Además, los pacientes Emk1C^[+] presentaron una tendencia a sufrir lesiones más severas de tubulitis ($t=0,55\pm0,52$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $0,29\pm0,46$ en pacientes Emk1C^[-], $p=0,14$), y de fibrosis intersticial ($ci=0,66\pm0,70$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $0,29\pm0,52$ en pacientes Emk1C^[-], $p=0,09$).

Dado que encontramos un aumento del infiltrado inflamatorio intersticial en los pacientes Emk1C^[+] decidimos caracterizar las células mononucleares infiltrantes del injerto utilizando los marcadores de membrana CD3 (linfocitos T), CD20 (linfocito B) y CD68 (monocitos y macrófagos). Se observó que tanto las biopsias Emk1C^[+] como Emk1C^[-] presentaban una proporción similar (células CD3+: $50\pm10\%$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $49\pm11\%$ en pacientes Emk1C^[-]; células CD20+: $20\pm6\%$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $21\pm14\%$ en pacientes Emk1C^[-]; y células CD68+: $30\pm10\%$ en pacientes Emk1C^[+] vs. $30\pm12\%$ en el grupo de los pacientes Emk1C^[-]; $p=ns$).

4.4 La expresión de la isoforma Emk1C^[+] en biopsias de protocolo se asocia a hipertensión arterial.

Finalmente detectamos que los pacientes que expresan la isoforma Emk1C^[+] presentaron una presión arterial media más elevada (110 ± 11 vs. 99 ± 11 mmHg, $p=0,012$), y se observó una tendencia a un mayor consumo de medicación hipotensora ($1,11\pm0,92$ vs. $0,58\pm0,70$ hipotensores, $p=0,09$). No se observaron diferencias en los niveles de creatinina

sérica (155 ± 60 $\mu\text{mol/L}$ en pacientes $\text{Emk1C}^{[+]}$ vs. 144 ± 40 $\mu\text{mol/L}$ en pacientes $\text{Emk1C}^{[-]}$, $p=\text{ns}$), o proteinuria ($0,39\pm 0,29$ g/día in pacientes $\text{Emk1C}^{[+]}$ vs. $0,27\pm 0,20$ g/día en pacientes $\text{Emk1C}^{[-]}$, $p=\text{ns}$).

5. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DE LOS POLIMORFISMOS COMO MARCADORES DIAGNOSTICOS

Finalmente nos propusimos evaluar la utilidad del estudio genético para el diagnóstico de las lesiones histológicas presentes en las biopsias de protocolo. Con este objetivo determinamos el grado de correlación entre el resultado de los polimorfismos del $\text{TGF-}\beta_1$ y de Par1/Emk1 con la presencia de rechazo subclínico. Los polimorfismos de la ECA no fueron evaluados ya que no se había encontrado asociación con lesiones en la biopsia de protocolo. La validez de las pruebas diagnósticas genéticas se estudió calculando su sensibilidad (proporción de diagnósticos positivos en los sujetos con la rechazo subclínico) y especificidad (proporción de diagnósticos negativos en los sujetos sin rechazo subclínico). Además evaluamos el comportamiento de estas pruebas en la práctica clínica habitual estudiando los valores predictivos.

5.1 Estudio de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los SNPs del $\text{TGF-}\beta_1$ para el diagnóstico del rechazo subclínico.

La sensibilidad del SNP del codón 10 del $\text{TGF-}\beta_1$ o lo que es lo mismo la probabilidad que un paciente con rechazo subclínico en la biopsia de protocolo presente el alelo T fue del 92%. Es decir, la probabilidad de tener un falso negativo (sujeto enfermo diagnosticado como sano) o error β es de un 8%. Por otro lado, su especificidad (probabilidad de que un paciente sin rechazo subclínico no presente el alelo T) fue de un 31%, por lo que la probabilidad de tener un falso positivo (sujeto sano diagnosticado como enfermo) o error α fue de un 69%.

Para evaluar como se comportaría la prueba genética en la práctica clínica calculamos los valores predictivos. El valor predictivo positivo o dicho de otra manera, la probabilidad de presentar realmente rechazo subclínico cuando el paciente presenta el alelo T fue del 40%. Por otro lado, el valor predictivo negativo o la probabilidad de no presentar rechazo subclínico sí el paciente no presenta el alelo T fue de un 88%.

5.2 Estudio de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los polimorfismos del Par1/Emk1 para el diagnóstico del rechazo subclínico.

La probabilidad que un paciente con rechazo subclínico en la biopsia de protocolo presentara la isoforma Emk1C (sensibilidad) fue del 36%, y la probabilidad de tener un falso negativo fue de un 64%. Por otro lado, la probabilidad que un paciente sin rechazo subclínico no presentara la isoforma Emk1C (especificidad) fue de un 95%, y la probabilidad de tener un falso positivo es de un 5%. Finalmente el valor predictivo positivo fue del 88%, y el valor predictivo negativo de un 59%.

VI DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

DISCUSIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral tiene por objetivo utilizar las biopsias de protocolo para evaluar el componente genético que interviene en el desarrollo de las lesiones del injerto renal. Con este fin se ha estudiado el valor de diversos polimorfismos de los genes del TGF- β_1 , ECA, y Par1/Emk1 como marcadores moleculares para el diagnóstico precoz de NCT.

El TGF- β_1 tiene un papel patogénico en enfermedades caracterizadas por la inflamación y la fibrosis, y en el campo del trasplante renal se ha observado un aumento en sus niveles tisulares asociados con el rechazo agudo y crónico. Además, los SNPs del gen del TGF- β_1 se han asociado con mayores niveles tisulares y plasmáticos, y con un mayor riesgo de rechazo agudo. En consecuencia tiene gran interés analizar si los SNPs del TGF- β_1 están también asociados con las lesiones precoces en las biopsias de protocolo. En nuestro estudio hemos observado que el alelo T del codón 10 del TGF- β_1 se asocia con una mayor incidencia de rechazo subclínico. Sin embargo, no se ha podido confirmar que los SNPs del TGF- β_1 estén asociados directamente con la NCT. No obstante considerando que el rechazo subclínico participa en el desarrollo de la NCT no podemos descartar que tenga relevancia en su patogenia.

En segundo lugar, es bien conocido el efecto renoprotector de los inhibidores de la ECA, y se admite que el genotipo DD de la ECA es un factor de mal pronóstico en algunas nefropatías. Sin embargo, no está aún bien definido el valor del genotipo de la ECA del donante o del receptor en la prevalencia o la incidencia de la NCT, así como en la supervivencia del paciente y del injerto. En nuestro estudio hemos observado que el genotipo DD del receptor no se asocia con la prevalencia o incidencia de NCT pero se comporta como un factor de mal pronóstico en los injertos que ya presentan NCT en la biopsia de protocolo.

Por último, la proteína quinasa Par1/Emk1 ha sido identificada recientemente como clave en la homeostasis del sistema inmunológico y su alteración se ha relacionado con un

estado de hiperexcitabilidad del sistema inmunitario y aparición de infiltrados inflamatorios en el riñón. Teniendo en cuenta que el rechazo subclínico participa en el desarrollo de la NCT, la alteración de su expresión podría contribuir a la NCT. En nuestro estudio hemos detectado la expresión de una nueva variante del gen Par1/Emk1 (Emk1C) que se asocia con rechazo subclínico, con la NCT y con una mayor presión arterial media.

1. LAS BIOPSIAS DE PROTOCOLO PERMITEN REDUCIR EL TAMAÑO MUESTRAL DE LA POBLACIÓN EN LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

Las estimaciones de los estudios epidemiológicos clásicos de prevención primaria de la NCT proponen que serían necesarios unos 1500 pacientes y un seguimiento de 3 años para demostrar una mejora de la supervivencia del injerto de un 30%. Con el objetivo de reducir el tamaño de la muestra y el tiempo de seguimiento se han buscado marcadores que substituyan el análisis de la supervivencia. En este sentido, se ha demostrado que la presencia de NCT en la biopsia de protocolo es el único factor independiente que predice la pérdida del injerto. En consecuencia, nuestro estudio pretendía evaluar si las biopsias de protocolo permitirían reducir el tiempo de seguimiento o el tamaño mínimo de la muestra en los estudios de prevención primaria o secundaria. Los cálculos realizados mostraron que considerar como variable de eficacia un reducción del 50% en la incidencia de NCT en la biopsia de protocolo realizada a los 3 meses permitía disminuir el tamaño de la muestra a unos 300 pacientes en cada uno de los dos grupos y reducir el tiempo de seguimiento a 3 meses. También se evaluó la utilidad de las biopsias de protocolo en el diseño de estudios de prevención secundaria, ya que la biopsia de protocolo permite el diagnóstico precoz de la NCT cuando aún se puede administrar un tratamiento para reducir la progresión de la lesión renal. La ventaja de utilizar la biopsia de protocolo en estos estudios es que identificaría los pacientes con riesgo de perder el injerto, evitando la administración de fármacos en los pacientes que probablemente no se beneficiarían de ellos. Sin embargo, el mayor problema de esta estrategia es que se necesitarían practicar la biopsia en aproximadamente 1200 pacientes para seleccionar el tamaño mínimo muestral de 217 pacientes por grupo, y que el

DISCUSIÓN

tiempo de seguimiento se prolongaría ya que sólo los pacientes con un injerto funcional a los 3 meses podrían ser incluidos. Por otro lado, en el caso de utilizar como variable de eficacia la vasculopatía del injerto a los 3 meses se necesitarían 72 pacientes en cada grupo seguidos durante 5 años para demostrar una reducción del 50% en la pérdida del injerto. Este último diseño no es razonable porque se necesitarían practicar la biopsia de protocolo a los 3 meses a 2000 pacientes para identificar los 144 con vasculopatía. Todos estos datos muestran que el análisis semicuantitativo de la lesión histológica aunque reduce el tamaño muestral y el tiempo de seguimiento, son necesarios un número notable de pacientes y un seguimiento considerable. Finalmente, se ha sugerido que una mejor estrategia sería evaluar la progresión de las lesiones entre el implante y una biopsia de protocolo practicada durante el primer año. Esta propuesta esta basada en que la fibrosis intersticial progresa rápidamente desde el momento del implante (la prevalencia de NCT en el donante es de un 15%) hasta la biopsia de protocolo de los 4 meses (prevalencia de NCT de 40%), y posteriormente lo hace de una forma más lenta (prevalencia de NCT a los 12 meses de un 53%). Otra posible estrategia propuesta para reducir el tamaño de la muestra sería la evaluación de la lesión renal por un método cuantitativo como la morfometría.

La medida de la fracción de volumen intersticial del cortex y de la íntima de la arteria mediante técnicas de morfometría ha permitido reducir el tamaño de la muestra. Se ha estimado que serían necesarios 49 pacientes en cada grupo cuando el objetivo pretendido fuera demostrar una reducción de un 50% en la progresión del crecimiento de la íntima vascular a los 4 meses. Por otro lado, en el caso de evaluar la variación de la fracción de volumen intersticial para estimar el tamaño de la muestra los números calculados son similares. Sin embargo la utilidad de este parámetro no esta exenta de críticas, porque la fracción de volumen intersticial no permite discriminar entre lesiones agudas o crónicas. En este sentido, se ha observado que en las biopsias precoces la fracción de volumen intersticial se correlaciona con la severidad del infiltrado intersticial, mientras que las biopsias más tardías reflejan de una forma más precisa el grado de fibrosis intersticial porque presentan menos lesiones inflamatorias. Con el objetivo de mejorar la precisión del diagnóstico se han

DISCUSIÓN

llevado a cabo varios intentos como utilizar la tinción del colágeno III o el rojo sirio. Sin embargo, se necesitan más estudios para definir cual es la mejor estrategia.

Finalmente se estudió la reproducibilidad del diagnóstico de NCT de acuerdo con los criterios de Banff en las biopsias de secuenciales de protocolo. Se observó que un 12% de los pacientes diagnosticados de NCT en la biopsia de protocolo de los 4 meses no presentaban lesiones en la biopsia de protocolo realizada al año. Este resultado planteaba varias explicaciones, como la posibilidad de un error de muestreo (biopsias procedentes de áreas distintas del riñón), de una variación que dependiese del observador o que realmente se hubiese producido una curación de las lesiones. Hay que tener en cuenta que para estudiar las lesiones se utilizan los criterios de Banff que han sido diseñados para la evaluación de las biopsias diagnósticas, pero no para las lesiones observadas en las biopsias de protocolo. Además, las lesiones de la NCT presentan un espectro continuo, a pesar que según los criterios de Banff la NCT se define en una escala semicuantitativa cuando en presencia de atrofia tubular hay un área de fibrosis que ocupa más del 5% de la biopsia. Por lo tanto la variabilidad entre las observaciones aumenta cuando la extensión de la lesión se encuentra en el límite entre dos categorías. En nuestro estudio la mayoría de los pacientes o no presentaban NCT o esta era de grado leve, por lo que en una proporción elevada de casos el grado de lesión debería encontrarse en el límite entre estas dos categorías. Sin embargo, los casos con NCT en las dos biopsias se interpretaron como muy probable el diagnóstico ya que la extensión de la fibrosis estaba claramente por encima del 5%, mientras que los injertos con dos biopsias normales se consideraron que no deberían presentar lesiones crónicas. Por otro lado, en los pacientes con aparente progresión o regresión, la severidad de lesiones crónicas posiblemente se encontraba alrededor del límite que separa la NCT de la biopsia considerada normal y por tanto la probabilidad de clasificarla erróneamente es más alto. Esta interpretación está respaldada por el análisis de la supervivencia que demostró que era pobre en los pacientes que presentan NCT en las dos biopsias, excelente en los casos en que las dos biopsias eran normales, e intermedia tanto en los casos en que la NCT progresaba como en los que regresaba.

La progresión de NCT se observó en el 25% de los pacientes, y la regresión en el 12%, sugiriendo que la probabilidad de progresar es mayor que la probabilidad de regresar. De los pacientes que progresaron, aproximadamente la mitad presentaban una NCT moderada o severa en la segunda biopsia, mientras que la otra mitad el grado de la NCT era leve. Por otro lado, casi todos los pacientes que en los que la lesión regresó presentaban una NCT de grado leve en la primera biopsia. Estos resultados permiten hacer una evaluación de la precisión del diagnóstico de NCT en las biopsias de protocolo. En este sentido, si se considera que las lesiones de NCT son irreversibles, el 12% de los pacientes en los que se observó una aparente regresión se diagnosticaron de forma errónea. Estos datos reflejan la dificultad para clasificar de forma correcta las biopsias que presentan atrofia tubular y una leve fibrosis intersticial. Por otro lado, si asumimos que la distribución del error sigue una distribución normal una proporción similar de pacientes que progresaron a NCT debería también haberse clasificado erróneamente. En consecuencia, la evaluación de las biopsias de protocolo con los criterios de Banff implica un error diagnóstico en el 25% de los casos, especialmente en los casos con NCT leve. Este número representa tanto el error de muestreo asociado a la realización de dos biopsias secuenciales como a la variabilidad entre observadores y entre observaciones.

2. ASOCIACIÓN DE LOS SNPs DEL EXÓN 1 DEL TGF- β ₁ CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

En nuestro estudio hemos observado una asociación independiente entre el alelo T del codón 10 del TGF- β ₁ del receptor y la presencia de rechazo subclínico en biopsias de protocolo realizadas a los 6 meses. Esta asociación sigue la línea de otros estudios en los que se ha observado que este alelo es más prevalente en otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (149), en enfermedades neurológicas (150) o en la uveítis (151), y con el rechazo agudo en el trasplante hepático (152). En el campo del trasplante renal se ha publicado una asociación entre el SNP T/C del codón 10, tanto del donante como del receptor, con una mayor incidencia del rechazo agudo celular (154,156). Estos datos

DISCUSIÓN

sugieren que el SNP T/C del codón 10 se asocia con una mayor incidencia de rechazo agudo, aunque la contribución del donante y del receptor no están bien establecidas. En nuestro estudio esta asociación se ha encontrado con el genotipo del receptor, pero no con el del donante. Sin embargo, el número de donantes analizados es menor que el número de pacientes incluidos, por lo que no podemos afirmar que el genotipo del donante no esté también implicado. Por otro lado, se ha publicado recientemente la asociación entre el SNP G/C del codón 25 del TGF- β_1 y el rechazo agudo recurrente (155). Hay que destacar que en este estudio no se evaluó el SNP T/C del codón 10 del TGF- β_1 . Por otro lado, al igual que sucede en nuestro estudio, los autores no observaron asociación entre el SNP G/C del codón 25 del TGF- β_1 y una mayor incidencia de rechazo agudo subclínico en la biopsia de protocolo.

Se ha propuesto que el SNP T/C del codón 10 del gen TGF- β_1 está asociado con la producción de TGF- β_1 . El codón 10 forma parte del péptido señal que dirige el procesamiento y la secreción extracelular del TGF- β_1 , y se han descrito variaciones en el nivel de proteína plasmática dependiendo del SNP T/C del codón 10 (145-147). Sin embargo, existen controversias sobre qué alelo se asocia con un nivel de TGF- β_1 más elevado. Así, por ejemplo, el alelo T ha sido asociado tanto con niveles elevados, como disminuidos de ARN mensajero y de proteína del TGF- β_1 (145-147). En el campo del trasplante renal no existe mucha información sobre la relación entre los SNPs del TGF- β_1 y el nivel intrarrenal de ARN mensajero o de proteína en plasma de TGF- β_1 . En este sentido, Melk y colaboradores no observaron asociación entre los SNPs de varias citoquinas, entre las que se encontraba el TGF- β_1 , y su expresión intrarrenal en biopsias obtenidas en pacientes pediátricos con disfunción crónica del injerto y concluían sugiriendo que los SNPs no tienen un papel patogénico, una vez el sistema inmunológico está activado (161). En nuestro estudio realizado sobre injertos estables tampoco observamos una asociación entre los SNPs del TGF- β_1 y su producción. Sin embargo, la presencia de rechazo subclínico y el empleo de CsA como tratamiento inmunosupresor se asociaron a un nivel elevado de TGF- β_1 plasmático, aunque no de ARN mensajero tisular. Este hecho apoya la hipótesis que los

DISCUSIÓN

niveles plasmáticos de TGF- β_1 proceden no sólo de su síntesis sino también de la liberación de los depósitos citoplasmáticos de TGF- β_1 preformado a consecuencia de la destrucción celular (186). Todos estos datos sugieren que los SNPs sólo tendrían un papel modesto en la producción de TGF- β_1 en los pacientes trasplantados. En consecuencia, no podemos afirmar que la asociación entre el alelo T del codón 10 y el rechazo subclínico se deba a una modificación en la producción de TGF- β_1 y no puede descartarse que este ligado a una alteración de otros genes responsables de aumentar el riesgo.

Por último, en nuestro estudio no se ha observado asociación entre los SNPs en el codón 10 y codón 25 y la presencia de fibrosis renal en la biopsia de protocolo. Este resultado coincide con la reciente observación que el genotipo del TGF- β_1 , tanto del donante como del receptor, no se asocia con la presencia de NCT diagnosticada mediante biopsia en pacientes con disfunción crónica del injerto (161), ni tampoco con la supervivencia del injerto después de 3 años de seguimiento (161,187). Estos datos sugieren que el impacto clínico de los SNPs del TGF- β_1 es limitado. Sin embargo, hay que recordar que un sólo polimorfismo puede no demostrar relevancia en la supervivencia del injerto en la población general al quedar enmascarado por otros factores y para valorar su importancia se ha sugerido que deberían analizarse subgrupos homogéneos de pacientes (167). Por otro lado se sabe que la presencia de rechazo subclínico en la biopsia de protocolo es un factor pronóstico para el desarrollo de la NCT, porque se ha observado que el infiltrado intersticial por células mononucleares se correlaciona con una mayor disfunción del injerto, con una progresión en la severidad de las lesiones de NCT en biopsias secuenciales de protocolo, y con una peor supervivencia a los 10 años de seguimiento (33,35,188,189). En consecuencia dado que hemos observado la asociación entre el alelo T del codón 10 y el rechazo subclínico no podemos descartar que a largo plazo pueda influir en la supervivencia del injerto, sugiriendo que los factores genéticos pueden influir en la aparición de lesiones histológicas.

2. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO DE LA ECA CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

En este estudio se ha observado una mayor proporción del genotipo DD de la ECA en pacientes trasplantados que en la población sana de control. Este resultado no es sorprendente si tenemos en cuenta que el genotipo DD es más prevalente en la población en diálisis (190), y que se ha asociado con una más rápida progresión de la insuficiencia renal crónica en diferentes enfermedades renales como la nefropatía diabética, la glomérulonefritis IgA y la poliquistosis renal (170,172,175). Es importante remarcar que el genotipo DD no se ha asociado con un aumento en la incidencia o prevalencia de ninguna de las anteriores enfermedades renales, aunque sí con un peor pronóstico una vez la lesión renal ha aparecido. Estas observaciones sugieren que el genotipo de la ECA modula la progresión a la insuficiencia renal terminal, sólo cuando los pacientes ya padecen lesiones crónicas, pero que sin embargo no aumenta el riesgo a sufrirlas. En nuestro estudio no se ha observado asociación entre el genotipo de la ECA y la prevalencia o la incidencia de la NCT.

Varios estudios basados en la población general transplantada han sido incapaces de establecer una asociación entre el genotipo de la ECA y la supervivencia del injerto (176,178,179). Sin embargo, en pacientes trasplantados de riñón con riesgo de perder el injerto, como aquellos con un aclaramiento de creatinina <50 mL/min o una proteinuria ≥ 0.5 g/día a los 12 meses después del trasplante, se ha observado que el genotipo DD del receptor, aunque no del donante, se asocia con un peor pronóstico (176). Una asociación similar se ha observado en la población pediátrica, que también está expuesta a un mayor riesgo de desarrollar disfunción del injerto (177). En estos estudios no se dispone de diagnóstico histológico y en consecuencia no es posible descartar que otras causas de disfunción del injerto como la nefrotoxicidad por fármacos, el rechazo agudo, o las glomérulonefritis, tanto las recurrencias como las “de novo”, fueran las responsables del deterioro de la función renal en los pacientes con el genotipo DD. Sin embargo, todas estas observaciones sugieren que el genotipo de la ECA actuaría como un modificador genético

en la progresión de la insuficiencia renal crónica, una vez que las lesiones estructurales ya están presentes. En nuestro estudio observamos que el genotipo DD esta asociado con una peor supervivencia sólo en los pacientes con NCT en la biopsia de protocolo.

Finalmente en este estudio se observó que los receptores con el genotipo DD y NCT en la biopsia de protocolo presentaban mayores niveles intrarrenales del ARN mensajero de la ECA. Con anterioridad ya había sido descrita la asociación entre el genotipo DD y niveles plasmáticos de ECA elevados (191-194). En nuestro estudio también observamos que en los injertos normales no muestran esta asociación, sugiriendo que hay otros factores que modulan la expresión de la ECA. Por otro lado, tampoco se encontró asociación entre los niveles de ARN mensajero de la ECA y el genotipo de los donantes. Este dato coincide con la observación que es el genotipo del receptor, y no el del donante, el que se asocia con la supervivencia del injerto y que la principal fuente de ECA en el injerto renal son las células mononucleares (162). Además, las otras potenciales fuentes de ECA, como las células epiteliales o endoteliales pueden tener también su origen en el receptor (194-196). Todos estos datos sugieren que los pacientes con el genotipo DD y NCT en la biopsia de protocolo serían los que más se beneficiarían del bloqueo del sistema renina-angiotensina.

3. ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES DEL SPLICING ALTERNATIVO DEL GEN Par1/Emk1 CON LAS LESIONES DEL ALOINJERTO RENAL

Se han observado alteraciones del patrón normal de splicing del gen Par1/Emk1 en los injertos renales, y se ha identificado una nueva isoforma que expresa el exón 2, habitualmente reprimido. La expresión de esta nueva isoforma, que se ha llamado Emk1C, está asociada con el rechazo subclínico, la NCT y con una elevada presión arterial media.

Como ya se ha comentado el diagnóstico de rechazo subclínico es importante porque participa en el desarrollo de la NCT, y se ha demostrado que su tratamiento mejora el pronóstico del injerto disminuyendo la aparición de lesiones crónicas (33,185). Este

diagnóstico solo puede establecerse mediante la realización de biopsias de protocolo, y se ha observado que de forma proporcional a la severidad de la inflamación se produce un aumento progresivo en la expresión de genes relacionados con la activación del sistema inmunológico, de forma que entre inflamación “borderline”, rechazo agudo subclínico y rechazo agudo clínico solo habría una diferencia en la intensidad de la respuesta (197). Además, la expresión de citoquinas proinflamatorias y de otros productos relacionados con el reconocimiento antigénico de los linfocitos T en injertos clínicamente estables se correlacionan con el pronóstico del injerto (198).

La proteína quinasa Par1/Emk1 es necesaria para mantener a los linfocitos T CD4+ en estado latente, y la pérdida de su función causa una alteración en el fenómeno de “homing” y una respuesta inapropiada frente a antígenos propios y ambientales (136). De esta forma, las células Th1 producen más IFN- γ que los controles, indicando que son más fácilmente estimuladas frente a los antígenos y de una forma más potente (136). Además, los riñones de ratones Emk1^{-/-}, así como también los pulmones, muestran un infiltrado por células mononucleares y lesiones en el glomérulo características de glomerulonefritis membranoproliferativa. También, se observó que los ratones heterocigotos Emk1^{+/-} presentaban alteraciones del sistema inmunológico, aunque de forma menos severa, sugiriendo que el déficit parcial de Par1/Emk1 también tiene relevancia clínica.

En nuestro trabajo se han observado alteraciones en el patrón normal de splicing del ARN mensajero del gen Par1/Emk1. Estas alteraciones están caracterizadas por el splicing alternativo del exón 16 y por la expresión del exón 2 que generalmente está reprimido. La expresión del exón 2 da lugar a una nueva variante del gen llamada Emk1C, se ha asociado con una mayor extensión del infiltrado intersticial de células mononucleares en los injertos renales. La detección de esta isoforma podría ser consecuencia del aumento en el número de células monucleares que permitiría la detección de transcritos que habitualmente se expresan en muy baja cantidad. Sin embargo, consideramos que está causada por una alteración en la regulación de la maquinaria molecular que controla el splicing porque los niveles de las

isoformas Emk1A y Emk1B no están aumentadas en las muestras en las que se detecta Emk1C, como sería de esperar en el caso que el efecto se debiera únicamente al mayor número de células inflamatorias. Tampoco la variante Emk1C se detectó en todas las muestras con infiltrado intersticial. Los cambios en el splicing alternativo puede deberse a mutaciones en las señales que controlan la correcta eliminación de intrones, en cuyo caso sólo el gen mutado se verá afectado, o por el contrario puede ser originado por una alteración del balance en la actividad de los factores que regulan el proceso (199,200). En este último caso uno esperaría un efecto sobre otros genes.

Finalmente, se ha estudiado el fenotipo de las células del infiltrado inflamatorio observado en las biopsias, y no se ha encontrado un tipo celular predominante en los injertos de los pacientes con la variante Emk1C. Este resultado es semejante al obtenido en el modelo animal de knock-out (ratón Emk1^{-/-}) del gen Par1/Emk1, en el que el infiltrado es una mezcla de diversos tipos celulares acumulados en las regiones perivasculares del cortex y la médula del riñón. Estos datos sugieren que están afectadas todas las células mononucleadas, o que por el contrario las alteraciones están localizadas en su exterior, como por ejemplo en las células epiteliales del riñón. En este sentido se ha demostrado que el gen Par1/Emk1 también se expresa en las células epiteliales y regula la adhesión célula a célula a través de E-cadherina (138).

4. LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CON LAS LESIONES EN EL ALOINJERTO RENAL SUGIERE LA EXISTENCIA DE UNA SUSCEPTIBILIDAD DE CAUSA GENÉTICA

El resultado de nuestro trabajo apoya la hipótesis que en la patogenia de la NCT también participan factores genéticos porque se han encontrado asociados tres polimorfismos con lesiones o alteraciones funcionales del injerto renal. Este resultado no es sorprendente ya que esta bien establecido la asociación entre determinados SNPs y enfermedades comunes como la diabetes, enfermedades autoinmunes o la enfermedad inflamatoria intestinal (12). Por otro lado en la NCT, al igual que en las enfermedades

comunes se produce el efecto combinado de una mayor susceptibilidad determinada por variantes de genes y factores ambientales. En el campo del trasplante renal los factores ambientales de origen inmunológico o no inmunológico tienen una gran importancia en la patogenia de la NCT. Sin embargo cada vez hay más evidencias que el sustrato genético tiene también un papel determinante en la supervivencia del injerto. En este sentido es bien conocida la importancia de los polimorfismos que afectan al sistema HLA en la respuesta inmunológica. También se han descrito polimorfismos en los genes de citoquinas que se correlacionan con la actividad inmunológica del receptor después del trasplante y con un mayor riesgo de rechazo agudo (156). Estas asociaciones sugieren utilizar los polimorfismos en los genes de las citoquinas para identificar pacientes con predisposición a sufrir episodios de rechazo agudo y que podrían beneficiarse de una individualización en su tratamiento inmunosupresor. Sin embargo se ha descrito que la relevancia de los polimorfismos de los genes de las citoquinas para aumentar el riesgo de rechazo es modesta y con una sensibilidad baja (24%) por lo que su valor para identificar pacientes de riesgo a sufrir un rechazo agudo es limitado (156).

Hay que tener en cuenta que algunas variaciones en otros genes menos estudiados podrían predecir de una manera más precisa el riesgo de un paciente a presentar lesiones del injerto renal. Con el fin de identificar genes relacionados con enfermedades clásicamente se ha recurrido a dos estrategias. Estudios de ligamiento en familias y estudios de asociación entre los genes candidatos y las enfermedades. El problema de los estudios de ligamiento es que tiene poca potencia con la excepción de los casos en los que un sólo locus explica una proporción importante de la enfermedad. Por el contrario los estudios de asociación estudian sólo uno o unos pocos genes del conjunto de los que podrían estar implicados. Sin embargo el método ideal sería investigar todas las variantes génicas en un amplio número de pacientes y controles (12). En este sentido, recientemente se han publicado los datos de las variaciones comunes del genoma humano que ha permitido la identificación de determinados haplotipos (combinación de SNPs a lo largo de un cromosoma que se heredan

de forma conjunta). En consecuencia, en el futuro se podrán estudiar los haplotipos asociados a determinadas enfermedades.

4. VALORACIÓN DE LA RELEVANCIA DE LOS POLIMORFISMOS COMO MARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA LESIÓN DEL ALOINJERTO RENAL

La validez de las pruebas diagnósticas genéticas se evaluaron estudiando su sensibilidad y especificidad. La sensibilidad caracteriza la capacidad de la prueba diagnóstica para detectar la enfermedad en los sujetos que realmente están enfermos, y la especificidad caracteriza la capacidad de la prueba para no detectar la enfermedad en los sujetos que están sanos. Además evaluamos cual sería el comportamiento de la determinación de los polimorfismos en la práctica clínica en nuestra población mediante el cálculo de los valores predictivos.

Hemos observado que la determinación del alelo T en el codón 10 del TGF- β_1 es muy sensible para identificar pacientes con rechazo subclínico (92%) pero su especificidad es pobre (31%). Es decir, se producen muchos falsos positivos (pacientes con el alelo T del gen del TGF- β_1 pero que no presentan rechazo subclínico). Además presenta un valor predictivo negativo elevado (88%) y un valor predictivo positivo modesto (40%). Estos resultados deberían confirmarse en una población más amplia antes de poder proponerse como posible marcador diagnóstico. En el caso de demostrarse la solidez de la asociación, la determinación del genotipo del codón 10 del gen del TGF- β_1 podría ser útil para restringir la práctica de la biopsia de protocolo en aquellos pacientes que presenten el alelo T del TGF- β_1 . Con esta estrategia se podría reducir el número de biopsias de protocolo, aunque en un porcentaje importante de los casos (69%) se realizarían sobre injertos sin rechazo subclínico. Por el contrario sólo en unos pocos pacientes no seríamos capaces de diagnosticar precozmente el rechazo subclínico.

DISCUSIÓN

Finalmente la identificación de la isoforma Emk1C ha demostrado ser poco sensible (36%) pero muy específica (95%) de rechazo subclínico, por lo que la probabilidad de falsos positivos es escasa (5%). También presenta un valor predictivo positivo aceptable (88%). Sin embargo en la actualidad se desconoce si las isoformas identificadas en el injerto renal también pueden detectarse en sangre periférica, y sería necesario confirmar la solidez de la asociación en una población más amplia. En el caso que así fuera podría servir de prueba complementaria a la identificación del alelo T del gen del TGF- β_1 para poder diagnosticar el rechazo subclínico sin necesidad de recurrir a la práctica de una biopsia.

VII CONCLUSIONES

- 1. Las biopsias de protocolo permiten reducir el tamaño de la muestra para el estudio de factores de riesgo asociados a la aparición de lesiones.**
- 2. Los pacientes con el alelo T en el codón 10 del gen del TGF- β_1 presentan una mayor incidencia de rechazo subclínico.**

El alelo T del codón 10 del gen del TGF- β_1 del receptor esta independientemente asociado con un aumento en la incidencia del rechazo subclínico. No se ha observado que el alelo T se asocie con un mayor nivel plasmático o tisular de TGF- β_1 en los pacientes trasplantados en el momento de la biopsia de protocolo.

Por otro lado, no se ha encontrado asociación entre los SNPs del codón 10 o 25 y la presencia de NCT en biopsias renales de protocolo practicadas a los 6 meses. Sin embargo lo asociación con la presencia de rechazo subclínico no descarta que a largo plazo pueda producirse un aumento en la incidencia de NCT.

Finalmente proponemos que estos resultados se deberían confirmar en una población más amplia y mediante análisis de la supervivencia antes de poder proponer que a los pacientes con el alelo T del codón 10 del TGF- β_1 un tratamiento inmunosupresor más potente. Además se debería profundizar en el estudio de otros genes que pudieran estar ligados a este SNP para identificar nuevas vías que pudieran tener relevancia en la patogenia de la NCT.

- 3. Los injertos con NCT y genotipo DD del gen de la ECA presentan niveles más elevados de ECA tisular y peor pronóstico.**

El genotipo DD de los receptores de un injerto renal no se asocia a un aumento en la incidencia o prevalencia de la NCT. Sin embargo los pacientes con NCT en la biopsia de protocolo y genotipo DD presentan niveles más elevados del ARN mensajero de la ECA

tisular y un peor pronóstico. En consecuencia sugerimos que los pacientes con genotipo DD y NCT podrían beneficiarse del tratamiento con IECAS o ARAII.

4. La presencia de la isoforma Emk1C del gen Par1/Emk1 se asocia a rechazo subclínico, NCT y a una mayor presión arterial media.

Se ha identificado una nueva isoforma del gen Par1/Emk1 (Emk1C) causada por la expresión del exón 2 que está asociada a un aumento en la incidencia de rechazo subclínico, a una mayor prevalencia de NCT y a una mayor presión arterial media. En consecuencia sugerimos que esta proteína estaría relacionada con la patogenia de la NCT y señalamos el interés de estudiar la vía intracelular controlada por la proteína-quinasa Par1/Emk1 con el fin de encontrar nuevos marcadores moleculares diagnósticos o pronósticos de NCT, o bien identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la NCT.

5. Los polimorfismos de genes fundamentales en las vías moleculares responsables de la NCT como el TGF- β_1 y la ECA, y de otras moléculas menos conocidas como la Par1/Emk1 contribuyen a la variabilidad individual de las lesiones histológicas y del pronóstico del injerto.

6. Los polimorfismos del TGF- β_1 y la Par1/Emk1 podrían ser útiles como marcadores moleculares conjuntos para el diagnóstico precoz de lesiones del aloinjerto renal.

Teniendo en cuenta la sensibilidad de la detección del alelo T del codón 10 del TGF- β_1 y la especificidad de la detección de la isoforma Emk1C para el diagnóstico de rechazo subclínico (en el caso de confirmarse que la isoforma Emk1C también se detecta en los linfocitos obtenidos de sangre periférica), se propone que la determinación de estos polimorfismos permitiría identificar pacientes con un mayor riesgo a presentar rechazo subclínico y podrían sustituir en el futuro la práctica de las biopsias de protocolo.

VIII BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Porter R: Breve Historia de la Medicina: De la antigüedad hasta nuestros días. Ed Santillana Ediciones Generales, S.L, 2003.
2. Watson JD, Crick FH: Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738, 1953.
3. Astbury WT: Molecular biology or ultrastructural biology?. *Nature* 190:1124, 1961.
4. Guttmacher AE, Collins FS: Genomic medicine, a primer. *N Engl J Med* 347:1512-1520, 2002.
5. García Barreno P: Cincuenta años de ADN: La doble hélice. Ed. Espasa-Calpe, 2003.
6. Laín Entralgo P: Historia de la Medicina. Ed Salvat, 1978.
7. Galbraith PA, Prasad C: Sir Archibald Garrod and Alkaptonuria-“story of metabolic genetics”. *Clin Genet.* 68:199-203, 2005.
8. Beadle GW: Genes and chemical reactions in *Neurospora*. Nobel Lecture. 1958.
9. Pauling L, Itano A, Singer SJ, Wells IC: Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110:543-548, 1949.
10. Collins FS: Shattuck Lecture-Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med* 341:28-37, 1999.
11. Housman D: Human DNA polymorphism. *N Engl J Med* 332:318-320, 1995.
12. The International HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299-1320, 2005.
13. Modrek B, Lee C: A genomic view of alternative splicing. *Nature genetics* 30:13-19, 2002.
14. Jonsen AR, Durfy SJ, Burke W, Motulsky AG: The advent of the “unpatients”. *Nature Medicine* 2:622-624, 1990.
15. Jones R: The impact of molecular medicine on health services. *Nature Medicine* 2:959-960, 1990.
16. Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB: Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Br Med J* 4716:1157-1163, 1951.
17. Tilney NL: Transplant: from myth to reality. Ed Yale University Press, New Haven and London, 2003.

BIBLIOGRAFÍA

18. Halloran PF: Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 351: 2715-2729, 2004.
19. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 342:605-612, 2000.
20. Registre de malalts renals de Catalunya. Informe estadistic 2003. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social.
21. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B: Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 4:378-83, 2004.
22. Joosten SA, Sijpkens YWJ, Van Kooten CV, Paul LC: Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 68: 1-13, 2005.
23. Alwall N: Aspiration biopsy of the kidney, including report of a case of amyloidosis diagnosed in 1944 and investigated at autopsy, *Acta Med Scand* 143:430-435, 1952.
24. Iversen P, Roholm K: On aspiration biopsy of the liver, with remarks on its diagnostic significance. *Acta Med Scand* 102:1-16, 1939.
25. Cameron JS, Hicks J: The introduction of Renal Biopsy into Nephrology from 1901 to 1961: A Paradigm of the Forming of Nephrology by Technology. *Am J Nephrol* 17:347-358,1997.
26. Muehrcke RC, Kark RM, Pirani CL: Biopsy of the kidney in the diagnosis and management of renal disease. *N Engl J Med* 253:537-546, 1955.
27. Cozens NJA, Murchison JT, Allan PL, Winney R: Conventional 15 G needle technique for renal biopsy compared with ultrasound-guided spring-loaded 18 G needle biopsy. *Br J Radiol* 65:594-597, 1992.
28. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans JL, Corthouts BL, Bogers JJ, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, Mengel M, Serón D, Moreso F, Cañas C: Protocol biopsy of the stable renal transplant: A multicenter study of methods and complications rates. *Transplantation* 76:969-973,2003.

BIBLIOGRAFÍA

29. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, Hayry 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, Willebrand E, Yamaguchi Y: International standarization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44, 411-422,1993.
30. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y and et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713-23, 1999
31. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickeleit V, Randhawa P, Regele H, Serón D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria. An addition to the Banff'97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3: 708-714, 2003.
32. Serón D, Moreso F, Ramon JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, Bover J, Gil-Vernet S, Castela AM, Alsina J, Grinyó JM: Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69;1849-1855, 2000.
33. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman J: The natural history of Chronic Allograft Nephropathy. *N Eng J Med* 349:2326-2333, 2003.
34. Baboolal K, Jones GA, Janezic A, Griffiths DR, Jurewicz W: Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 61, 686-696, 2002.
35. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, Chapman JR: Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 71:515-523, 2001.

BIBLIOGRAFÍA

36. Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM: Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int* 61: 727-733, 2002.
37. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, Punch JD, Leichtman AB, Magee JC, Port FK, Kaplan B: Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transplantation* 70:1098-1100, 2000.
38. Ratcliffe PJ, Dudley CRK, Higgins RM, Firth JD, Smith B, Morris PJ: Randomised controlled trial of steroids withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet* 348:643-648, 1996.
39. Kreis H, Cisterne JM, Land W, Wramner L, Squifflet JP, Abramowicz D, Campistol JM, Morales JM, Grinyó JM, Mourad G, Berthoux FC, Brattstrom C, Lebranchu Y, Vialtel P: Sirolimus in association with mycophenolate mofetil induction for the prevention of acute graft rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 69:1252-1260, 2000.
40. Tran HT, Acharya MK, McKay DB, Sayegh MH, Carpenter CB, Auchincloss H JR, Kirkman RL, Milford EL: Avoidance of cyclosporine in renal transplantation: effects of daclizumab, mycophenolate mofetil and steroids. *J Am Soc Nephrol* 11:1903-1909, 2000.
41. Gauthier P, Helderma JH: Cyclosporine avoidance. *J Am Soc Nephrol* 11:1933-1936, 2000.
42. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanche G, Lang P, Grinyó J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B; Belatacept Study Group: Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 353: 770-781, 2005.
43. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik D, Magee JC, Wolfe RA, Agodoa LY, Kaplan B: Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 69:2405-2409, 2000.
44. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ: Chronic Renal Allograft Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 16: 3015-3026, 2005.

BIBLIOGRAFÍA

45. Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM: Twelve Years' experience with National Sharing of HLA-Matched Cadaveric Kidneys for transplnatation. *N Engl J Med* 343: 1078-1084, 2000.
46. Paul LC: Immunological Risk Factors for Chronic Renal Allograft Dysfunction. *Transplantation* 71 Suppl : 17-23, 2001.
47. Matas AJ, Frey DJ, Gillingham KJ, Noreen HJ, Reinsmoen NL, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS: The impact of HLA matching on graft survival and on sensitization after a failed transplant. Evidence that failure of poorly matched renal transplants does not result in increased sensitization. *Transplantation* 50:599-607, 1990.
48. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, Fulladosa X, Torras J, Carrera M, Grinyó JM, Alsina J: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51:310-316, 1997.
49. Opelz G; Collaborative Transplant Study: Non-HLA transplantation immunity by lymphocitotoxic antibodies. *Lancet* 365: 1570-1576, 2005.
50. Susal C, Opelz G: Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Hum Immunol* 65: 810-816,2004.
51. Susal C, Opelz G: Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 73: 1269-1273, 2002.
52. Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S ,Toma H, Ota K: Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 63:1616-1619, 1997.
53. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, Valeri M, Torlone N, Adorno D, Casciani CU: Impact of donor specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 71:1106-1112, 2001.
54. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosim AA, Schneeberger EE, Covin RB: Chronic humoral rejection: identification of antibody mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 12:574-582, 2001.

BIBLIOGRAFÍA

55. Regele H, Bohming GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, Watschinger B, Kerjaschki D, Exner M: Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13:2371-2380, 2002.
56. Supon P, Constantino D, Hao P, Cagle L, Hahn A, Conti DJ, Freed BM: Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. *Transplantation* 71:577-580,2001.
57. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A, Lei HY: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74:1192-1194,2002.
58. Abramowicz D, Del Carmen Rial M, Vitko S, del Castillo D, Manas D, Lao M, Gafner N, Wijngaard P. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *J Am Soc Nephrol* 16:2234-2240, 2005.
59. Kasike BL, Chakkerla HA, Louis TA, Ma JZ. A meta-analysis of immunosuppression withdrawal trials in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 11:1910-1917, 2000.
60. De Geest S, Borgermans L, Gemoets H, Abraham I, Vlamincck H, Evers G, Vanrenterghem Y: Incidence, determinants, and consequences of subclinical noncompliance with immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. *Transplantation* 59:340-347, 1995.
61. Oppenheimer F, Aljama P, Asensio-Peinado C, Bustamante-Bustamante J, Crespo-Albiach JF, Guirado-Perich L: The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 19 (Suppl):11-15, 2004.
62. De Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, Paul LC: Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 12:1538-1546,2001.

BIBLIOGRAFÍA

63. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, Hanson JA, Leichtman AB, Magee JC, Port FK, Kaplan B: Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 70:306-310, 2000.
64. Kim YS, Moon JI, Kim DK, Kim SI, Park K: Ratio of donor kidney weight to recipient body weight as an index of graft function. *Lancet* 357:1180-1181, 2001.
65. Moreso F, Serón D, Anunciada AI, Hueso M, Ramón JM, Fulladosa X, Gil-Vernet S, Alsna J, Grinyó JM: Recipient body surface area as a predictor of posttransplant renal allograft evolution. *Transplantation* 65:671-676, 1998.
66. Zeier M, Dohler B, Opelz G, Ritz E: The effect of donor gender on graft survival. *J Am Soc Nephrol* 13:2570-2576, 2002.
67. USRDS. Atlas of ESRD in the United States. *Am J Kidney Dis* 4:S117-S134, 2001.
68. Solez K, Vincenti F, Filo RS: Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 66:1736-1740, 1998.
69. Opelz G, Wujciak T, Ritz E: Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure: Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 53:217-222, 1998.
70. Kew CE, Curtis JJ : Hypertension after renal transplantation. *Graft* 3:172-175, 2000.
71. Wissing KM, Abramowicz D, Broeders N, Vereerstraeten P: Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by chronic rejection in male patients with previous acute rejection. *Transplantation* 2000 70:464-472, 2000.
72. Cristol JP, Vela C, Maggi MF, Descomps B, Mourad G: Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection. *Transplantation* 65:1322-1328, 1998.
73. Orth SR, Ritz E, Schrier RW: The renal risks of smoking. *Kidney Int* 51:1669-1677, 1997.

BIBLIOGRAFÍA

74. Winkelmayr WC, Kramar R, Curhan GC, Chandraker A, Endler G, Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G: Fasting plasma total homocysteine levels and mortality and allograft loss in kidney transplant recipients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 16:255-260, 2005.
75. Hansson GK: Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 352: 1685-1695, 2005.
76. Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, Kauppinen H, Saarinen O, Bruggeman C, Ahonen J: Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat. *Transplantation* 64:391-398, 1997.
77. Remuzzi G, Bertani T: Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339:1448-1456, 1998.
78. Paul LC: Chronic allograft nephropathy-a model of impaired repair from injury. *Nephrol Dial Transplant* 15:149-151,2000.
79. Thomas JM, Eckhoff DE, Contreras JL, Lobashevsky AL, Hubbard WJ, Moore JK, Cook WJ, Thomas FT, Neville DM Jr: Durable donor-specific T and B cell tolerance in rhesus macaques induced with peritransplantation anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin: absence of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69: 2497-2503, 2000.
80. Koch M, Joosten SA, Mengel M, van Kooten C, Paul LC, Nashan B: Adoptive transfer of primed CD4+ T-lymphocytes induces pattern of chronic allograft nephropathy in a nude rat model. *Transplantation* 79: 753-761, 2005.
81. Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, Lloberas N, Alsina J, Grinyó JM: Do Alloreactivity and Prolonged Cold Ischemia Time Cause Different Elementary Lesions in Chronic Allograft Nephropathy?. *Am J Pathol* 162: 127-137, 2003.
82. Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL: Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* 114:954-955, 1991.

BIBLIOGRAFÍA

83. Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Saidman SL, Sackstein R, McAfee S, Dey B, Colby C, Cosimi AB: Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 74:1405-1409, 2002.
84. Barber WH, Mankin JA, Laskow DA, Deierhoi MH, Julian BA, Curtis JJ, Diethelm AG: Long-term results of a controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 51:70-75, 1991.
85. Ciancio G, Miller J, Garcia-Morales RO, Carreno M, Burke GW 3rd, Roth D, Kupin W, Tzakis AG, Ricordi C, Rosen A, Fuller L, Esquenazi V: Six-year clinical effect of donor bone marrow infusions in renal transplant patients. *Transplantation* 71:827-835, 2001.
86. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, Hong X, Thomas D, Fechner JH Jr, Knechtle SJ: CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8789-8794, 1997.
87. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T: Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39:550-556, 1991.
88. Border WA, Noble NA: Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 331:1286-1292, 1994.
89. Muller GA, Rodemann HP: Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17:680-683, 1991.
90. Rodemann HP, Muller GA: Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidney with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17:684-686, 1991.
91. Gibbs SR, Goins RA, Belvin EL, Dimari SJ, Merriam AP, Bowling-Brown S, Harris RC, Haralson MA: Characterization of the collagen phenotype of rabbit proximal tubule cells in culture. *Connect Tissue Res.* 40:173-188, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

92. Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF, Hudson JK, Hudson BG: Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int* 52:1302-1312, 1997.
93. Paul L.C: Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int.* 56: 783-793, 1999.
94. Liu K, Moliterno RA, Qian J, Attfield D, Valdivia L, Duquesnoy RJ: Role of heat shock proteins in heart transplant rejection. *J Heart Lung Transplant* 15:222-228, 1996.
95. Strutz F, Müller GA: Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1729-1731, 2000.
96. Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 10:167-181, 1999.
97. Cruzado JM, Torras J, Riera M, Herrero I, Hueso M, Espinosa L, Condom E, Lloberas N, Bover J, Alsina J, Grinyó JM: Influence of nephron mass in development of chronic renal failure after prolonged warm renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279:259-269, 2000.
98. Mackenzie HS, Azuma H, Rennke HG, Tilney NL, Brenner BM: Renal mass as a determinant of late allograft outcome: insights from experimental studies in rats. *Kidney Int Suppl.* 52:S38-42, 1995.
99. Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC: Antihypertensive drug treatment in chronic allograft rejection in the rat. Effect on structure and function. *Transplantation* 62:1634-1642, 1996.
100. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor β in human disease. *N Eng J Med* 342:1350-1358, 2000.
101. Massagué J : TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791, 1998.
102. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB: Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci* 116: 217-224, 2003
103. Blakytyn R, Ludlow A, Martin GE, Ireland G, Lund LR, Ferguson MW, Brunner G: Latent TGF-beta1 activation by platelets. *J Cell Physiol* 199:67-76, 2004.
104. Pankewycz OG: Transforming growth factor- β and renal graft fibrosis. *Curr Opin Org Transplant* 5:336-342, 2000.

BIBLIOGRAFÍA

105. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS: Hepatic expression of mature transforming growth factor β_1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92 :2572-2576, 1995.
106. Shull M, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β_1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359 : 693-9. 1992.
107. Kitamura M, Sütö TS: TGF- β and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus prosclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant* 12:669-679, 1997.
108. Jain S, Furness PN, Nicholson ML. The role of Transforming growth factor beta in chronic renal allograft nephropathy. *Transplantation* 69:1759-1766.
109. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, Bush HL Jr: Decreased type II/Type I TGF- β receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions: conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF- β_1 . *J Clin Invest* 96:2667-2675, 1995.
110. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC: Tamoxifen elevates transforming growth factor- β and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1:1067-1073, 1995
111. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL Jr: Genomic instability in the type II TGF- β_1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 100:2182-2188, 1997.
112. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS: Transgenic mice with increased plasma levels of TGF- β_1 develop progressive renal disease. *Lab. Invest.* 74:991-1003, 1996.
113. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92:2597-,1993.

BIBLIOGRAFÍA

114. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. Inhibition of TGF-beta1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 50:148-155, 1996.
115. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA: Sustained expression of TGF-beta 1 underlines development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 45:916-927, 1994.
116. Nagano H, Nedeau KC, Takada M, Kusaka M, Tilney: Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation* 63:1101-1108, 1997.
117. Eikmans M, Sijpkens YW, Bealde HJ, de Heer E, Paul LC, Bruijin JA: High transforming growth factor-beta and extracellular matrix mRNA response in renal allografts during early rejection is associated with absence of chronic rejection. *Transplantation* 73:573-579, 2002.
118. Jansens K, Gershoni B, Guañabens N, Migone N, Ralston S, Bonduelle M, Lissens W, Van Maldergem, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Van Hul W: Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet* 26:273-275, 2000.
119. Sparkes RS, Graham CB: Camurati-Engelmann disease. Genetics and clinical manifestations with a review of the literature. *J. Med. Genet.* 9: 73-85, 1972.
120. Sharma VK, Bologa RM, Xu G-P, Li B, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao V, and Suthanthiran M: Intra-graft TGF-beta1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49: 1297-1303, 1996
121. Waltenberger J, Akyurek ML, Aurivillius M, Wanders A, Larsson E, Fellstrom B, Funa K: Ischemia-induced transplant arteriosclerosis in the rat. Induction of peptide growth factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:1516-23, 1996.
122. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y, Weffer MI. Expression of TGF-beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 50:1904-, 1996.
123. Mannon RB, Kopp JB, Ruiz P, Griffiths R, Bustos M, Platt JL, Klotman PE, Coffman TM: Chronic rejection of mouse kidney allografts. *Kidney Int* 55:1935, 1999.

BIBLIOGRAFÍA

124. Lantz I, Dimény E, Larsson E, Fellstrom B, Funa K: Increased immunoreactivity of transforming growth factor-beta in human kidney transplants. *Transpl Immunol* 4: 209-214, 1996
125. Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Gold LI, Border WA: Transforming growth factor- β_1 and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 6:286-294, 1995
126. Horvath LZ, Friess H, Schilling M, Borisch B, Deflorin J, Gold LI, Korc M, Buchler MW: Altered expression of transforming growth factor betas in chronic renal rejection. *Kidney Int* 50 : 489-498, 1996.
127. Aros C, Remuzzi G: The renin-angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *J Hyperten* 20 (suppl 3):S45-S53, 2002.
128. Taal MW, Brenner B: Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57: 1803-1817, 2000.
129. Navar L: The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Kidney Int* 65:1522-1532, 2004.
130. Klahr S, Morrissey J: Angiotensin II and Gene Expression in the Kidney. *Am J Kidney Dis* 31:171-176, 1998.
131. Schieppati A, Remuzzi G: The future of renoprotection: Frustration and promises. *Kidney Int* 64:1947-1955, 2003
132. Okada H, Danoff T, Kalluri R, Neilson E: Early role of Fsp 1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273:F563-F574, 1997.
133. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Richard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359:641-644, 1992.
134. Powell JS, Clozel JP, Muller RKM, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245:186-188, 1989.

BIBLIOGRAFÍA

135. Stingant CE, Cohen J, Vivera M, Zaltzman JS : ACE inhibitors and angiotensina II antagonist I renal transplantation: An analysis of safety and efficacy. *Am J Kidney Dis* 35:5863, 2000.
136. Lin J, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD, Cohen DJ, Radhakrishnan J: Angiotensin converting enzyme inhibition in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 73:783-788, 2002.
137. Hurov JB, Stappenbeck TS, Zmasek CM, White LS, Ranganath SH, Russell JH, Chan AC, Murphy KM, Piwnicka-Worms H: Immune system dysfunction and autoimmune disease in mice lacking Emk (Par-1) protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3206-19, 2001.
138. Espinosa L, Navarro E: Human serine/threonine protein kinase EMK1: genomic structure and cDNA cloning of isoforms produced by alternative splicing. *Cytogenet. Cell Genet.* 81: 278-82. 1998.
139. Bohm H, Brinkmann V, Drab M, Henske A, Kurzchalia TV: Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are asymmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr. Biol.* 7: 603-6, 1997.
140. Shulman JM, Benton R, Johnston D: The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 191:377-388, 1998.
141. Derynck R, Rhee L, Chen EY, Van Tilburg A: Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic Acid Res.* 15: 3188-3189, 1987.
142. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, Poirier O: Polymorphisms of the transforming growth factor- β_1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de L'Infarctus du Myocarde (ECTIM) study. *Hypertension* 28:881-7, 1996.
143. Pociot F, Hansen PM, Karlsen AE, Langdahl BL, Johannesen J, Nerup J: TGF- β_1 Gene Mutations in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:2302-2307, 1998.

BIBLIOGRAFÍA

144. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD: Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet* 8 (1):93-97,1999.
145. Janssens K, ten Dijke P, Ralston SH, Bergmann C, Van Hul W: Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *J Biol Chem.* 278:7718-7724, 2003.
146. Awad M, El-Gamel A, Hasleton P, Turner D, Sinnott P, Hutchinson I: Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene. *Transplantation* 66: 1014-1020, 1998.
147. Suthanthiran M, Li B, Song JO, Ding R, Sharma VK, Schwartz JE, August P: Transforming growth factor- β 1 hyperexpression in African.American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3479-3484, 2000.
148. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K: Association of a Polymorphism of the Transforming Growth Factor- β 1 Gene with Genetic Susceptibility to Osteoporosis in Postmenopausal Japanese Women. *J Bone Miner. Res.* 13:1569-1576, 1998.
149. Sugiura Y, Niimi T, Sato S, Yoshinouchi T, Banno S, Naniwa T, Maeda H, Shimizu S, Ueda R: Transforming growth factor- β 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 61:826-828, 2002.
150. Buckwalter MS, Wyss-Coray T: Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo. *J Neuroinflammation* 1: 10, 2004.
151. Chan CC, Reed GF, Kim Y, Agron E, Buggage RR: A correlation of pregnancy term, disease activity, serum female hormones, and cytokines in uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 88:1506-1509, 2004.

BIBLIOGRAFÍA

152. Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, de Rave S, Kwekkeboom J, Ijzermans JN, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouma GJ: Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. *Liver Transpl* 8:603-611, 2002.
153. Warlé MC, Metselaar HJ, Hop WCJ, Tilanus HW: Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection: A meta-analysis. *Liver Transpl* 11:19-26, 2005.
154. Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, Muehrer R, Lorentzen D, Kleiner D, Becker YT, Hullett DA, Mannon R, Kirk AD, Becker BN: Donor genomics influence graft events: The effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 66:1686-1693, 2004.
155. Tinckam K, Rush D, Hutchinson I, Dembinski I, Pravica V, Jeffery J, Nickerson P: The relative importance of Cytokine Gene Polymorphisms in the Development of Early and Late Acute Rejection and Six-Month Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 79:836-841, 2005.
156. Alakulppi NS, Kyllonen LE, Jantti VT, Matinlauri IH, Partanen J, Salmela KT, Laine JT: Cytokine Gene Polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 78:1422-1428, 2004.
157. Bijlsma FJ, Van der Horst AA, Tilanus MG, Rozemuller E, de Jonge N, Gmelig-Meyling FH, de Weger RA: No association between transforming growth factor beta gene polymorphism and acute rejection after cardiac transplantation. *Transpl Immunol* 10:43-47, 2002.
158. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR: Gene Modifier Study Group: Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353:1443-1453, 2005.
159. Coll E, Cormand B, Campos B, González-Núñez D, Iñigo P, Botey A, Poch E: Association of TGF-beta 1 polymorphisms with chronic renal disease. *J Nephrol* 17: 794-799, 2004.

BIBLIOGRAFÍA

160. Lim CS, Kim YS, Chae DW, Ahn C, Han JS, Kim S, Lee JS, Kim IS: Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with susceptibility to and progression of IgA nephropathy. *Clin Nephrol.* 63:61-67, 2005.
161. Melk A, Henne T, Kollmar T, Strehlau J, Latta K, Offner G, Jhangri GS, Ehrich JH, Von Schnakenburg C: Cytokine single nucleotide polymorphism and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. *Kidney Int.* 64:314-320, 2003.
162. Iñigo P, Lario S, Campistol JM, Bescos M, Campos B, Oppenheimer F: Role of transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms in the development of chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients. *Nefrologia* 23:312-320, 2003.
163. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 266:15377-15383, 1991.
164. Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F: Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 51:1041-1045, 1989.
165. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86:1343-1346, 1990.
166. Amant C, Bauters C, Bodart JC, Lablanche JM, Grollier G, Danchin N, Hamon M, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Amouyel P, Bertrand ME: D allele of the angiotensin I-converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 94:1247-1254, 1996.
167. Crisan D, Carr J: Angiotensin I-Converting Enzyme: genotype and Disease Associations. *J Mol Diagnostics* 2: 105-115, 2000.
168. Lindpainter K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stamfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH: A prospective evaluation of an angiotensin converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332:706-711, 1995.

BIBLIOGRAFÍA

169. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A: ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: Meta-analysis of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:484-492, 2000.
170. Harden PN, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RS, Junor BJ, Briggs JD, Connell JM, Jardine AG: Polymorphisms in the angiotensin-converting enzyme and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345: 1540-1542, 1995.
171. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holamans P, Coles GA, Williams JD: Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 52:607-613, 1997
172. Jacobsen P, Tarnow L, Cartensen B, Hovind P, Poirer O, Parving H: Genetic variation in the Renin-Angiotensin System and progression of Diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:2843-2850, 2003.
173. Gonzalo A, Telleria D, San Millan JL, Ortuño J: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and antiproteinuric response to renoprotective therapy. *Nephrol Dial Transplant* 13:1050-1051, 1998.
174. Van Essen GG, Rensma PL, de Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ, de Jong PE: Association between Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 347:94-95, 1996.
175. Abdi R, Huong T, Zee R, Brenner B, Milford E: Angiotensin gene polymorphism as a determinant of posttransplantation renal dysfunction and hypertension. *Transplantation* 72:726-729, 2001.
176. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, Tegzess AM, Zeeuw D, De Jong P: Risk factors for long-term Renal survival after Renal transplantation: A role for Angiotensin-converting Enzyme (Insertion/Deletion) Polymorphism?. *J Am Soc Nephrol* 9: 2075-2081, 1998
177. Barocci S, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Nocera A: Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients. *Transplantation* 67:534-538, 1999

BIBLIOGRAFÍA

178. Beige J, Scherer S, Weber A, Engeli S, Offermann G, Opelz G, Distler A, Sharma AM: Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 8: 1319-1323, 1997
179. Beige J, Offermann G, Distler A, Sharma AM: Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype and long term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 13: 735-738, 1998
180. Serón D, Moreso F, Grinyó JM: Prevention and management of late renal allograft dysfunction. *J Nephrol* 14: 71-79, 2001.
181. Furness PN, Taub N: Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney Int.* 60: 1998-2012, 2001.
182. Moreso F, Lopez M, Vallejos A, Giordani C, Riera L, Fulladosa X, Hueso M, Alsina J, Grinyó JM, Serón D: Serial protocol biopsies to quantify the progression of chronic transplant nephropathy in stable renal allografts. *Am J. Transplant* 1:82-88, 2001.
183. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 59: 511-4, 1995.
184. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, Rush D: Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 9: 482-7, 1998.
185. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, Trpkov K, Solez K, Jeffery J: Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 2129-34, 1998.
186. Minguillón J, Moracho B, Kim SJ, López-Botet M, Aramburu J: Concentrations of cyclosporine A and FK506 that inhibit IL-2 induction in human T cells do not affect TGF- β_1 biosynthesis, whereas higher doses of cyclosporin A trigger apoptosis and release of preformed TGF- β_1 . *J Leukoc Biol* 77:748-758, 2005.

BIBLIOGRAFÍA

187. Mytilineos J, Laux G, Opelz G: Relevance of IL10, TGF β 1, TNF α and IL4R α Gene Polymorphisms in Kidney Transplantation: A Collaborative Transplant Study Report. *Am. J. Transplant.* 4:1684-1690, 2004.
188. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, Hataya H, Ikeda M, Honda M, Hasegawa A: The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 14:1046-1052, 2003.
189. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, Moon IS, Kim SY, Koh YB, Bang BK, Yang CW: Clinical Significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: Ten-year experience at a single center. *Am J Transplant* 5:1354-1360, 2005.
190. Schmidt S, Strojek K, Grzeszczak W, Bergis K, Ritz E, and Diabetic Nephropathy Study Group: Excess of DD homozygotes in haemodialysed patients with type II diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 12, 427-429, 1997.
191. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F: Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am. J Hum Genet* 51:197-205, 1992.
192. Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Iwamoto M, Miyagi M, Sakai K, Aikawa A, Ohara T, Yamada K, Shimatake H, Hasegawa A: Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int.* 60:1124-1130, 2001.
193. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhec-Gelas F: Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 290:33-40, 1993.
194. Lagaaij E, Cramer-Knijnenburg G, Van Kemenade F, Van Es L, Brujin J, Van Krieken J: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357:33-37, 2001.
195. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA: Bone marrow contributes to renal turnover and regeneration. *J Pathol* 195:229-235, 2001.

BIBLIOGRAFÍA

196. Cornacchia F, Fornoni A, Plati AR, Thomas A, Wang Y, Inverardi L, Striker LJ, Striker GE: Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors. *J Clin Invest* 108:1649-1656, 2001.
197. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, Rush DN: Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 66: 1673-81, 1998.
198. Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, Radke NF, Pirsch JD, Sollinger HW: Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 68: 1578-82, 1999.
199. Caceres JF, Kornblihtt AR: Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 18: 186-93, 2002.
200. Smith CW, Valcarcel J: Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 25: 381-8, 2000.

IX GLOSARIO DE TÉRMINOS

Animales transgénicos.

Mediante esta tecnología se intenta deducir la función de un determinado gen, observando que consecuencias tiene para el animal (transgénico) que ese gen haya sido modificado.

Existen 3 tipos de animales transgénicos:

- 1) Aquellos que reciben un material genético que no pertenece a esa especie animal.
- 2) Aquellos en los que se modifica un gen concreto. Esta modificación bien puede ser en forma de eliminación (de una parte o de la totalidad de un gen) o de alteración (fusionando fragmentos de ADN que habitualmente no están próximos en el genoma del animal o que incluso no pertenecen a esa especie). Estos animales que poseen y transmiten a su descendencia una modificación genética, se les llama mutantes, aunque frecuentemente se les denomina utilizando el término anglosajón “Knock-out” que significa noqueo o inactivación de un determinado gen.
- 3) Los animales obtenidos a partir de embriones reconstruidos mediante transferencia nuclear, y que se denominan clónicos.

Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Es un modelo teórico para el estudio de la genética de poblaciones. El objeto de la Genética de Poblaciones es el estudio del conjunto de los alelos presentes en cada uno de los locus, sus respectivas frecuencias y la predicción de los cambios que sufrirán por efecto de la selección natural.

Se basa en el modelo propuesto en 1908 de forma independiente por Godfrey Harold Hardy y Wilhelm Weinberg que se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Por ejemplo, si consideramos en una población los alelos A1 y

A2, donde p es la frecuencia del alelo A1 ($0 \leq p < 1$), q es la frecuencia del alelo A2 ($0 \leq q < 1$), y $p+q=1$. Considerando unas frecuencias alélicas iguales para ambos sexos, tendremos en la generación siguiente: $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1$, donde: p^2 =frecuencia del genotipo A1 (A1 homocigoto), $2pq$ =frecuencia del genotipo A1A2 (heterocigoto), y q^2 =frecuencia del genotipo A2 (A2 homocigoto). Estas frecuencias se mantienen constantes de generación en generación.

El concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis:

1. Existe panmixia, es decir, en cada caso la probabilidad de aparear con un individuo X es igual a la frecuencia de X en la población (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar).
2. Las generaciones son discretas, esto es, que los adultos se reproducen una vez y desaparecen.
3. La frecuencia alélica es igual en ambos sexos.
4. La población es suficientemente grande como para minimizar las diferencias existentes entre los individuos, es decir no hay deriva genética.
5. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay cambios de las frecuencia génicas, que se mantienen constantes de generación en generación).

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio, y respecto a un locus autosómico, bialélico (A1 y A2) la formación de cigotos equivale a la unión de los gametos al azar

Las consecuencias que se pueden extraer de la ley de Hardy-Weinberg son las siguientes:

1. Independientemente que estemos en una situación sujeta al equilibrio de Hardy-Weinberg o no, las frecuencias de genotipos (Ejemplo en el caso del

GLOSARIO

codón 10 del TGF- β_1 : CC, CT, TT) pueden ser usadas para calcular la frecuencia de los alelos (C,T), según la siguiente formula : $C=CC+CT/2$, $T=TT+CT/2$.

2. Mientras que, sí y sólo sí estamos sujetos al equilibrio de Hardy-Weinberg, las frecuencias de genotipos pueden ser calculadas desde las frecuencias alélicas, a partir de las formulas $CC=C^2$, $CT=2CT$, $TT=T^2$.
3. Las relaciones de dominancia entre alelos no tienen efecto sobre el cambio en las frecuencias de alelos.
4. Las frecuencias de alelos permanecen estables con el paso del tiempo, del mismo modo que la frecuencia de genotipos.
5. La segregación mendeliana al azar de los cromosomas preserva la variabilidad genética de las poblaciones.
6. Ya que “la evolución” se define como un cambio en las frecuencias de alelos, una población ideal diploide no evoluciona.
7. Solamente las violaciones en las propiedades de una población ideal (mutaciones) es lo que permite que el proceso de evolución se lleve a cabo.

La aproximación práctica a un problema siempre es la misma

1. Calculamos las frecuencias de los genotipos observados (Ejemplo. $CC=0,23$; $CT=0,43$; $TT=0,34$).
2. Calculamos las frecuencias de los alelos con la formula ($C=CC+CT/2$, $T=TT+CT/2$).
3. Calculamos las frecuencias teóricas de genotipos de acuerdo con el modelo de Hardy-Weinberg mediante la formula ($CC=C^2$, $CT=2CT$, $TT=T^2$), considerando que estamos ante una población en equilibrio (Proporciones teóricas).
4. Comparamos las proporciones observadas con las teóricas mediante el test de chi cuadrado. Si las diferencias son significativas significa que la población

no esta en equilibrio, bien por la existencia de consanguinidad, por mutaciones, o por un sesgo de selección. Es decir, el equilibrio de Hardy-Weinberg constituye la hipótesis nula de la genética de poblaciones.

Haplotipo.

Segmento de ADN que contiene varios genes o marcadores genéticos que, por su proximidad, se heredan juntos, en bloque.

Polimorfismo génico.

Término definido por Ford en 1940 (E.B. Ford. "Polymorphism and taxonomy", en *New Systematics* (ed. J.S. Huxley), Clarendon Press, Oxford,1940). Se define como la aparición de dos o más tipos de un gen, de tal modo que la variedad más infrecuente no se puede mantener en la especie a través de una mutación periódica. Para que un gen sea polimórfico, la frecuencia del alelo más común debe ser inferior al 99%, en caso contrario se definiría como mutación periódica. Los polimorfismos reflejan mutaciones del pasado, por lo que dos individuos que comparten un mismo alelo tienen una herencia evolutiva común. Se suelen clasificar en: Polimorfismos de secuencia (SNPs) y Polimorfismos de longitud.

-Polimorfismos de secuencia. Conocidos como SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms o polimorfismos nucleotídicos singular). Están producidos por el cambio de un nucleótido en una secuencia de ADN, y son la base principal de la variación genética. Es el tipo de polimorfismo que encontramos en el *TGF-β₁*.

-Polimorfismos de longitud. Producidos por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Este tipo de polimorfismo es el que se observa más frecuentemente en el ADN repetitivo nuclear, que a su vez puede ser clasificado en ADN repetido en tándem y ADN repetitivo disperso, teniendo en cuenta tanto su disposición a lo largo del genoma como el tamaño de la unidad de repetición. Dentro del ADN repetitivo disperso se encuentra el tipo SINE (Short Interspersed Nuclear Elements), siendo la familia Alu la más importante. Los polimorfismos de la ECA se encuentran en este grupo.

GLOSARIO

SNP (“Single nucleotide polymorphism” o polimorfismos nucleotídicos simples).

Son polimorfismos de secuencia, y están producidos por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN.

X AGRADECIMIENTOS
