

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS

Programa de Doctorado: UROLOGÍA Y TRASPLANTE RENAL

**TESIS DOCTORAL**

**EXPRESIÓN DEL *TRANSFORMING GROWTH FACTOR*  $\beta 1$   
EN EL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN  
EN UN MODELO DE TRASPLANTE EXPERIMENTAL  
A CORAZÓN PARADO EN CERDO**

Tesis presentada por el Licenciado

**Francisco Diogo Rios Mendes,**

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores: Dr. Ricardo Alvarez-Vijande y Dr. Antonio Alcaraz

Barcelona, Octubre de 2001

José Ricardo Alvarez-Vijande García, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas de la Universidad de Barcelona, y

Antonio Alcaraz Asensio, Adjunto del Servicio de Urología y Trasplante Renal de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN,

Que la tesis doctoral “**EXPRESIÓN DEL *TRANSFORMING GROWTH FACTOR  $\beta$ 1* EN EL SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN UN MODELO DE TRASPLANTE EXPERIMENTAL A CORAZÓN PARADO EN CERDO**”, presentada por el Licenciado Francisco Diogo Rios Mendes, ha sido realizada bajo su dirección.

Y tras valorar el trabajo realizado por el aspirante al título de doctor,

AUTORIZAN,

Su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente.

En Barcelona, a 12 de Octubre de 2001.

Fdo.: Ricardo Alvarez-Vijande

Fdo.: Antonio Alcaraz

## DEDICATORIA

A los enfermos, objetivo de este estudio.

A los donantes de órganos y sus familias, porque de su dolor nace la esperanza.

A mis padres, Flora y Francisco por su estímulo y apoyo.

A Rosa, por su incentivo y participación.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. Dr. Pablo Carretero González**, catedrático de urología de la Universidad de Barcelona, por confiar en mi trabajo.

Al **Dr. Antonio Alcaraz Asensio**, codirector de la tesis, por su labor, empeño, y dedicación, y por haber sido un estímulo constante en mi trabajo de investigación.

Al **Prof. Dr. Ricardo Alvarez-Vijande**, director de la tesis, por su trabajo y dedicación a la investigación.

Al **Dr. Pablo Iñigo**, nefrólogo del Servicio de Nefrología del Hospital Clínico de Zaragoza, por su valiosa ayuda y labor en el diseño y corrección de esta tesis.

Al **Sr. Sergio Lario**, biólogo molecular del Laboratorio Hormonal del Hospital Clínic de Barcelona, por su ayuda en la extracción del TGF- $\beta$ 1 mRNA.

A La **Dra. Purificación Calatrava**, médica anestesióloga del Servicio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona, que con su energía y entusiasmo siempre me estimuló a perseverar y a aprender más de la investigación.

A la **Dra. Pilar Luque**, médica del Servicio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona, amiga y compañera de tantas alegrías y de mucho trabajo.

Al **Dr. Josep Alcoberro**, médico del Servicio de Urología del Hospital de La Seu d'Urgell, amigo y compañero de alegrías, problemas y de mucho trabajo.

Al **Prof. Dr Josep María Campistol**, adjunto e investigador de la Unidad de Trasplante Renal del Hospital Clínic de Barcelona, por obtener el apoyo económico que financió la extracción del TGF- $\beta$ 1 mRNA.

A la **Sra. Cristina Coder**, secretaria del Servicio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona, por su eficiencia y dedicación en la resolución de los problemas administrativos.

A la **Dra. Anna Agud Pique** y a los **Drs. Nicolás Heredia, Francisco Jesús Crisol Calatrava** y **Ángel Ruiz**, integrantes del equipo de investigación que hizo posible este trabajo, por su amistad, dedicación y trabajo duro.

Al **Sr. Jordi Real Gatius**, estadístico del Servicio de Epidemiología del Hospital Parc Tauli en Sabadell, por la paciencia y profesionalismo puestos en el análisis estadístico de esta tesis.

A la **Dra. Carmen Cleries Parareda** y a la responsable del Servicio de Estabulari de la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona **Dra. América Jiménez**, por proporcionarme las instalaciones donde se desarrolló gran parte del trabajo de investigación.

A la **Dra. Montserrat Elena**, del Servicio de Bioquímica del Hospital Clínic de Barcelona, por su apoyo en el análisis de las muestras recogidas durante el estudio experimental.

Al **Dr. Xavier Farré**, por su trabajo en el análisis e interpretación histológica de las muestras recogidas durante el estudio experimental.

A los **Drs. Agustín Franco, Alfredo Cetina, Ignacio Carretero y Santiago Capdevila**, compañeros urólogos del Servicio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona, por su aprecio y consideración para conmigo.

Al **Prof. Dr. Juan Alcover García** y al **Prof. Dr. Roberto Talbot-Wright** que como Jefes del Servicio de Urología del Hospital Clínic de Barcelona, no ahorraron esfuerzos en resolver las cuestiones referentes a mi estancia en este servicio.

A todos los compañeros Adjuntos y Residentes del Servicio de Urología y otros Servicios del Hospital Clínic de Barcelona y a todos aquellos que con su sincero compañerismo colaboraron en hacer más fácil mi estancia y la realización de esta tesis.

A la **Srta. Noelia Vera Pons** y a la **Srta. Montse Muñoz Serrano** por su ayuda en la corrección de los manuscritos.

A **Dña. Isabel Tendero Mira**, a la **Srta. Anna Vázquez Tendero**, a la **Sra. Teresa Vázquez Tendero** y al Centre Espirita Amalia Domingos Soler por todo el cariño y el constante apoyo recibidos.

A **Dña. María Ramona Hita Ros**, a **Dña. Florencia Hita Ros** y a toda la familia Hita por el cariño, amparo y atención que me han ofrecido tras habernos reencontrado como si nada después de 60 años.

A la Fundación **CAPES**, a la Consejería de Salud de Brasíliá – **SES/DF**, a la Universidad de Brasíliá – **FuB/UnB** por el apoyo financiero recibido, para la realización de este trabajo.

Para cada cosa hay una sazón oportuna y un tiempo apropiado para cada propósito  
bajo el cielo: tiempo de nacer y de morir, de plantar y de arrancar lo plantado.

Eclesiástico III: 1-2

(...) Eterna é a flor que se fana  
se soube florir  
é o menino recém-nascido  
antes que lhe dêem nome  
e lhe comuniquem o sentimento do efêmero  
é o gesto de enlaçar e beijar  
na visita do amor às almas  
eterno é tudo aquilo que vive uma fração de segundo  
mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força o resgata (...)

Carlos Drummond de Andrade

- Muchos son los andantes -dijo Sancho.

- Muchos -respondió don Quijote-, pero pocos los que merecen nombre de caballeros.

Miguel de Cervantes Saavedra

## **ÍNDICE**



## ÍNDICE

<b>TABLA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>18</b>
<b>1. Breve historia del trasplante renal</b>	<b>19</b>
Homotrasplante renal humano	23
Descubrimientos iniciales en el campo de la inmunología del trasplante	28
<b>2. Trasplante de órganos en España</b>	<b>29</b>
<b>3. La obtención de órganos para trasplantes</b>	<b>30</b>
Alternativas para aumentar la obtención de órganos	31
Donante marginal	31
Donante a corazón parado	31
<b>4. Concepto de donante a corazón parado</b>	<b>32</b>
Tipos de donantes a corazón parado	32
Criterios de selección	34
Procedimientos de extracción de órganos	34
Perfusión <i>in situ</i>	34
Enfriamiento corporal total	36
Circulación normotérmica	37
Aspectos legales	38
Experiencia tras la utilización de órganos de donante a corazón parado	38
<b>5. Fisiopatología de la lesión de isquemia-reperfusión</b>	<b>41</b>
Alteraciones celulares durante la isquemia	42
Alteraciones celulares durante la reperfusión	44
<b>6. El TGF-beta 1</b>	<b>49</b>
El TGF-beta 1 en la patología renal	57
Participación del TGF-beta 1 en la patología renal	58

El TGF-beta 1 y la lesión inmunológica aguda en el trasplante renal	59
El TGF-beta 1 y la lesión inmunológica crónica en el trasplante renal	61
<b>7. Aspectos inmunológicos del rechazo crónico</b>	<b>62</b>
Episodios previos de rechazo agudo	62
Infección por citomegalovirus	63
<b>8. Aspectos no inmunológicos del rechazo crónico</b>	<b>63</b>
Hipertensión arterial	63
Relación entre la angiotensina II y el TGF-beta	64
Relación entre la endotelina-1, el tromboxano A2 y el óxido nítrico con el TGF-beta 1	65
Dislipemias	66
Hiperglucemia	67
Inhibidores de la calcineurina	68
Lesión isquemia-reperfusión	68
Papel de las sustancias vasoactivas	44
Endotelina	71
Óxido nítrico y nitritos/nitratos	75
Tromboxano	78
Prostaciclina	79
Reparación tisular tras síndrome isquemia-reperfusión	82
<b>9. Papel del TGF-beta 1 en la isquemia-reperfusión</b>	<b>82</b>
 <b>HIPÓTESIS.</b>	 <b>55</b>
 <b>OBJETIVOS</b>	 <b>57</b>
 <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	 <b>90</b>
<b>1. Diseño del estudio</b>	<b>90</b>
Grupos sin isquemia caliente	93
Grupos con isquemia caliente	93

---

<b>2. Infraestructura de la actividad experimental</b>	94
<b>3. Animales de experimentación</b>	94
Preparación preoperatoria de los animales	95
<b>4. Modelo de trasplante renal en cerdo</b>	95
Técnica anestésica, monitorización y mantenimiento del cerdo	96
Técnica quirúrgica en el donante	97
Técnica quirúrgica en el receptor	98
<b>5. Determinaciones analíticas y biopsias</b>	107
Cronograma de la recogida de muestras	107
Tipos de muestras y marcadores	108
Marcadores de lesión celular renal	109
Factores de crecimiento y sustancias vasoactivas	109
Marcadores del estado energético celular	110
Estudio histológico	110
Flujos arteriales y venosos	110
<b>6. Métodos analíticos y procesamiento de las muestras</b>	111
Pruebas bioquímicas	111
Determinación de la expresión del TGF-beta 1 y 18S rRNA	112
Generación del estándar interno del DNA heterólogo (EL-MIMIC)	112
Aislamiento del RNA total	114
Retrotranscripción	114
PCR cuantitativa para TGF-beta 1	115
Amplificación del 18S rRNA como <i>housekeeping</i>	116
Método analítico para la determinación de marcadores endoteliales	119
Método analítico para la determinación de nucleótidos de la adenina y sus derivados metabólicos	120
Muestras histológicas	122
Valoración de las muestras	123
Valoración del rechazo	124

<b>7. Método del análisis estadístico de los resultados</b>	126
<b>RESULTADOS</b>	129
<b>1. Resultados descriptivos</b>	130
1.1. Variables cualitativas	130
Distribución de frecuencias de las variables cualitativas	130
Distribución de frecuencias según los tiempos de isquemia	130
Distribución de frecuencias según la viabilidad de los órganos	130
Distribución de frecuencias según el uso de ciclosporina A	131
Anatomía patológica	132
Viabilidad según los grupos de estudio	138
1.2. Variables cuantitativas	139
Distribución normal de las variables cuantitativas estudiadas	139
Descriptivos de las variables según el tiempo de isquemia	140
<b>2. Resultados analíticos</b>	149
Variables cuantitativas	149
Creatinina	150
Expresión del TGF-beta 1 en los grupos de estudio	152
Expresión media al 5º día del TGF-beta1 en los grupos de estudio	160
Expresión media al 5º día del TGF-beta 1 según la histología	161
Expresión del 18S en los grupos de estudio	162
Comportamiento del Flujo arterial	165
Expresión de la Endotelina-1 en los grupos de estudio	166
Expresión del TAX <sub>2</sub> en los grupos de estudio	170
Expresión de la PGI <sub>2</sub> en los grupos de estudio	174
Expresión del NO en los grupos de estudio	178
Expresión de la Carga energética en los grupos de estudio	182
Determinación del ATP en los grupos de estudio	184
Expresión del ADP en los grupos de estudio	186

---

Expresión del AMP en los grupos de estudio	188
<b>3. Correlaciones</b>	191
Representación gráfica de las correlaciones importantes	192
TGF-beta 1 <i>versus</i> ADP	194
NO <i>versus</i> ADP	194
NO <i>versus</i> CE	195
NO <i>versus</i> ATP	195
Correlaciones IF e IR	196
<b>4. Pronósticos de viabilidad del órgano</b>	198
Modelo pronóstico de viabilidad entre las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial	198
Modelo de regresión logística de las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial	199
<b>DISCUSIÓN</b>	200
<b>CONCLUSIÓN</b>	224
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	227

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA TESIS**

**ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA TESIS**

<b>A II</b>	Angiotensina II
<b>ACE</b>	Enzima convertidor de la angiotensina
<b>ADP</b>	Adenosindifosfato
<b>AMP</b>	Adenosinmonofosfato
<b>AMV</b>	Virus del mioblastoma aviar
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>ATPasa Na-K</b>	Bomba de sodio-potasio transmembrana
<b>Aza</b>	Azatioprina
<b>B</b>	Muestra basal
<b>BH4</b>	Tetrahidrobiopterina
<b>CAN</b>	Nefropatía crónica del injerto
<b>cDNA</b>	Ácido desoxiribonucleico complementario
<b>CE</b>	Carga energética tisular
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>%Cvi</b>	Coefficiente de variación intraensayo
<b>5D</b>	5º día
<b>DC</b>	Donante cadavérico
<b>E-C</b>	Solución de <i>Euro-Collins</i>
<b>ECE</b>	Enzima convertidor de la endotelina
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio
<b>EL-MIMIC</b>	Estándar interno de DNA heterologo
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento del fibroblasto
<b>GLM</b>	Modelo lineal general

---

<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
<b>18S</b>	factor 18S de origen ribosómico <i>housekeeping</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPX</b>	Hipoxantina
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HTK</b>	Solución de histidina-triptofano-keto
<b>INOS</b>	Isoforma de la óxido nítrico sintetasa
<b>IC</b>	Período de parada cardíaca
<b>IF</b>	Período inmediatamente antes de la reperfusión vascular
<b>IR</b>	Una hora después de la reperfusión tisular
<b>JGA</b>	Aparato yuxtaglomerular
<b>6-keto-PGF1<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina 6-keto-PGF1 $\alpha$
<b>LAP</b>	Dímero del propéptido amino terminal procesado
<b>LDH</b>	desidrogenasa láctica
<b>LFA-1</b>	Antígeno de función leucocitaria tipo1
<b>LN</b>	Logaritmo neperiano
<b>LTBP</b>	Proteína que se une al TGF-beta latente
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MHC</b>	Complejo de histocompatibilidad
<b>MMF</b>	Micofenolato mofetil
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinase tipo 2
<b>6-MPT</b>	6 mercaptopurina
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adeninnucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adeninnucleótido fosforilada
<b>NHDB</b>	Donantes a corazón parado
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTA</b>	Necrosis tubular aguda
<b>ONT</b>	Organización Nacional de Trasplantes



---

<b>p</b>	Valor de significación estadística
<b>PAI</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno
<b>PAF</b>	Factor activador de plaquetas
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCT</b>	Túbulo contornado proximal
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGI</b>	Prostaciclina
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina 2
<b>PMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>r</b>	Coefficiente de correlación de <i>Pearson</i>
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RLO</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SRA</b>	Sistema renina-angiotensina
<b>TEC</b>	Células epiteliales tubulares
<b>TGFR</b>	Receptores de TGF
<b>TGF-β</b>	Factor transformador del crecimiento beta
<b>TGF-beta</b>	Factor transformador del crecimiento beta
<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico total
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A2
<b>UAD</b>	Unidades arbitrarias de densitometría
<b>UW</b>	Solución de la Universidad de <i>Wisconsin</i>
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>XO</b>	Xantina oxidasa

## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

### 1. BREVE HISTORIA DEL TRASPLANTE RENAL

La historia del trasplante renal está ligada a los esfuerzos de la humanidad por intentar garantizar la vida de un semejante, sustituyendo un órgano enfermo por otro sano procedente de otro individuo o de un animal <sup>1,2,3</sup>. El desarrollo de la técnica quirúrgica y el conocimiento del sistema inmunológico, ayudados por la aparición de nuevos fármacos, hizo que los portadores de la enfermedad renal crónica tuviesen aumentada la supervivencia con el trasplante renal de un 5% hasta un 20% <sup>4,5,6</sup>.

La sustitución de órganos o tejidos dañados o inservibles por otros nuevos no es una idea nueva, y a lo largo de la historia podemos recoger algunos testimonios escritos que aluden a esta práctica desde hace más de dos milenios.

En el siglo I d.C., un cirujano indio llamado *Sushruta* utilizaba autoinjertos de piel para la realización de rinoplastias, según se recoge en el texto *De Medicina*. Del siglo IV d.C. nos llega la utilización, por primera vez, de un órgano extraído de un cadáver para reemplazar la pierna gangrenosa del diácono Justiniano por los médicos *Cosme y Damián*. La extremidad inferior de un gladiador etíope muerto fue el injerto utilizado para este primer trasplante de “donante cadáver” <sup>7,8,9</sup>.

Durante el siglo XVI, *Gasparo Tagliacozzi*, en Bolonia, puso de manifiesto el carácter singular de cada persona, por la imposibilidad de realizar trasplantes entre dos individuos distintos. Llegó a esta conclusión mediante la realización de rinoplastias con injertos cutáneos, en las que sólo obtenía éxito cuando se trataba de autoinjertos. Fue en la segunda mitad del siglo XVIII cuando, *John Hunter*, padre de la cirugía científica, consideró la posibilidad que más tarde llevaría a cabo, de trasplantar tejidos. Trasplantaría dientes de una persona a otra, un diente de una persona a la cresta de un gallo y el testículo de un gallo a una gallina “sin alterar

la condición de galina”; *Hunter* afirmaba; “El éxito de esta operación se funda en la predisposición que todas las sustancias vivientes muestran a unirse con aquellas otras con las que se ponen en contacto aunque posean distinta estructura y aun cuando la circulación tenga lugar en ellas” (*appud Shackman, 1966*)<sup>10</sup>. Con estas apreciaciones, *Hunter* se estaba anticipando en más de siglo y medio a los primeros injertos experimentales de riñón.

En 1902, *Ullman*<sup>11</sup> llevó a cabo por primera vez el auto, el homo y el heterotrasplante de riñón entre perros y de perro a gato, utilizando tubos protésicos para las anastomosis vascular. Los detalles acerca de la supervivencia y la excreción urinaria de los injertos, se han perdido. El mismo año intenta trasplantar un riñón de cerdo en el pliegue del codo de una enferma con uremia, sin embargo, el riñón no funcionó por problemas técnicos<sup>12</sup>.

También en 1902 *Alexis Carrel*<sup>13</sup>, trabajando primero en *Lion* y después en el Instituto Rockefeller en *New York*, desarrollaría una técnica de anastomosis vasculares utilizando sutura directa de los vasos en forma término-terminal y término-lateral. Con esta técnica realizaría sus primeros autotrasplantes en perros, colocando el injerto en el cuello de los animales y observando como secretaban orina<sup>14</sup>. En 1906, *Carrel y Guthrie*<sup>15</sup>, desarrollan el método de *patch* arterial para las anastomosis de pequeños vasos, haciendo una breve mención de los trasplantes realizados en gatos utilizando esta técnica.

El mismo año, describen un caso de homotrasplante en el perro, mediante la técnica “en masa”, esto es; trasplantando los dos riñones en bloque y anastomosando cava y aorta del injerto a la cava y aorta del receptor. La orina se mantuvo dentro de los límites de la normalidad hasta el 8º día y el perro sobrevivió diez días<sup>16</sup>.

En 1908 *Carrel et al.*<sup>17</sup> de nuevo aporta su experiencia con catorce gatos sometidos a homotrasplante, mediante la técnica “en masa”. La máxima supervivencia fue de 36 días, observando hasta el 16º día un aumento considerable del tamaño del injerto y la presencia de albúmina en la orina. También dedujo que isquemias de 50 o 60 minutos no significaban

necesariamente el fallo del injerto. Incluso perfundió injertos con *solución de Locke* y suero fisiológico, observando el efecto beneficioso del enfriamiento en los injertos previamente al trasplante <sup>10</sup>. Por sus diversos experimentos en la cirugía vascular y trasplante de órganos tanto autólogos como homólogos, *Carrel* recibió el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1912 <sup>18</sup>. Otra aportación importante de *Carrel* fue su observación en los cambios histológicos del rechazo en riñones homotrasplantados que presentaron edema, infiltración por células plasmáticas y células de la serie linfóide, dilatación de los túbulos con adelgazamiento epitelial y excesiva fibrosis intra y peri renal.

*Floresco* en 1905 <sup>19</sup>, realizó homotrasplante renal entre perros, situando el injerto en la región inguinal, cervical y en la fosa renal, obteniendo una supervivencia media de 3 días. *Jabulay* en 1906 y *Unger* en 1910 <sup>10</sup> intentaron sin éxito el trasplante de riñones en humanos <sup>16</sup>. *Villard y Tavernier* en 1910 <sup>10</sup> y *Villard y Perrin* en 1913 <sup>10</sup>, aportaron sus experiencias con homotrasplantes renales, observando producción de orina como máximo al octavo día.

*Avramovici* en 1914, realiza dos heterotrasplantes renales de perro a gato, según la técnica “en masa” (supervivencias de 49 a 58 días, con normal excreción de orina) y 11 casos de homotrasplante renal, según técnica “en masa” y técnica de injerto único, con supervivencias superiores a los dos meses. Igualmente aporta aporta sus experiencias de hemotrasplantes renales con injertos conservados en frío por más de treinta horas, consiguiendo una supervivencia de más de 50 días. Lamentablemente, estos resultados no se acompañan de estudios histológicos y urinarios que confirmen tan alta supervivencia <sup>14</sup>.

*Willianson* en 1923 y 1926 y *Ibuka* en 1926, de la *Rochester Mayo Foundation*, llevan a cabo homotrasplante renal en perros y gatos. Ambos coinciden en evidenciar la entre perros y gatos. Ambos coinciden en evidenciar la diferencia entre autotrasplantes, que mantienen vidas durante meses y homotrasplantes, que sobreviven en general por periodos de escasos días. Estos autores confirmarían las observaciones de *Carrel* en 1914 acerca de la evidencia de que en un determinado período de la vida (primeras semanas), se desarrollaba una nueva

función que otorgaba al organismo el poder de eliminar un tejido extraño. Agregaron que “probablemente, la supervivencia de un homotrasplante renal dependía del grado de compatibilidad biológica entre donante y receptor, y que si fuera posible estudiar a los animales mediante alguna prueba del grupo tisular, podría obtenerse una supervivencia prolongada en animales estrechamente relacionados”<sup>10</sup>.

Durante los siguientes cuarenta años muchos autores siguen el camino de los pioneros y llevan a cabo cientos de trasplantes en animales, llegando todos a prácticamente las mismas conclusiones que *Carrel. Holloway* en 1926<sup>10</sup>, *Wu y Mann* en 1934<sup>10</sup>, *Parkinson y Woodworth* en 1947<sup>20</sup>, *Oudot* en 1948<sup>21</sup>, *Lefebvre* en 1949<sup>22</sup>, *Simonsen y Dempster* en 1953<sup>23,24</sup>, entre otros, han llevado a cabo posteriormente homotrasplantes y autotrasplantes renales experimentales, aportando en cada estudio observaciones particulares. En general, la mayoría de investigadores coinciden en que los homotrasplantes renales practicados en animales de experimentación, funcionaron entre 1 y 18 días, con una media de cuatro días, al cabo de lo cual cesaban de orinar manteniendo en general una excelente vascularización. Estudios histológicos del injerto no funcionante, demostraban edema intersticial y células redondas de infiltración y destrucción tubular. El glomerulo permanecía en la mayoría de los casos, relativamente normal. Destaca entre ellos *Lefebvre*, que en 1949 llega a la conclusión que si los riñones son correctamente perfundidos y mantenidos a baja temperatura, mantienen una viabilidad plena de hasta 24h<sup>22</sup>. Aspectos genéticos y nuevos conceptos, como el *self marker*, se postularon en un intento por comprender los aspectos inmunológicos inherentes a la práctica del trasplante renal.

### **Homotrasplante renal humano**

El primer alotrasplante renal humano con riñón de cadáver fue llevado a cabo por *Yu Yu Voronoy*, quien trasplantó el 3 de abril de 1933 un riñón de cadáver del grupo A, con una isquemia caliente de 6 horas, en la ingle de una mujer de 26 años de grupo O afectada de insuficiencia renal debida a un envenenamiento por mercurio. A pesar de que no se describen problemas técnicos durante la intervención, el riñón apenas produce unas gotas de orina y la

enferma fallece a los dos días. El estudio histopatológico mostró una mezcla de daño renal por el mercurio, por rechazo hiperagudo y por anoxia<sup>23,24</sup>.

En 1945, *Landsteiner* y *Hufnagel*, residentes de urología y cirugía respectivamente en el Hospital *Peter Ben Brighan* de *Boston*, trasplantaron, junto a *Hume*, un riñón de cadáver en el brazo de una joven afectada de insuficiencia renal aguda, anastomosando los vasos renales a la arteria radial y a la vena cefálica y dejando la vía excretora libre sobre la piel, cubriendo el injerto y el pequeño segmento ureteral con gasas y una lámina de caucho estéril. El injerto comenzó a funcionar de inmediato, manteniendo diuresis, aunque escasa, hasta el día siguiente, cuando los riñones propios de la paciente empezaron a funcionar. A las 48 horas se extirpó el injerto. La enferma fue dada de alta, pero algunos meses después ingresó de nuevo afecta de hepatitis, a consecuencia de la cual falleció<sup>25</sup>.

Otro avance clave en la historia del trasplante renal, fue la inclusión, durante la misma época, del riñón artificial o dializador, desarrollado en Holanda por *Willem Kolff*, quien ideó un dializador de tambor giratorio que ya pudo emplear, con éxito, en algunos casos de insuficiencia renal aguda. En 1946 continúa sus trabajos junto a *Merril*, *Walter* y *Thorn* en *Boston*, y empiezan a utilizar estos dializadores en el tratamiento de la insuficiencia renal terminal<sup>26</sup>.

En 1950, *Lawler*, *West*, *McNulty*, *Clancy* y *Murphy* le extirparon a una mujer de cuarenta y cuatro años el riñón izquierdo, poliquístico, no funcional, y en la misma intervención le trasplantaron un riñón de cadáver de una mujer de cuarenta y nueve años del mismo grupo sanguíneo. Realizaron las anastomosis a los vasos renales propios de la receptora (arteria y vena, ambas en término-terminal) y restituyeron la vía urinaria mediante urétero-ureterostomía tutorizada mediante un catéter. Cincuenta y dos días después inyectaron índigocarmín *i.v.*, cuya salida se observó por ambos uréteres, aunque la concentración en el lado del trasplante ya era menor. No se realizaron otras pruebas funcionales y al cabo de nueve meses y medio se practicó la trasplantectomía del injerto, en la

que se observó un riñón de tamaño reducido, con ausencia de estructuras pélvicas o ureterales y sin funcionalismo alguno, aunque la enferma continuó viviendo gracias a su otro riñón poliquístico. Desde el punto de vista técnico, éste debe considerarse el primer trasplante renal ortotópico <sup>27,28</sup>.

*Küss, Teinturier y Milliez*, presentaron, en 1951, cinco homotrasplantes, con un *exitus* por parada cardíaca en un paciente de quince años, antes de iniciar las anastomosis, y en general con unos resultados funcionales decepcionantes. En ningún caso el órgano trasplantado pudo mantener una homeostasis normal, a excepción de un caso en el que el riñón utilizado procedía de un ajusticiado (aunque con anomalías vasculares); el resto de órganos empleados fueron riñones libres, subóptimos. La técnica quirúrgica empleada fue la anastomosis término-terminal de la arteria a la hipogástrica y de la vena a la íliaca externa, abocando el uréter a piel, produciéndose necrosis ureteral en dos de los casos. Se utilizó la heparinización y la infusión de ACTH con intención de bloquear la formación de anticuerpos, sin resultado alguno <sup>29</sup>.

A partir de 1951 y hasta 1954 comienzan a publicarse algunas series en las que ya se habla de diuresis aceptables. Es de destacar la serie de nueve trasplantes renales del Hospital *Peter Brent Brigham* de *Boston*, realizados por *Hume, Merrill, Miller y Torn*. Colocan el riñón en el triángulo de *Scarpa* y utilizan en la mayoría de los casos la infusión de corticoides, en un intento de inmunosupresión. Cuatro de los nueve riñones mostraron una función aceptable y en tres la suficiente para mantener con vida a los pacientes, uno de los cuales llegó a vivir cinco meses y medio <sup>30</sup>.

El primer trasplante de vivo a vivo fue llevado a cabo por *Michon et al.* el 25 de diciembre de 1952 en el hospital *Necker*: el receptor fue un joven carpintero a quien días antes se le había practicado una nefrectomía derecha por estallido renal traumático, ya que el paciente era monorreno por aplasia renal izquierda. La donante fue la madre del joven, y el trasplante se llevó a cabo en la fosa íliaca derecha con anastomosis vasculares a los vasos



iliacos del receptor y anastomosis urétero-ureteral aprovechando el cabo ureteral dejado tras la nefrectomía. El riñón funcionó durante veintiún días, cesando la diuresis bruscamente el 16 de enero de 1953 a pesar de intentar su recuperación mediante perfusión intravenosa de corticoides. El joven murió algunos días después <sup>31</sup>.

En 1954, el primer trasplante renal entre hermanos gemelos univitelinos se lleva a cabo con éxito en el *Peter Ben Brigham Hospital* de Boston (*Merrill, Murray, Harrison y Guild*). El paciente estaba afecto de hipertensión arterial maligna y el trasplante se llevó a cabo tras comprobar la tolerancia de un injerto de piel realizado entre donante y receptor. La técnica operatoria fue la colocación del injerto en la fosa ilíaca, con anastomosis arterial a la hipogástrica, venosa a la ilíaca común en término-lateral, accediendo a los vasos por vía retroperitoneal, y reimplantando el uréter a la vejiga mediante un túnel submucoso por vía transvesical. El trasplante funcionó inmediatamente y el paciente vivió hasta ocho años después, cuando falleció de un infarto al riñón funcionante <sup>32-35</sup>.

Entre 1954 y 1966 se llevan a cabo, en el *Peter Ben Brigham*, 23 isotrasplantes (uno, con cuatro arterias, se trombosó; los otros funcionaron entre tres meses y ocho años). En 1959, *Merrill, Murray y Harrison* trasplantan con buenos resultados un riñón entre gemelos bivitelinos <sup>36, 37</sup>, previa irradiación subletal del receptor; seis meses después *Vaysse y Auvert*, en el Hospital *Necker*, realizan otro trasplante en las mismas condiciones, también con buenos resultados, por lo que *Küss*, en París, tras establecer un protocolo de irradiación total de la médula, comienza de nuevo a trasplantar. En la mayoría de los casos, los riñones funcionaron inmediatamente y algunos, incluso, algunas semanas, pero a excepción de un caso, ninguno de los doce casos perduró más de tres meses <sup>38, 39</sup>.

En 1962, se realizó el primer trasplante renal con éxito en el mundo con un riñón de cadáver *Murray et al., 1963* <sup>37</sup>. En los años siguientes se trasplantaron varios enfermos con donador familiar, empleando la Azatioprina (Aza) como inmunosupresor de base, y tratando las crisis de rechazo con prednisona en altas dosis.

El mismo *Küss*, en 1965, aprovechando que, por razones inmunitarias, comienza a realizarse la esplenectomía, tras hacer la nefrectomía del mismo lado, anastomosa los vasos del injerto a los vasos renales o a los vasos esplénicos, vía transperitoneal anterior, con lo que el riñón quedaba en posición ortotópica. *Küss* abandonó esta técnica por las dificultades que presentaba en las reintervenciones. Posteriormente fue adoptada por *Gil-Vernet*, quien accedió a los vasos esplénicos por vía retroperitoneal <sup>40</sup>. Actualmente el trasplante ortotópico queda como una alternativa cuando por alguna que otra causa no es factible o es dificultoso el trasplante en la fosa ilíaca.

Las técnicas empleadas eran buenas, los resultados no tanto y la supervivencia del paciente y del injerto dejaban mucho que desear <sup>39</sup>. Los malos resultados eran, sobre todo, consecuencia de la irradiación subletal (de 400 a 600 cGy) a que se sometía a los receptores. Por estas razones se fue disminuyendo la dosis y se empezaron a agregar corticoides y 6-mercaptopurina, que fue rápidamente sustituida por la azatioprina, pauta que desplazó totalmente a la radioterapia y permitió el desarrollo de los programas de homotrasplante como tratamiento de elección de la insuficiencia renal terminal <sup>37</sup>.

Otros hitos marcarán el camino del trasplante renal. Por un lado, el concepto de “muerte cerebral” establecido en 1968 por el Comité de la *Harvard Medical School* y aceptado posteriormente por el resto de los países. Su definición permite la extracción de órganos del cadáver en tal situación hemodinámica que suponga un mínimo sufrimiento para el parénquima.

Por otro lado, el empleo de las transfusiones pretrasplante al receptor, con el fin de que éste tenga una mejor tolerancia al nuevo órgano y una supervivencia más larga, descritas por *Opelz* en 1973; aunque no aceptadas en un primer momento, sus efectos beneficiosos fueron demostrados por *Opelz y Terasaki* en el Congreso de la Sociedad Internacional de Trasplantes de 1978 celebrado en Roma.

En España los primeros intentos de trasplante son realizados por *Martínez-Piñeiro* en 1960, entre dos hermanos, y por *Younger* en 1961 de padre a hijo. *Gil-Vernet, Caralps y Alsina*<sup>40</sup> iniciaron en el Hospital Clínico de Barcelona en el año de 1964 la trasplantación renal en perros, que les permitiría un año más tarde la consecución del primer trasplante renal con éxito, a partir de riñón de cadáver, en España el cual tuvo una aceptable función renal durante un largo período de tiempo. En sus primeros años siguió la técnica descrita por *Küss* y hecha popular por *Hume y Murray*, y con la que sin duda se obtuvieron buenos resultados. También en 1965, *Alfárez* en la Fundación Jiménez Díaz unas semanas después de *Gil-Vernet*, realizó con éxito otro trasplante renal procedente de donante cadáver. Se inicia de forma reglada el programa de trasplantes renales en España, incorporándose sucesivamente al resto de los hospitales hasta configurar el actual mapa de centros trasplantadores.

El trasplante renal ha permitido, por primera vez en la historia, burlando el rigor de las leyes biológicas que rigen la evolución de las especies, hacer vivir a un individuo gracias a un órgano extraído de otro. El trasplante renal abrió la vía a los otros trasplantes de órganos indispensables para la vida, y todos ellos participan en un acontecimiento que parece un milagro pero que plantea aún hoy y en el futuro los numerosos problemas de su inserción en la sociedad.

### **Descubrimientos iniciales en el campo de la inmunología del trasplante**

Paralelamente a los avances quirúrgicos, en los campos de la investigación de la naturaleza del rechazo y en el de la inmunosupresión se sucedieron hechos importantes. *Jean Dausset* describe por primera vez en 1958 un antígeno leucocitario. Posteriormente se descubren nuevos antígenos presentes en leucocitos que posteriormente se denominará sistema HLA (Antígeno Leucocitario Humano), en 1967. El *cross-match* o prueba cruzada entre el suero del receptor y células del donante se vislumbra válido para predecir un rechazo hiperagudo (1966).

*Hamburger* lleva a cabo los primeros intentos para prevenir el rechazo del órgano en París, entre 1959 y 1962, mediante la irradiación total pretrasplante del receptor. Se aplica la decapsulación renal como tratamiento del edema por el rechazo agudo (*Küss y Legrain*) y se irradia el órgano trasplantado. Se utilizaron posteriormente con similares fines la timectomía, esplenectomía y nefrectomía bilateral, sin resultados positivos <sup>40</sup>.

En 1959, *Zukosky y Collaway* demuestran el efecto inmunosupresor de la 6-mercaptopurina. *Calne y Murray* observan en 1961 la eficacia de la azatioprina en trasplantes de perros y en 1962 la utilizan por primera vez en el trasplante humano con buenos resultados.

En 1963, *Goodwin y Kaufman* emplean los esteroides como agente inmunosupresor único en el tratamiento del rechazo, y desde entonces se utilizan de forma habitual. Posteriormente, *Woodruff y Starzl* emplean el suero antilinfocitario. Sin embargo, a partir de los años 1976-1978 *Borel y Calne* comienzan a utilizar la ciclosporina con el éxito que hoy conocemos. En la década de los ochenta su empleo ha supuesto un aumento del 20% en la supervivencia del injerto. Desde que en 1981 *Cosini* utilizara por primera vez los anticuerpos monoclonales, éstos se han empleado con frecuencia para el tratamiento del rechazo corticorresistente de predominio celular <sup>40</sup>.

## **2. Trasplante de órganos en España**

Según los últimos datos actualizados de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) (junio 98-junio 99), España ocupa el primer lugar mundial en cuanto a donación de órganos se refiere. El número de donantes en este periodo ha sido de 1.274 (tasa 32 p.m.p). Esta cifra ha ido aumentando progresivamente en los últimos diez años (en 1989 era de 550 donantes). Con todo, en la lista de espera hay, actualmente, 3.850 pacientes; casi dos mil menos que en 1991 <sup>41</sup>.

Durante el período revisado (julio 99 – junio 99) el 64% de los donantes fueron varones. La edad media fue de  $47.5 \pm 18.9$  y la principal causa de muerte fue hemorragia cerebral (58.7%). El 84.5% fueron donantes multiorgánicos. Se realizaron 1995 trasplantes renales de cadáver (tasa 50.3 p.m.p); 800 casos más que hace diez años, y 19 de vivo (tasa 0.5 pmp). Cataluña ocupa el segundo lugar por comunidades autonómicas siguiendo a Madrid<sup>42</sup>.

Los excelentes resultados obtenidos han determinado que tanto la supervivencia actuarial del paciente al año (entre 90-100%) como la del injerto (80%) sea muy elevada. A pesar de estos datos, existe un decalaje importante entre la oferta y la demanda, ya que existe un déficit de órganos.

### **3. La obtención de órganos para trasplantes**

El interés por obtener órganos a partir de donantes a corazón parado no es nuevo. En la década de 1960 a 1970, antes de que el concepto de muerte cerebral fuera establecido, la principal fuente de obtención de órganos eran los individuos en los que ya había ocurrido la parada cardíaca. Con el desarrollo de las técnicas de reanimación y de la ventilación artificial nace el diagnóstico de muerte encefálica en 1970: muerte del individuo previa a la parada cardiorrespiratoria por el cese de las funciones encefálicas.

En España, en el año 1979 se promulgó la Ley española de trasplantes, desarrollada en el Real Decreto de 1980, actualizada en el Real Decreto de 2000, que derogaba la antigua ley de 1950. Esta ley permitía regular todo el procedimiento de la donación, extracción y trasplante, de donante vivo y de cadáver, indicando los criterios médicos para el diagnóstico clínico de la muerte cerebral. A partir de aceptar el concepto de muerte cerebral, el interés en los donantes a corazón parado descendió. Los órganos obtenidos de donantes en muerte encefálica fueron de indiscutible mejor calidad, con lo que se demostró que los resultados obtenidos podían igualarse a los de donantes vivos. Todo ello derivó en el abandono casi total de la extracción de cadáver. En países como Japón, donde legalmente no se acepta el

concepto de muerte cerebral, la principal fuente de donantes proviene de donantes a corazón parado.

El número de donantes potenciales por millón de habitantes se encuentra en torno a los treinta. A pesar de que España tiene el índice de donación de órganos por millón de habitantes más alto del mundo (32 según ONT, actividad de donación y trasplante en 1999), y el número de donantes es cada vez mayor, continúa existiendo un déficit de órganos, circunstancia que conllevó en 1994 una mortalidad en la lista de espera de hasta un 6,8% <sup>42</sup>.

Además, con la entrada en vigor de la Ley de seguridad vial en 1992, que obliga al uso de los cinturones de seguridad en los automóviles y del casco protector en las motocicletas, el número de traumatismos craneoencefálicos y de víctimas mortales en accidentes de tráfico descendió, por fortuna, aunque se agravó la problemática del déficit de donantes.

### **Alternativas para aumentar la obtención de órganos**

La falta persistente de órganos aptos para trasplante obliga a la utilización de todos los medios humanos y técnicos en la investigación de soluciones alternativas.

### **Donante marginal**

Como consecuencia de esta escasez, se han ido ampliando cada vez más los criterios de selección de los cadáveres donantes de órganos <sup>43, 44</sup> para aumentar al máximo, con ello, el número de órganos disponibles. Este hecho ha significado aceptar donantes de edad más avanzada (mayores de sesenta años) al observar que esto no influía en la supervivencia posterior del paciente. También cambió la primera causa de muerte de los donantes <sup>45</sup>: de ser el traumatismo craneoencefálico pasó a ser la hemorragia intracraneal espontánea, de modo que cambió el grupo de edad (veinte-treinta años a cincuenta-sesenta y nueve años). Se trata de donantes marginales, pues tienen, antes de la extracción, una estancia prolongada en la

UCI, con drogas vasoactivas, patologías asociadas a la edad como hipertensión arterial, diabetes mellitus, etc. Sin embargo, se están utilizando de forma creciente, de modo que se han convertido en los donantes más habituales.

### **Donante a corazón parado**

La discrepancia actual que existe entre la oferta y la demanda de órganos ha obligado recientemente a explorar otras fuentes de donantes que permitan aumentar el número, reavivando el interés por los donantes a corazón parado. El programa de obtención de riñones de donantes a corazón parado se inició en 1980 en el Hospital Universitario de *Maastrich* <sup>46</sup>. Se calcula que el número de donantes potenciales podría aumentar hasta un 20% <sup>47</sup>.

## **4. Concepto de donante a corazón parado**

Se define donante a corazón parado como aquel individuo en situación de parada cardiorrespiratoria irrecuperable, fallecido con un tiempo de isquemia caliente (tiempo entre la parada cardíaca y el inicio de la perfusión fría) lo suficientemente corto que permita la extracción de órganos viables para ser utilizados para trasplante. Se considera parada cardíaca irreversible, según la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, cuando el paciente presenta ausencia de actividad eléctrica cardíaca efectiva tras al menos treinta minutos de reanimación cardiopulmonar avanzada, en ausencia de drogas depresoras o hipotermia inducida.

### **Tipos de donante a corazón parado**

Así como la donación de órganos basada en la muerte cerebral está regulada por la ley, la basada en la parada cardiorrespiratoria del paciente no dispone de normativa. En marzo de 1995, en el *First International Workshop on Non Heart-Beating Donors*, celebrado en *Maastricht*, se realizó un documento de consenso <sup>48</sup> en el que se establecía una serie de

recomendaciones, definiciones y características de lo que debían ser los donantes a corazón parado. Se propuso una clasificación en cuatro categorías (Clasificación de *Maastricht*)<sup>49</sup>.

En España este documento se ha adaptado a nuestro ambiente, y sus conclusiones han quedado plasmadas en el Documento de Consenso Español emitido por la Organización Nacional de Trasplantes en noviembre de 1995<sup>50</sup>:

### **Categoría I: Ingreso en parada cardíaca.**

El individuo sufre parada cardíaca y se traslada al hospital sin haber practicado maniobras de reanimación cardiopulmonar. No se conoce el tiempo de parada cardíaca, es decir, el tiempo de isquemia caliente. Se trata de un donante muy poco frecuente en nuestro medio.

### **Categoría II: Parada cardíaca con maniobras de reanimación inefectivas**

El paciente se encuentra ingresado en el hospital y sufre parada cardíaca que no se revierte con las maniobras de reanimación. La información sobre este donante sí se conoce. El objetivo es disminuir al máximo el tiempo de isquemia caliente. Hay poca experiencia publicada al respecto. Es el segundo tipo más frecuente.

### **Categoría III: A la espera de la parada cardíaca.**

Paciente en muerte cerebral o con lesión neurológica irreversible secundaria a traumatismo o a tumor cerebral, al que, de acuerdo con la familia, se le retira la ventilación mecánica y/o el soporte terapéutico, casi siempre en el quirófano. Estos donantes se denominan “controlados”; el tiempo de isquemia es muy corto y permite la extracción de varios órganos. Se da en países como Holanda y Estados Unidos<sup>51-53</sup>. En España existe algún caso esporádico.



#### **Categoría IV: Donante en muerte cerebral que sufre una parada cardíaca.**

Es el tipo de donante más frecuente en nuestro medio. Aproximadamente un 9% de donantes presentan una parada cardíaca antes de la extracción. Debido a la inestabilidad hemodinámica previa del donante, se puede prever la parada con antelación.

#### **Criterios de selección**

Los criterios de selección para considerar a un paciente fallecido como donante potencial de órganos a corazón parado incluyen, generalmente: edad inferior a sesenta y cinco años, tiempo de isquemia caliente inferior a 30 minutos sin contabilizar el tiempo transcurrido durante las maniobras de resucitación cardiopulmonar efectivas, pudiendo ser el tiempo total antes de la perfusión fría de hasta 2 horas <sup>54-57</sup>, así como el resto de criterios de selección habituales para los donantes en muerte cerebral (ausencia de historia de enfermedad renal, hipertensión no controlada, enfermedad maligna excepto tumor cerebral primario, signos de adicción a drogas vía parenteral, infección sistémica o sepsis).

#### **Procedimientos de extracción de órganos**

Al inicio, el procedimiento de extracción de órganos a corazón parado se inicia tras el diagnóstico de muerte por parte del equipo médico que ha atendido al paciente, en cuyo caso el cadáver es considerado como donante potencial. Es preciso valorar con exactitud el tiempo de isquemia caliente y el tiempo transcurrido desde el inicio de las maniobras hasta el comienzo de la recirculación fría. Inicialmente se continúa la RCP mediante ventilación artificial y masaje cardíaco, con finalidad de mantener la mejor perfusión posible de los órganos, y se procede a la heparinización del donante. Algunos autores <sup>54</sup> recomiendan el uso de fentolamina (0,125 mg/kg) para provocar vasodilatación de los vasos renales previamente a la perfusión y facilitar así el descenso rápido de temperatura. Posteriormente, se cateterizan la arteria y vena femoral por disección quirúrgica y se inicia la perfusión fría de los órganos.

### Perfusión *in situ*

Al principio, la perfusión renal se conseguía mediante la perfusión por gravedad de líquido de *Collins frío*, a través de la arteria femoral<sup>57</sup> (perfusión *in situ*), con modificaciones posteriores<sup>57, 59-62</sup>.

La utilización de *Banowsky et al.* en 1971<sup>63</sup> y *García Rinaldi*<sup>57</sup> *et al.* en 1975 de un catéter de doble balón y triple luz colocado en la aorta por vía femoral, de forma que aislara la circulación renal, permitió la perfusión fría de estos órganos y su posterior viabilidad para trasplante. Posteriormente *Garvin*<sup>58</sup> y *Schweizer*<sup>59</sup> y, más recientemente, *Fujita*<sup>60</sup>, *Kootstra, Booster, Ruers et al.*<sup>54,61,62,64-67</sup>, así como otros equipos<sup>55,56,68-82</sup>, han puesto en práctica estos métodos, mediante el uso de diversos tipos de catéteres (doble y triple luz<sup>57,60,61,83,84</sup>, catéter de *Foley*<sup>57</sup>, catéter de *Anaise*<sup>85,86</sup>, catéter de cuatro luces<sup>87</sup>), con los que se han obtenido buenos resultados, que aconsejan la inclusión de este grupo de donantes en el programa de obtención de órganos.

Se ha sugerido que el enfriamiento renal de superficie, mediante “perfusión peritoneal hipotérmica continua”<sup>88</sup>, podría reducir la temperatura renal y proteger la microvascularización en caso de perfusión fría no suficientemente efectiva, especialmente en casos de perfusión de larga duración<sup>48, 86</sup>. *Paprocki*<sup>89</sup> ha utilizado esta técnica de forma aislada en cuatro donantes con buen resultado.

Otro factor que se ha relacionado con una mejoría en la función renal postrasplante ha sido la presión de perfusión del líquido de preservación. *Anaise*<sup>85,86,88</sup> demuestra que cuando ésta es de 70 mmHg, el descenso de la temperatura es más rápido y efectivo (hasta 15 °C en 5 minutos). Elevadas presiones en el líquido de preservación mejoran la función renal postrasplante<sup>89</sup>. Una presión de perfusión baja aumentaría la liberación de renina-angiotensina, lo que ocasionaría un aumento de las resistencias vasculares renales, circunstancia que condicionaría una disminución del flujo renal y una mala hipotermia<sup>85-86</sup>.

Se ha ensayado con diferentes líquidos de perfusión (*HTK*<sup>54</sup>, *Wisconsin*<sup>72</sup>, *Ringer lactato*<sup>60</sup>, *Euro-Collins*). La solución de *Wisconsin* contiene adenosina, necesaria para la síntesis de ATP, mejora la microcirculación, inhibe la agregación plaquetar y protege las células endoteliales. La *HTK* es una excelente solución de perfusión debido a su baja viscosidad. La solución de *Euro-Collins* tiene la desventaja de que causa aumento de las resistencias vasculares, pues presenta una concentración elevada de potasio (115 nmol/L), lo que provoca vasoconstricción de los capilares glomerulares, que da lugar a una mala perfusión. Además, antes de su uso debe ser mezclada con glucosa (70 ml de glucosa 50% con 930 ml de E-C).

Recientemente, varios estudios están devolviendo protagonismo a la preservación de los órganos mediante la utilización de “máquinas de perfusión pulsátil” hasta el implante. Estos estudios han demostrado una mejoría en el funcionamiento renal postrasplante en aquellos riñones afectados por daño isquémico. Reduce la incidencia de retraso inicial en la función del injerto<sup>90-92</sup> y regenera el ATP<sup>94</sup> en riñones sometidos a isquemia caliente. Este tipo de preservación, en oposición a la preservación fría simple, podría reducir las resistencias vasculares inducidas por la isquemia y facilitar la eliminación de los restos de hematíes de la microcirculación, lo que permitiría una mejor reperfusión postimplante<sup>93</sup>.

### **El enfriamiento corporal total**

Estas técnicas se han ensayado en estudios experimentales animales<sup>57</sup> como alternativas a la perfusión *in situ*, y se han obtenido resultados favorables. Tras los buenos resultados obtenidos con la perfusión corporal total mediante circulación extracorpórea para la preservación de corazón y pulmón, así como en los casos de la extracción multiorgánica<sup>58</sup>, *Koyama*<sup>51,59</sup> y otros autores<sup>60,61</sup> han utilizado la técnica del enfriamiento corporal total mediante *bypass* cardiopulmonar en donantes renales humanos a corazón parado con buenos resultados. *Hoshino*<sup>62</sup>, en sus estudios experimentales, plantea la obtención de hígados y riñones en este tipo de donantes mediante la técnica citada. Ésta, con la alta presión de

perfusión del líquido de preservación, permite la correcta perfusión del cadáver, su oxigenación y enfriamiento, por lo que se prevé que en un futuro próximo sea el método de elección para la obtención de órganos en este grupo de donantes. No obstante, presenta problemas en su utilización en los donantes politraumáticos con ruptura del árbol vascular (hemotórax, ruptura de grandes vasos, hemoperitoneo, etc.).

### **La recirculación normotérmica**

Consiste en la perfusión normotérmica de los órganos a 37°C con sangre hiperoxigenada mediante *bypass* cardiopulmonar, previo al enfriamiento corporal total. Disminuye de forma importante el retraso en la función inicial de estos injertos. Este hecho se podría explicar, en primer lugar, porque se ha demostrado que la sangre es mejor solución de preservación que los cristaloides para recuperar el tejido dañado<sup>101,102</sup>. *Van der Wijk et al.* ya lo observaron en riñones preservados *ex vivo* de esta manera<sup>103</sup> y *Gaber et al.* lo demostraron en un modelo experimental con ratas<sup>104</sup>.

*Mayfield et al.*<sup>103</sup> demostraron la mejoría de los riñones perfundidos con sangre en el control del edema tisular y la actividad de la bomba de iones. *Maessen et al.*<sup>102</sup> demostraron la mejora de la viabilidad de riñones dañados por la isquemia y almacenamiento en hielo durante 48 horas cuando eran sometidos a una inmediata perfusión normotérmica. Otros autores han demostrado, en el ámbito experimental, que la utilización de recirculación normotérmica permite recuperar los niveles de adeninnucleótidos<sup>105,106</sup>, con la consiguiente importancia para la viabilidad del órgano. En este sentido, *Rijkmans et al.*<sup>107</sup> expone que es posible prevenir el daño irreversible mediante la perfusión sanguínea. Se ha visto que mejora la supervivencia del trasplante hepático y que permite trasplantar hígados con un tiempo de parada cardíaca entre 20 y 40 minutos. El daño que estos hígados sufren debido a la isquemia es reversible<sup>105,107</sup>. Algunos grupos han usado esta técnica y también han obtenido buenos resultados, tanto en hígado<sup>105,108,109</sup> como en riñón<sup>105</sup>. La experiencia en el tema del grupo del Hospital Clínic de Barcelona fue actualizada y publicada por *Valero et al.*, en el año 2000<sup>110</sup>.

## Aspectos legales

Una vez el cadáver en parada cardiorrespiratoria irreversible se ha perfundido, durante la fase de enfriamiento de los órganos se solicita el consentimiento familiar y judicial, si fuera preciso, para la donación. Una vez obtenidos éstos, el cadáver es conducido al quirófano, donde se practica la extracción de los órganos. El consentimiento familiar adquiere en este grupo de donantes una mayor dificultad por el mayor dramatismo del momento, dada la agudeza del proceso. Los aspectos legales también tienen unas características especiales que lo diferencian de los procedimientos habituales de los donantes por muerte cerebral. Destaca el hecho de que el cadáver está diagnosticado como *exitus letalis* por el equipo médico que lo atendió, debiéndose, a partir de este punto, diferenciar dos posibilidades: a) el caso de la muerte natural, en la que el certificado médico de defunción y el consentimiento familiar son suficientes para autorizar la extracción de órganos, y b) el caso de la muerte violenta, en el que, antes de la extracción de órganos, es precisa la presencia del médico forense, que permitirá la extracción durante la autopsia (autopsia-extracción), que se realizará, en este caso, en condiciones de asepsia en quirófano y de inmediato tras los procedimientos previos antes detallados.

## Experiencia tras la utilización de órganos de donante a corazón parado

La inclusión de donantes a corazón parado en el grupo de donantes aptos para trasplante ha supuesto un incremento en el número total de donantes entre un 7% y un 20% según las series <sup>47</sup>.

El principal problema que se deriva de la utilización de los riñones de donantes a corazón parado es una mayor incidencia de necrosis tubular aguda o retraso del funcionamiento del injerto en los receptores de los órganos obtenidos a corazón parado, así como una elevada incidencia de riñones con fallo primario del injerto <sup>111,112,113</sup>. En los grupos

con más experiencia, la incidencia de retraso en el funcionamiento del injerto oscila entre un 48 y 78,4% y la incidencia de fallo primario entre un 4 y un 19%<sup>114, 115-121</sup>. La aparición de rechazo vascular agudo asociado al síndrome hemolítico urémico se ha observado en algunos casos, sin que se haya podido establecer una relación causal<sup>122,114</sup>.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la utilización de diversos líquidos de preservación<sup>123,124</sup>, con reductores de los radicales libres<sup>125</sup>, el acortamiento del tiempo de isquemia fría, la utilización de máquinas de perfusión para la preservación durante este periodo<sup>126</sup>, y la utilización de pequeñas dosis de ciclosporina<sup>127,128,114</sup>, son algunas de las medidas que se recomiendan para mejorar aún más el funcionalismo de estos órganos. En experimentos animales, *Shirakura* y colaboradores<sup>129</sup> utilizan vasodilatadores, antitrombocíticos, antiarrítmicos, anticomplemento y antirradicales libres (prostaciclina, propranolol, alopurinol, nafamostatato mesilato) para la obtención y trasplante de páncreas, corazón, pulmón y riñones tras 30 minutos de isquemia caliente.

Con todo esto, la viabilidad de los riñones procedentes de donantes a corazón parado a largo plazo es similar a la de los órganos procedentes de donantes en muerte encefálica. La supervivencia del injerto renal es de alrededor del 75% el primer año y del 60% al cabo de cuatro años, y son similares en la mayoría de las series<sup>111,113,114,121,124,127,130</sup>.

El trasplante renal acumula la mayor parte de órganos con donantes a corazón parado. Aunque en estos momentos la casuística sea relativamente corta, ha dado lugar a un gran número de publicaciones. Todas coinciden en que los riñones así obtenidos son útiles para trasplante<sup>54-56,61,68,69,77,78</sup>. A pesar de tener una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo se aproxima a la obtenida con aquellos riñones provenientes de donantes con corazón latiendo<sup>80-82</sup>.

El hospital Clínic de Barcelona comenzó el programa de identificación y obtención de riñones a partir de donantes a corazón parado en 1986. Desde octubre de 1986 hasta marzo

de 1999, se han obtenido 57 donantes potenciales a corazón parado. La edad de los donantes fue de  $39,5 \pm 15,6$  años, y la distribución por sexos: 43 varones y 12 hembras; 51 donantes fueron de la categoría II de *Maastricht* y 6 donantes fueron de la categoría IV. La causa de muerte fue debida a enfermedad cardíaca (40,4%) o politraumatismo (36,8%). El tiempo medio de isquemia caliente fue de  $68,9 \pm 35,6$  minutos, con un periodo medio de isquemia caliente sin maniobras efectivas de resucitación cardiopulmonar de  $6,23 \pm 7,11$  minutos<sup>110</sup>.

En 9 casos (15,3%), el proceso fue abortado debido a causa de la negativa familiar y en 2 casos, debido a negativa judicial (3,4%). 16 donantes (27,2%) fueron rechazados debido a contraindicación clínica: técnica de perfusión deficiente en el donante en 9 casos (15,8%), órganos deficientemente perfundidos en 2 casos (3,5%) y factores de riesgo o serología vírica positiva en 5 casos (8,7%).

En el Hospital Clínic se han empleado tres tipos diferentes de perfusión de órganos. Desde 1986 hasta 1989 se ha usado la perfusión *in situ*, “el enfriamiento corporal total” con *bypass* cardiopulmonar desde 1990 hasta 1996 y últimamente, desde 1997 hasta ahora se ha usado “la recirculación normotérmica”. El tipo de perfusión de los órganos fue la siguiente: 29 casos (50,9%) perfundidos con técnica de perfusión *in situ* con solución fría de *Collins* por gravedad, y en 8 casos (14%) perfusión *in situ* mediante bomba no pulsátil. 11 casos fueron perfundidos mediante “enfriamiento corporal total” (17%) pero en 3, debido al retorno venoso limitado, se suspendió este tipo de perfusión y se inició la perfusión *in situ* por gravedad. En los restantes 6 donantes (10,52%) se usó la técnica de recirculación normotérmica.<sup>110</sup>.

En resumen, se obtuvieron 30 donantes efectivos. 44 riñones se obtuvieron de donantes con perfusión *in situ*, 8 riñones de donantes perfundidos con enfriamiento corporal total y 8 con recirculación normotérmica. Dos riñones no fueron trasplantados debido a problemas intraoperatorios de los receptores, de modo que finalmente se trasplantaron 58 riñones; 2 de ellos en otro hospital. Los receptores tenían una edad media de  $44,2 \pm 16,5$  años. 36 eran hombres y 20 mujeres. En 18 casos (32,1%) los riñones funcionaron

inmediatamente. Se observó retraso en la función del injerto en 29 receptores (51,8%). La duración media del retraso de la función del injerto fue de  $20,1 \pm 14,6$  días. Nueve riñones nunca llegaron a funcionar (16,1%). La curva de supervivencia actuarial del riñón fue de 76,4% al año y 56% a los cinco años. La supervivencia del paciente fue de 89,3% a los cinco años.

Después de 13 años de experiencia en el Hospital Clínic de Barcelona, el programa de extracción de riñones a partir de donantes a corazón parado ha demostrado que esta fuente de órganos puede contribuir de forma grata a la expansión del *pool* de donantes. Los resultados obtenidos en el Hospital Clínic de Barcelona son muy similares al resto de series publicadas.

El problema principal de los riñones así obtenidos es la elevada incidencia de retraso en la función inicial del injerto, que según las series oscila entre el 48-78,4% (nosotros 50%) y el elevado porcentaje de riñones que nunca llegaron a funcionar entre 4-19% (en nuestro caso, 16,1%). Es importante conocer con detalle lo que ocurre en un riñón después de un período de isquemia caliente (durante la parada cardíaca) y su posterior reperusión con el objetivo de actuar sobre el potencial injerto.

## **5. Fisiopatogenia de lesión de isquemia – reperusión**

La lesión de isquemia-reperusión se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada. El resultado es una agresión tisular secundaria a la anoxia, a la privación de metabolitos y al acumulo de sustancias de deshecho del metabolismo que conduce a la muerte de la célula.

Durante el trasplante de un órgano este fenómeno ocurre, pudiendo ser la lesión de intensidad variable. Bien se puede alterar la función del órgano de forma discreta conllevando



a una disfunción inicial del injerto; bien puede convertirse en lesión irreversible, lo que imposibilitaría la viabilidad del órgano.

En los donantes a corazón parado, la lesión por isquemia es más importante, dado que se añade un tiempo de isquemia caliente, más o menos prolongado, a la habitual isquemia fría, de manera que existe un mayor riesgo para su viabilidad a corto y largo plazo.

El empeoramiento de la función del órgano derivado del daño producido por el síndrome de isquemia-reperfusión es todavía un problema importante en el trasplante de órganos sólidos. Las alteraciones celulares, inducidas por la isquemia, preparan al tejido para el siguiente daño que ocurre durante la fase de reperfusión. Paradójicamente, el reestablecimiento del flujo sanguíneo al tejido isquémico puede causar mayor daño que el inducido durante el período de isquemia.

El síndrome de isquemia-reperfusión es una secuencia compleja de sucesos trascendentales: la alteración metabólica celular que aparece durante el período de isquemia y la lesión producida por los radicales libres derivados del oxígeno y otros factores que involucran al endotelio vascular y los polimorfonucleares durante la reperfusión<sup>131</sup>.

### **Alteraciones celulares durante la isquemia**

Durante el período de isquemia se produce una alteración de la membrana plasmática en el que se inhibe la actividad de la ATPasa Na-K, que es la bomba sodio-potasio transmembrana (transporta Na hacia el exterior celular y K hacia el interior), con lo que se produce una alteración del intercambio de los iones sodio, potasio y calcio, de modo que el potencial de membrana queda abolido. Debido a la elevada concentración de cloro fuera de la célula y a la presencia de proteínas dentro de la misma (efecto Donnan), se crea una presión oncótica coloidal intracelular alta, el cloro penetra dentro de la célula con un catión (sodio y/o calcio) arrastrando agua y el potasio sale fuera para mantener el equilibrio iónico con el

espacio intersticial. Todo ello conduce al edema celular, que junto a la activación de enzimas por el calcio tales como fosfolipasas (que provocarán lesión de las diferentes membranas: citoplasmática, mitocondrial, lisosomal), proteasas, ATPasas (deplección de ATP) y endonucleasas (fragmentación de cromatina) inducirán a la muerte por citólisis.

Por otra parte, la falta de oxígeno durante el período de isquemia impide la fosforilación oxidativa de la mitocondria. La escasa formación de ATP paraliza todas las funciones celulares que requieran energía y se estimula la glicólisis anaerobia, de modo que se forman ácido láctico e hidrogeniones, lo que da lugar a la acidosis intracelular<sup>132-134</sup>. Ésta provoca la activación de los enzimas de los lisosomas y conduce a la autólisis y muerte celular.

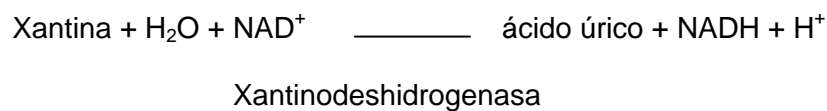
*Granger, Rutili y McCord*<sup>135</sup> fueron los primeros (1981) en proponer un mecanismo molecular (figura 1, página 45) para explicar la producción de lesiones en el síndrome de isquemia-reperfusión. Durante el período de isquemia se produce consumo de ATP por parte de las células para mantener la homeostasis. El ATP es catabolizado a ADP y AMP. El AMP, a su vez, se cataboliza a hipoxantina (HPX), con lo que se produce una acumulación de ésta. La carga energética de las células ha caído y éstas no son capaces de mantener el gradiente iónico entre sus membranas, de modo que el calcio se redistribuye hacia el interior de la célula, donde aumenta su concentración. Este calcio intracelular transforma la xantino-desidrogenasa en HPX y xantina (XO), acumuladas durante el período de isquemia. Esta transformación, junto con la presencia de XO intracelular, conforman los acontecimientos necesarios para producir la lesión en las células durante la posterior reoxigenación y la consecuente producción de radicales libres de oxígeno.

### **Alteraciones celulares durante la perfusión**

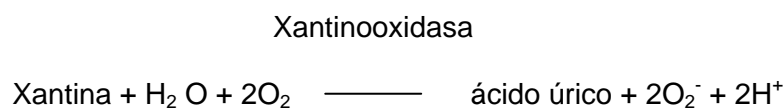
Durante el período de perfusión, el flujo sanguíneo se reinstaura, con lo que de nuevo llega oxígeno de forma importante a las células. La elevada concentración de calcio en el

citosol ocurrido durante la isquemia activa una proteasa capaz de convertir el enzima xantinodeshidrogenasa en xantinoxidasa <sup>136-138</sup> en presencia de NADPH (figura 1, página 32). La xantinoxidasa es la mayor fuente de superóxidos en tejidos postisquémicos <sup>132</sup>. Este enzima fue la primera fuente biológica documentada de producción del radical

superóxido. Es sintetizada en forma de xantinodeshidrogenasa (forma habitual en tejidos normóxicos). La xantinodeshidrogenasa no puede transferir electrones al oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno o superóxido, pero puede reducir el NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adeninnucleótido) de la siguiente manera <sup>139</sup> :

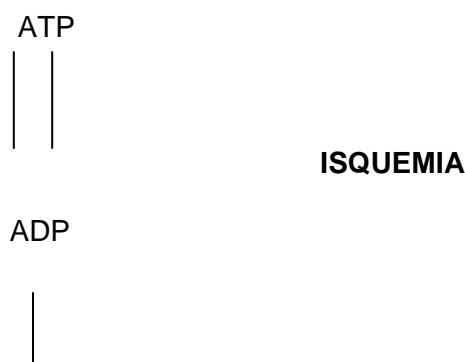


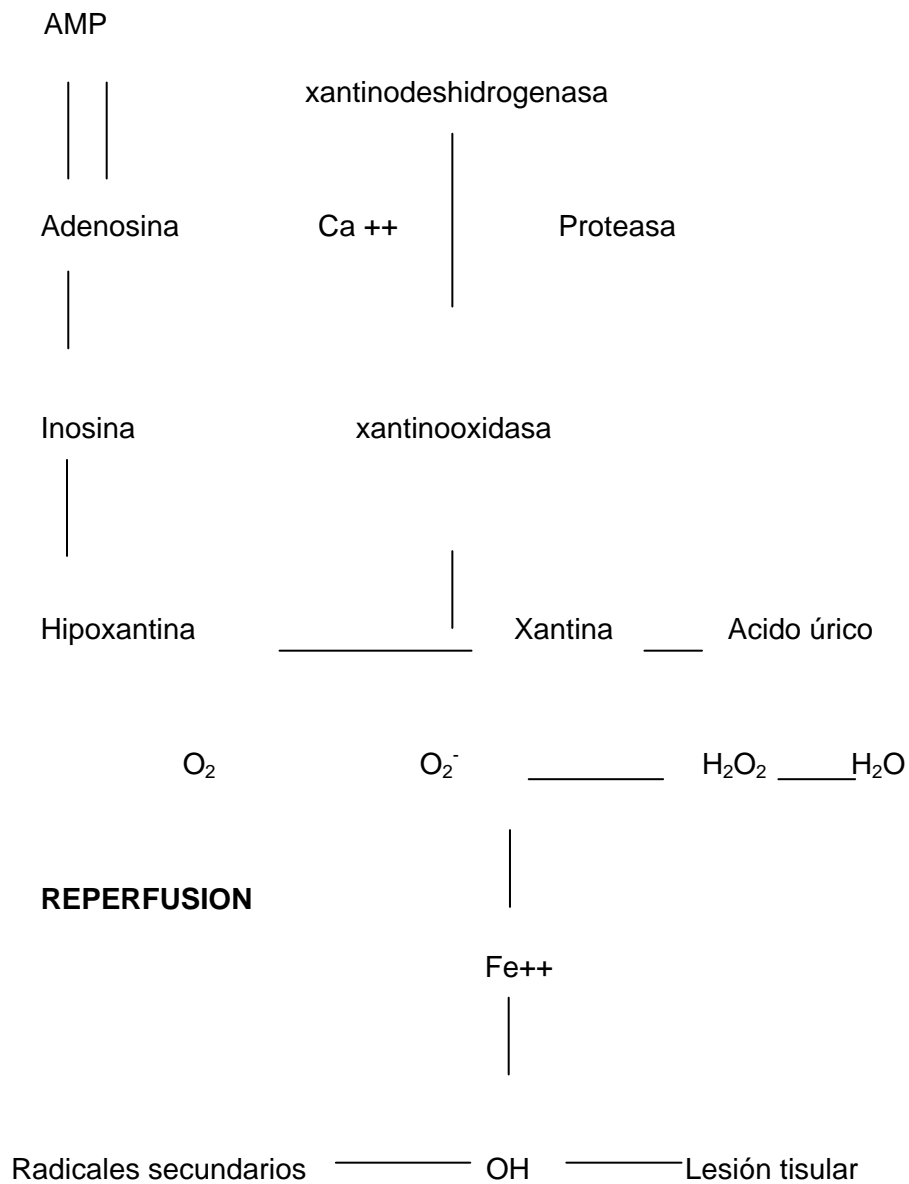
En condiciones de baja concentración de O<sub>2</sub> como ocurre durante la isquemia, la xantinodeshidrogenasa se convierte en xantinoxidasa. Ésta puede usar el oxígeno molecular en lugar del NAD, y produce superóxido y peróxido de hidrógeno de la siguiente manera <sup>139</sup> :



Así, la xantinoxidasa, aprovechando la acumulación de xantina e hipoxantina originadas durante la isquemia, junto con el oxígeno que le llega con la reperfusión, origina los denominados radicales libres de oxígeno (RLO) <sup>140</sup>.

**Figura 1.** mecanismo de producción del síndrome de isquemia-reperfusión <sup>139</sup>.





Los nucleótidos de la adenina se hidrolizan progresivamente durante el período de isquemia, con la consecuente acumulación de hipoxantina. Durante la reperfusión, la entrada masiva de oxígeno originará los RLO, que provocarán la lesión en los tejidos. Las oxipurinas son permeables a través de la membrana celular y pasan al espacio extracelular disminuyendo los precursores de la síntesis de ATP.

Los RLO son metabolitos tóxicos que representan estados intermedios de la reducción electroquímica del oxígeno a agua <sup>137,141</sup>. Se trata de moléculas que tienen un número impar de electrones en su órbita más externa, lo cual les hace ser altamente inestables desde el punto de vista químico y tienden a reaccionar rápidamente con otras

moléculas dando (oxidación) o recibiendo (reducción) electrones para estabilizar sus propias configuraciones electrónicas. Si dos radicales reaccionan, ambos son eliminados, pero si un radical reacciona con otra molécula no radical, se produce un nuevo radical libre. Esta característica de los radicales libres los hace capaces de participar en reacciones encadenadas. Estas reacciones pueden causar cambios importantes en las moléculas afectadas que se traducirán en lesiones intensas en los tejidos; por ejemplo, en el trasplante de órganos, tema que nos ocupa <sup>142</sup>.

Actualmente se piensa que los RLO causan dos tipos de lesiones:

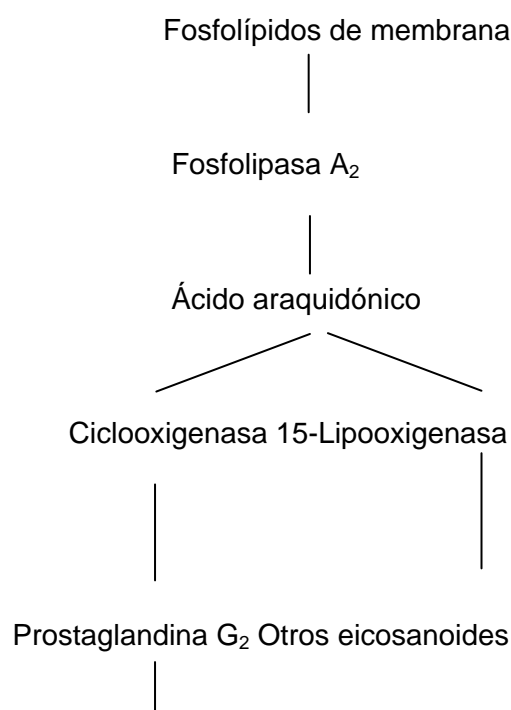
a) Daño celular producido por la oxidación de los lípidos, proteínas (principales componentes de las membranas celulares) y ácidos nucleicos. Este tipo de lesión se inicia a los pocos minutos de la reperfusión, de forma muy rápida, y está directamente inducida por los RLO. Consiste en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados situados en los fosfolípidos de las membranas celulares. Este fenómeno se denomina lipoperoxidación <sup>143-145</sup>. El daño producido por los RLO sobre las membranas de las células endoteliales conduciría a un aumento de la permeabilidad capilar.

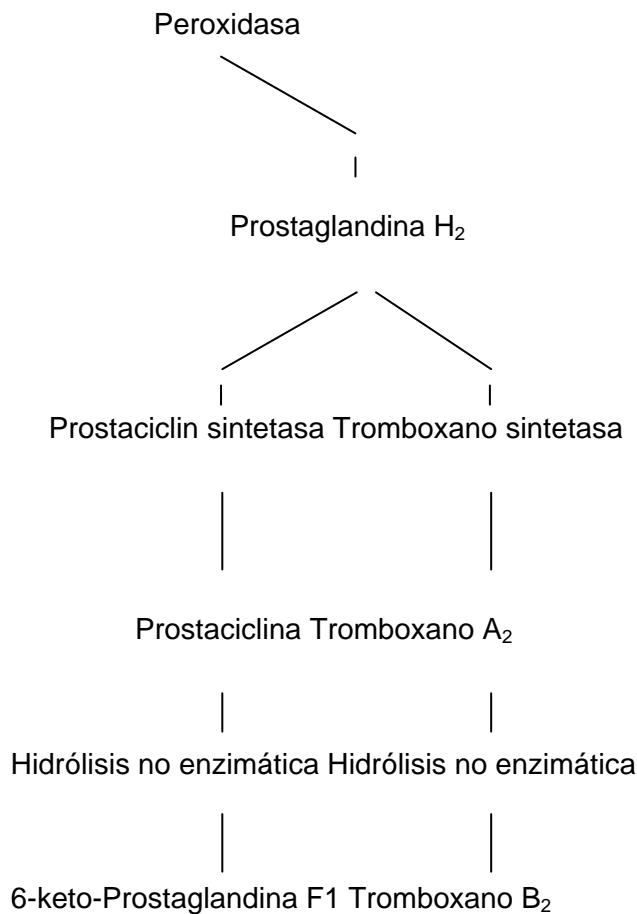
La alteración de la homeostasis del calcio celular con aumento de éste en el interior de las células y alteración en la función de la mitocondria por la falta de oxígeno conlleva a un incremento del calcio intracelular que activa la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> de la membrana plasmática <sup>146</sup>. Ésta, activada, hidroliza los fosfolípidos que contienen ácido araquidónico, lo que da lugar al factor activador de las plaquetas (PAF) y eicoisanoideos (tromboxano A<sub>2</sub> y prostaglandina I<sub>2</sub>) (figura 2, página 48).

b) Los RLO, producen una disfunción del endotelio vascular <sup>131,147-152</sup> y causan una disminución en la liberación de óxido nítrico que, junto con factores quimotácticos (PAF, LTB<sub>4</sub>, C5<sub>a</sub>), promueven un reclutamiento de PMN al lugar reperfundido. Estos leucocitos interaccionan con las células endoteliales siguiendo estos pasos:

1. Contactan con éstas por medio de su L-selectina de superficie, con la P-selectina de la célula endotelial (*rolling*).
2. Las citoquinas liberadas por el endotelio y los leucocitos en el tejido isquémico ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1) <sup>131</sup> activarán las integrinas inactivas de los leucocitos que están adheridos al endotelio (*triggering*).
3. Una vez activadas las moléculas de adhesión de los leucocitos:  $\beta_2$ -integrinas (CD11/CD18) se produce una firme adherencia entre éstas y las moléculas ICAM-1 y GMP-140 de la superficie de la célula endotelial. La agregación de los neutrófilos activados ocluye la microcirculación.
4. Los leucocitos ya podrán migrar del endotelio a los tejidos mediante su unión con la molécula PECAM-1 situada en la unión entre las células endoteliales y producirán daños en los tejidos, con lo que liberarán enzimas proteolíticos como elastasa, colagenasa, gelatinasa, etc.

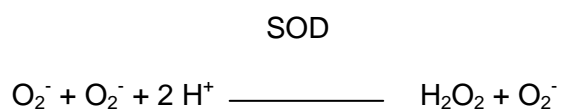
**Figura 2.** Metabolismo del ácido araquidónico en las células endoteliales <sup>139</sup>





El organismo ha desarrollado un sistema para defenderse de las lesiones producidas por el fenómeno de isquemia-reperfusión explicado:

Las células del endotelio generan unos enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-peroxidasa) que son capaces de inhibir y eliminar los RLO <sup>153-160</sup>. De esta manera, se frena la lesión y la actividad inflamatoria que se produce en los tejidos durante la reperfusión. La catalasa y la glutatión peroxidasa inactivan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La SOD es un enzima protector que limpia eficiente y específicamente el radical superóxido, catalizando su dismutación a peróxido de hidrógeno y oxígeno <sup>139</sup>:



También las células endoteliales son capaces de sintetizar <sup>161</sup> varias sustancias como eicosanoides (prostaglandinas) y óxido nítrico, que jugarían un papel importante en la

protección del injerto renal frente al síndrome de isquemia-reperfusión. Las prostaglandinas reducen el grado de infiltración y activación leucocitaria y agregación plaquetar, presentan acción vasodilatadora y mejoran la hipoxia y el daño tisular. El óxido nítrico es capaz de combinarse con los RLO <sup>162,163</sup> e inhibir la adhesión de los leucocitos a los capilares y favorecer la producción de prostaglandinas <sup>164</sup>.

## 6 El TGF-beta1 (TGF-β1)

El TGF-β (*transforming growth factor* o factor transformador del crecimiento) es una citoquina necesaria para el desarrollo de la vida y cuya acción, a pesar de ello, se ha relacionado con la patogénesis de algunas enfermedades renales, entre ellas la patología renal crónica.

El TGF-β es un péptido producido por células víricas o químicamente transformadas <sup>165</sup>. Fue descrito por primera vez en 1983 y extraído de placenta humana <sup>166</sup>. Las plaquetas humanas fueron reconocidas como almacenadoras de grandes cantidades de este péptido <sup>167,168</sup>. Posteriormente, el TGF-β fue extraído también de los riñones bovinos <sup>169</sup>, pero su importancia en la patobiología renal todavía no había sido reconocida. La comunidad uronefrológica tardó unos años en conocer el importante potencial del TGF-β en la patogénesis de las enfermedades renales crónicas <sup>170</sup>.

La existencia de receptores específicos del TGF-β se demostró por primera vez en la línea celular de los fibroblastos renales <sup>171</sup>. La presencia de una gran dispersión de los receptores del TGF-β en muchas células de origen epitelial o mesenquimal reforzó la posibilidad de que se tratara de una molécula con diversas funciones biológicas.

El TGF-β es un factor de crecimiento de 25-kDa de la familia de los polipéptidos diméricos, con una amplia gama de efectos biológicos. Se describieron tres isoformas distintas de TGF-β en los mamíferos; TGF-β1, -β2, y -β3, y parecieron tener idénticas actividades



biológicas *in vitro* <sup>165</sup>. De éstos, TGF- $\beta$ 1 tiene la más amplia distribución, habiendo sido identificado en plaquetas, macrófagos y casi todos los tejidos examinados, incluyendo los renales <sup>172,173</sup>. El TGF- $\beta$ 1 es un derivado de un precursor largo que se parte para producir un péptido carboxi-terminal. El homodímero de este péptido está asociado de manera no covalente con un dímero del propéptido amino terminal procesado denominado LAP <sup>172</sup>. El complejo latente de TGF- $\beta$  excretado es incapaz de ocupar los receptores del TGF- $\beta$  hasta que el péptido biológicamente activo se disocia de la LAP <sup>172</sup>. La LAP se degrada poco después de su disociación. Existen varios factores capaces de liberar el TGF-beta de este complejo, entre los que se cuentan: alteraciones en el pH, diversas enzimas proteolíticas y la trombospondina proteínica <sup>174</sup>. En este nivel, la actividad permanece bajo control. El TGF-beta activo también puede ser inhibido por factores locales, tales como la decorina proteoglicana, a la que se asocia de modo reversible <sup>175</sup>.

El gran complejo latente del TGF- $\beta$ , que está compuesto por el LAP-TGF- $\beta$  y por el LTBP (proteína que se une al TGF- $\beta$  latente), fue identificado en los glomérulos renales <sup>176</sup>. El LTBP juega un importante papel, ya que identifica en el medio extracelular el TGF- $\beta$ . Ambas proteínas resultan importantes reguladoras de la bioactividad y el foco (diana) del péptido. La única manera de conferir efectividad biológica al TGF- $\beta$  es unirlo a estas proteínas.

Existen tres clases conocidas de receptores de TGF-beta (TGFR) demostrados hasta ahora, pero sólo dos de ellas, el TGFR I y el TGFR II, están involucradas en la señalización de vías. El receptor del TGF- $\beta$  tipo II parece ser el más importante receptor de señales del TGF- $\beta$ . El tercer tipo, el TGFR III, comprende dos proteínas relacionadas, el betaglicano y la endolina, que unen el TGF-beta a la superficie de la célula y lo presentan a los demás receptores <sup>177</sup>. El mecanismo de señales intracelulares y la regulación de los receptores resultan fundamentales para comprender cómo contribuye el TGF- $\beta$  en la patología renal <sup>170</sup>. Los procesos intracelulares que se producen tras la activación de los receptores de TGF-beta ya han sido elucidados con gran detalle. Implican un tipo de proteínas denominado *Smads* (*drosophila*

*gene mothers against dpp*), responsables de transferir la información procedente de los receptores activados al núcleo, donde actúan directamente sobre las secuencias que promueven el DNA <sup>178</sup>.

El TGF- $\beta$  es un factor de crecimiento y puede actuar bajo ciertas condiciones como factor mutagénico. No obstante, en ciertas circunstancias puede actuar como factor anticrecimiento en algunas células. La comprensión de los mecanismos por los cuales el TGF- $\beta$  puede provocar la parada del ciclo celular a través de sus acciones en las kinasas de dicho ciclo es: cdk4, cdk2, p21/27 y p15. El conocimiento actual no aclara el papel que juega la parada del ciclo celular en el riñón normal y en el patológico. Sin embargo, ciertas circunstancias eventuales sugieren que el TGF- $\beta$  desempeña un importante papel durante la recuperación de las lesiones tubulares y la reducción de la respuesta inflamatoria.

TGF-beta se considera como una molécula reguladora, que actúa para restablecer el equilibrio tras desviaciones de la normalidad. Evita la adhesión de neutrófilos al endotelio <sup>179</sup> y su consiguiente transmigración <sup>180</sup>. También inhibe la proliferación de monocitos y linfocitos <sup>181,182</sup>, y puede provocar apoptosis linfocitaria <sup>183</sup>. De hecho, el TGF-beta parece provocar la reducción de la inflamación, preparando la reparación tisular, y ello se relaciona con el papel que juega en el recambio de la matriz extracelular (MEC) y la fibrosis. Los fibroblastos son estimulados por el TGF-beta para producir proteínas de matriz, como el colágeno y la fibronectina <sup>184</sup>. El TGF-beta también es importante para evitar la degradación de la matriz, ya sea reduciendo la síntesis de las enzimas proteolíticas, ya sea aumentando los niveles locales de sus inhibidores específicos <sup>185,186</sup>. En muchas condiciones patológicas, una fibrosis inadecuada ha sido vinculada con una sobreexpresión de TGF-beta.

Algunas observaciones generales realizadas tanto *in vivo* como *in vitro* en la musculatura lisa vascular, pueden aplicarse a los riñones y sus patologías, sobre todo porque la mayoría de las células mesangiales derivan de células de la musculatura lisa celular, y el mesangio generalmente se comporta en muchos aspectos como la musculatura lisa vascular.

Dentro de las interacciones del TGF- $\beta$  con la musculatura lisa vascular se encuentra la inhibición de la expresión de iNOS.

Durante la embriogénesis, el TGF- $\beta$  se expresa transitoriamente, lo cual sugiere su contribución en la organogénesis normal, de modo que muchos eventos de la tubulogénesis embriológica parecen repetirse durante la recuperación tubular renal después de una lesión aguda <sup>170</sup>. Los efectos del TGF- $\beta$  sobre la síntesis de las proteínas de la MEC también pueden contribuir a la recuperación de los túbulos renales cuando están dañados. Por otro lado, una sobreexpresión del TGF- $\beta$  puede producir, entre otras lesiones, niveles séricos elevados del TGF- $\beta$  y asociación con la esclerosis glomerular y la fibrosis tubulointersticial renal <sup>170</sup>.

Las nefronas están organizadas de forma segmentaria, y los estudios son cuidadosos al observar la organización anatómica de la expresión de péptidos y receptores en el riñón. Recientemente se ha comprobado la expresión y localización del TGF- $\beta$  y sus respectivos receptores en los diferentes segmentos de la nefrona. Los datos disponibles revelan una amplia dispersión de expresión del TGF- $\beta$  por toda la nefrona, quizá con diferencias cuantitativas en su expresión. No ocurre lo mismo con la expresión de los receptores de señales, mucho más limitados en su amplitud de dispersión, por los segmentos de la nefrona <sup>170</sup>.

Abundantes líneas de investigación clínica y estudios experimentales demostraron importantes implicaciones del TGF- $\beta$  en el control de la síntesis, y la disminución del metabolismo de matriz proteica extracelular, tales como fibronectinas, colágenos y proteoglicanos responsables de la esclerosis glomerular en varios tipos de enfermedades glomerulares. Una elevada bioactividad del TGF- $\beta$  contribuye a la acumulación de MEC en el riñón, y su consiguiente y progresiva también fue ya demostrada. Se ha observado que la hiperglicemia puede inducir por sí misma síntesis y expresión del TGF- $\beta$ , y de esta manera contribuir con un papel clave en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética <sup>170</sup>.

Con respecto al rechazo de un alotrasplante renal, múltiples observaciones sugieren que el TGF- $\beta$  juega un papel primordial en el desarrollo de la fibrosis en el rechazo crónico. Además, el TGF- $\beta$  también se ha asociado con la aparición del infiltrado celular del rechazo agudo <sup>187</sup>.

Por otro lado, este péptido también actúa mediante una regulación funcional preventiva en el riñón. Esto puede demostrarse por medio de los efectos del TGF- $\beta$  en la inhibición de la citotoxicidad renal por las células T. De hecho, la expresión aumentada del TGF- $\beta$  en algunas enfermedades renales puede proteger frente a una posible excesiva infiltración linfocítica que pudiera ocurrir como respuesta fisiológica a la agresión.

El TGF- $\beta$  se ha descrito como una sustancia capaz de estimular la proliferación celular *in vitro*. Sin embargo, generalmente se la considera como inhibidor de la proliferación y promotor de hipertrofia y diferenciación celular <sup>172</sup>. Una bioactividad común del TGF- $\beta$  es la promoción de la acumulación de MEC que surge a causa de procesos crecientes de síntesis de proteoglicanos de la matriz, como el colágeno y las fibronectinas <sup>172,176</sup>, y la inhibición de las proteasas, como el TIMP (*tissue inhibitor of metalloprotease*) y el PAI (*plasminogen activator inhibitor-1*) <sup>172</sup>.

A continuación se resumen algunos de los *principales efectos* de esta citoquina:

- i) Activa la proliferación endotelial.
- ii) **Aumenta la síntesis de matriz extracelular** ((MEC) estimulando para ello la producción de colágeno I, III, V y VI, fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopondina, trombospondina y glicosaminglicanos de la matriz por su unión con el factor nuclear-1).
- iii) **Evita la degradación de la MEC** mediante la inhibición de proteasas (inhibiendo la transcripción de colagenasas y estromalina, aumentando el TIMP y el PAI-1).

iv) Favorece el **ensamblaje de las fibras** de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina y proteoglicanos para producir estroma intersticial.

v) **Favorece los procesos de adhesión celular** (aumenta la producción de LFA-1 e integrinas).

vi) TGF- $\beta$  se opone a la acción de determinados mitógenos tales como el EGF (*Epidermal growth factor*) en los queratinocitos; interleuquinas 1 y 2 (IL-1 y IL-2) en los linfocitos; IL-3, GM-CSF (factor estimulador de colonias granulocito-macrófago) en células progenitoras hematopoyéticas.

vii) Estimula la producción de otras sustancias como la endotelina-1 (potente vasoconstrictor, marcador de daño vascular y relacionada con el desarrollo de rechazo crónico).

El TGF- $\beta$  tiene muchos efectos diferentes, pero predominan dos sobre todos los demás: el efecto fibrogenético y el efecto inmunomodulador, que en la patología renal (glomerulonefritis y trasplante renal) se presentan como dos facetas parcialmente contrapuestas. Por un lado, el que podríamos denominar “lado brillante”, con un efecto antiproliferativo de líneas celulares relacionadas con la respuesta celular, es decir, un efecto inmunosupresor; y un “lado oscuro”, con un efecto fibrótico importante a nivel tisular. Todavía está sin esclarecer cuándo el TGF- $\beta$  ejerce cada uno de estos diferentes efectos. Algunos estudios orientan esta duplicidad de efectos a la conducción de la señal intracelular de TGF- $\beta$  que se lleva a cabo por medio de unas proteínas señalizadoras conocidas como *Smad*. La fosforilación de las *Smad 2* y *4* principalmente podría hacer llegar la señal de TGF- $\beta$  hasta el interior del núcleo celular, donde se iniciaría la transcripción de ciertos genes. El estado de fosforilación de estas proteínas sería clave, ya que condicionaría una respuesta u otra.

Con respecto al papel del TGF- $\beta$  como inmunomodulador, se han publicado trabajos recientes que atribuyen a esta citoquina un papel crucial en el desarrollo de procesos tumorales en pacientes con tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A, ya que induce la producción de cambios fenotípicos y diferencia tumores que tenían carácter no-invasivo en

células malignas. Estos estudios muestran que el tratamiento con ciclosporina A sobre células de estirpe adenocarcinomatosa produce cambios morfológicos, descomposición de la membrana celular, aumento de la motilidad celular y crecimiento invasivo. Estos cambios se previenen mediante tratamiento con anticuerpos monoclonales para TGF- $\beta$ . Estos hallazgos sugieren que la ciclosporina puede promover la progresión de la célula cancerígena por un efecto directo sobre la célula que es independiente de su efecto sobre las células de estirpe inmunológica del paciente inmunodeprimido (linfocitos T) y que el TGF- $\beta$  está implicado en este mecanismo.

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 1 mRNA está presente en todos los segmentos de la nefrona <sup>188</sup>, y el TGF- $\beta$  ha sido localizado en riñones normales utilizando técnicas inmunohistoquímicas <sup>189</sup>. Se consideró que el TGF- $\beta$  era el agente causante de las patologías asociadas con el aumento de la deposición de matriz, como la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial <sup>173</sup>. Muchos estudios demostraron la correlación entre TGF- $\beta$  glomerular elevado y la producción exacerbada de matriz y proteinuria <sup>173</sup>.

Así, en el riñón el TGF- $\beta$  parece ser un mediador entre diferentes eventos patobiológicos que, al fin y al cabo, dan como resultado el aumento de la acumulación de matriz proteica en el glomérulo y determinan fallo renal progresivo en el intersticio renal. La expresión fisiológica del TGF- $\beta$ , sus receptores y proteínas de soporte, sugieren contribuciones en la función normal y la estructura de la nefrona. Todo esto puede incluir funciones antiinflamatorias y funciones en regulación fisiológica del recambio celular renal. Así pues, el TGF- $\beta$  no debería ser visto como la “citoquina negativa” de esta intrincada regulación de fisiología renal. El TGF- $\beta$  parece ser una molécula clave y en el núcleo de muchos procesos celulares de capital importancia, entre ellos la reparación tisular. Está localizada más profundamente en el núcleo de los eventos biológicos, y muchos otros eventos biológicos aparentemente independientes parecen convergir en ella.

Para valorar la función del TGF-beta en los procesos biológicos es imprescindible realizar una valoración precisa de sus niveles. Desgraciadamente, esto no resulta muy sencillo. En concreto, a pesar de que muchos estudios miden los niveles absolutos de TGF-beta como proteína o transmisor de RNA (mRNA), es posible que eso no refleje la actividad biológica a causa de la complejidad de los procesos de liberación y activación de TGF-beta. Tal como hemos descrito, el TGF-beta se libera como complejo inactivo asociado con el LAP, y la mayor parte de anticuerpos que se han usado en estudios inmunohistoquímicos detectan este complejo, pero también su forma activa. Una vez activado, el TGF-beta también puede ser inhibido por factores locales. De aquí que, aunque la medición de la transcripción genética, en los análisis de mRNA, pueda indicar que están aumentando los niveles de TGF-beta, de ello no se desprende necesariamente que se esté produciendo un aumento en la inhibición o destrucción de la forma activa. Algunos estudios han usado los niveles plasmáticos del TGF-beta en un intento de reflejar la actividad tisular, pero este enfoque es cuestionable debido al alto contenido de TGF-beta existente en plaquetas <sup>190</sup>.

En estos momentos no existe ningún método estándar para valorar la actividad del TGF-beta. Algunos grupos han empleado coloración de anticuerpos diferenciales de TGF-beta activo y latente <sup>191</sup>, pero pocos estudios confirman la precisión de ese método hoy día. Otro consiste en usar ensayos de unión de ligandos empleando receptores de TGF-beta que en teoría sólo deberían unirse a la forma activa de TGF-beta <sup>192</sup>. Desgraciadamente, estos enfoques únicamente resultan apropiados para especímenes no procesados, por temor a que una fijación tisular pueda causar una disociación entre el TGF-beta y el LAP.

### **El TGF-β1 en la patología renal**

Existen pruebas significativas que defienden el papel del TGF-beta en la fibrosis renal. Ya en antiguos experimentos *in vitro* se demostró que la administración de TGF-beta a células mesangiales causaba proliferación <sup>193</sup> y síntesis de las proteínas de matriz <sup>194</sup>. Las células epiteliales glomerulares cultivadas también producen proteínas de EMC, como fibronectina y

colágeno, en reacción al TGF-beta<sup>195,196</sup>. En un elegante modelo *in vivo*, *Isaka et al.*<sup>197</sup> produjeron una transfección del gen TGF-beta a riñones de rata usando un vector viral introducido por la vena renal. La sobreexpresión de TGF-beta fue confirmada por inmunohistoquímica, y se produjo un claro aumento de la producción mesangial de la matriz, que se hizo evidente a los tres días de la transfección. Recientemente, el mismo grupo ha logrado introducir oligonucleótidos antisentido contra el TGF-beta en ratas con glomerulonefritis<sup>198</sup>. Los oligonucleótidos neutralizaron la acción del TGF-beta, con la consiguiente reducción significativa de la nefrosis.

*Yamamoto et al.*<sup>199</sup> investigaron el mecanismo por el que el TGF-beta puede llegar a causar fibrosis, con un modelo experimental de fibrosis renal suministrando suero antitimocito en ratas. Una sola inyección produjo lesiones celulares mesangiales que dieron lugar a un nivel máximo en los niveles de mRNA TGF-beta y proteínas aproximadamente siete días después de la inyección. Esto se asoció con la síntesis de MEC, pero posteriormente, como los niveles de TGF-beta descendieron, se produjo una resolución, y los glomérulos volvieron a la normalidad. Sin embargo, si antes de la resolución se aplicaba una segunda inyección de suero antitimocito, los niveles de TGF-beta se mantenían elevados, y esto iba acompañado de glomerulosclerosis severa y fibrosis intersticial. Los autores describieron el proceso como modelo de fibrosis “de dos dosis”, sugiriendo que como respuesta a la continuidad de la lesión ocurría un defecto en la regulación del TGF-beta, que acaso fuera debido al desarrollo de un asa autocrina. Otros modelos experimentales de lesión renal asociados con una expresión incrementada del TGF-beta incluyen diabetes inducida por estreptozotocina<sup>200</sup>, uropatía obstructiva<sup>201</sup> y fibrosis inducida por suministro de adriamina<sup>202</sup>.

### **Participación del TGF-beta en el trasplante renal**

El desarrollo de la fibrosis y el papel del TGF-beta en el trasplante renal ha sido estudiado principalmente con respecto al desarrollo de CAN. Existen varios factores de riesgo demostrados que se asocian con el desarrollo de CAN, y se ha comprobado que todos ellos



causan daños en el injerto. De hecho, hay una explicación ampliamente aceptada según la cual la CAN representa una respuesta estereotípica ante la lesión de un injerto renal, independientemente del agente o agentes iniciales <sup>203,204</sup>. El estudio de factores de riesgo individuales aislados, ya sea *in vitro* o usando modelos animales, ha demostrado que cualquiera de ellos puede influir en la expresión del TGF-beta, con lo que se respalda la proposición de que esta citoquina juega un papel en el desarrollo de la CAN.

Los principales estimulantes de la síntesis del TGF-beta descritos hasta ahora son <sup>205</sup> :

- Hipertensión arterial (por medio de péptidos vasoactivos tales como Ang-II, ET-1, etc.)
- Inhibidores de la calcineurina
- Dislipidemias
- Hiperglucemia

Estos factores estimulantes del TGF-beta coinciden en su mayor parte con los factores de riesgo no-inmunológico para el desarrollo de CAN <sup>206</sup> (tabla 1).

**Tabla 1** - Factores de riesgo para la nefropatía crónica en trasplantes:

- Episodios de rechazo agudo
- Lesión inmune crónica
- Lesión por isquemia-reperfusión
- Toxicidad de los fármacos inmunosupresores
- Hiperlipidemia
- Hipertensión

### **El TGF-β1 y la lesión inmunológica aguda en el trasplante renal**

El TGF-β1 es un factor de crecimiento multifuncional que influye en el desarrollo celular, así como en procesos celulares fisiológicos. En muchos casos, el TGF-β1 puede llevar a una beneficiosa respuesta cicatricial y reparadora, pero existen claras situaciones en las que no.

De cualquier modo, el significado del aumento del TGF- $\beta$ 1 después de la lesión isquémica no se podrá comprender adecuadamente hasta que otros experimentos o publicaciones establezcan sus verdaderos efectos negativos. Es importante observar que el incremento del TGF- $\beta$ 1 mRNA es capaz de jugar un importante papel en la recuperación estructural y renovación celular renal, sin conducirlo a lesiones crónicas o cicatrices detectables <sup>187</sup>.

La tubulitis renal es un fenómeno patológico que está definido por el infiltrado renal compuesto por las células mononucleares que hayan atravesado la membrana basal tubular e infiltrar las células epiteliales tubulares (TEC) y entre las mismas. La vasculitis, junto con la extensión de la presencia de la tubulitis, son utilizadas en el protocolo cuantitativo del score de *banff* para definir la severidad de las lesiones histológicas en el rechazo agudo del injerto renal <sup>207</sup>. Sumando a este papel en el diagnóstico del rechazo, queda claro que la lesión en la membrana basal y en el epitelio tubular por sí mismas pueden contribuir a su eventual mala evolución, observada durante un episodio de rechazo renal <sup>208</sup>. Actualmente, el criterio de *banff* está ampliamente utilizado en el diagnóstico del rechazo y para que se pueda vigilar la eficacia de la terapia antirrechazo.

Recientemente se ha publicado que en todas las muestras de biopsias renales que presentaban rechazo celular agudo, la expresión del TGF- $\beta$ 1 estaba concentrada principalmente en el epitelio tubular, donde siempre se distribuye difusamente; no obstante, en algunos casos, se observarán concentraciones en la superficie basolateral del túbulo o dentro de células epiteliales individualizadas. Una distribución focal ha sido vista algunas veces en grupos tubulares aislados. En algunas preparaciones, las mayores concentraciones del TGF- $\beta$ 1 se encontraron en células aisladas dentro del infiltrado inflamatorio y han sido incluidas con frecuencia en linfocitos intra-tubulares <sup>209</sup>. Por otro lado la distribución del TGF- $\beta$ 1, dentro del aloinjerto renal durante el rechazo agudo está concentrado en los túbulos, de localización predominante yuxtacorticales <sup>209</sup>.

El grupo de *Paul et al.*<sup>210</sup> examinó la expresión de TGF-beta mRNA en esos modelos experimentales de trasplante en ratas con análisis *Northern-blot* del tejido renal, y demostró que en ambos se veía incrementada a las dos semanas, cuando se comparaba con riñones normales o controles de isoinjerto. Al cabo de un mes, aproximadamente, los niveles en los riñones de los *F344 a Lew* que desarrollaron CAN seguían aumentando, pero en el otro grupo no se diferenciaban de los de los controles. Otro grupo también usó análisis *Northern-blot* para medir TGF-beta mRNA en el modelo *F344 a Lew*, y mostró que en determinados momentos, entre 4 y 52 semanas después del trasplante, los niveles eran significativamente elevados si se los comparaba con los controles de isoinjerto<sup>211</sup>. Este hecho se vinculó con la fibrosis marcada, e indujo a los autores a sugerir que el TGF-beta tiene un rol causativo en la expansión de matriz que sucede en la CAN. En un modelo con ratones de trasplante renal que desarrolla modificaciones similares a las de la CAN, la expresión de TGF-beta se incrementó tanto por inmunohistoquímica como por análisis *Northern*<sup>212</sup>.

En un foco de lesión crónica hay gran cantidad de células inflamatorias que producen citoquinas y factores de crecimiento, sobre todo macrófagos y células T. También se dan cambios fenotípicos en poblaciones de células residentes, y tanto las células mesangiales como las tubulares epiteliales contribuyen al proceso fibrótico en desarrollo. Los fibroblastos residentes se caracterizan por la expresión de actina muscular alfa-lisa, y parecen adoptar características de las células musculares lisas que hacen que se las describa como miofibroblastos<sup>213</sup>. En un estudio experimental de cicatrización renal, el citoplasma de los miofibroblastos mostró inmunopositividad para TGF-beta, lo cual sugiere un importante papel en el desarrollo de la fibrosis, aunque este aspecto aún debe ser claramente definido<sup>214</sup>. En un estudio inmunohistoquímico en muestras de biopsia humana, los miofibroblastos, tal como habían sido identificados por coloración para la actina muscular alfa-lisa parecieron estar vinculados con la CAN<sup>215</sup>.

El factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF) es importante en la fibrosis renal, ya que se trata de un potente mitógeno que estimula la proliferación de miofibroblastos<sup>216</sup> y las células mesangiales<sup>217</sup>. La acción del TGF-beta sobre el crecimiento de las células mesangiales está mediado, al menos en parte, por la estimulación de PDGF<sup>193</sup>. Ciertos estudios sobre la transfección de genes han mostrado que el TGF-beta y el PDGF actúan en tándem para causar glomerulosclerosis estimulando la síntesis de MEC y la proliferación celular, respectivamente<sup>197</sup>.

Existen varios factores de crecimiento y citoquinas cuyas interacciones con el TGF-beta en la fibrosis aún han de ser plenamente esclarecidas. Los factores de crecimiento del fibroblasto (FGF) son una familia de moléculas producidas por macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas, que, según se cree, están implicadas en la respuesta a la lesión. Estimulan la proliferación de fibroblastos y la producción de proteínas MEC<sup>218</sup>. Los niveles de mRNA-FGF aumentan en el modelo *F344 a Lew* de CAN<sup>210</sup>. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es un promotor de la angiogénesis, se encuentra en niveles crecientes en el intersticio de los especímenes de biopsia de riñón procedentes de pacientes con CAN<sup>219</sup>, y es producido por células mesangiales cultivadas como respuesta a la angiotensina II<sup>220</sup>. La interleucina *in vitro* provoca proliferación de fibroblastos<sup>221</sup>, y el factor activador de plaqueta estimula la deposición de MEC por parte de las células mesangiales, probablemente mediante un mecanismo dependiente del TGF-beta<sup>222</sup> que estimula la síntesis de VEGF.

## 7. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DEL RECHAZO CRÓNICO

### Episodios previos de rechazo agudo

Los episodios de rechazo agudo, y en particular aquellos que son severos o recurrentes, son un factor de riesgo mayor para el desarrollo de CAN<sup>223</sup>. Causan lesión al injerto por medio de varios mecanismos entre los cuales figuran la citotoxicidad celular directa y el daño mediado por complemento. *Nagano et al.*<sup>224</sup> estudiaron el rechazo agudo en un

modelo de ratas usando una combinación de cepas en las que se desarrollaba un rechazo agudo inmediatamente después del trasplante. Demostraron que los niveles de TGF-beta1 mRNA en riñón aumentaron significativamente unos tres días después del ataque de rechazo agudo, un rasgo que no había sido apreciado en controles de isoinjerto.

### **Infección por citomegalovirus (CMV)**

Se ha descrito que la infección por CMV hace aumentar la expresión de ciertos antígenos HLA poco expresados habitualmente y este hecho mantiene un estado inflamatorio que favorece la lesión crónica.

## **8. Aspectos no inmunológicos y su relación con el TGF-beta**

### **Hipertensión arterial (HTA)**

Un estudio reciente en más de 29.000 pacientes confirmó que la hipertensión está asociada con la disfunción crónica de trasplante renal <sup>225</sup>. Recientemente, el grupo de *Tilney* <sup>226</sup> indujo hipertensión en el modelo *F344 a Lew*, revelando que ésta llevaba a modificaciones histológicas más severas, y que estaba asociado con una posterior regulación del TGF-beta medido por inmunohistoquímica. Una investigación del papel de la hipertensión en la fibrosis renal ha mostrado evidencia de una compleja interacción entre el sistema de renina-angiotensina y el TGF-beta, sobre la que trataremos detalladamente más adelante.

### **Relación angiotensina II y el TGF-beta**

La primera evidencia descrita de que la angiotensina II (All) pudiera inducir la expresión del TGF-beta ocurrió en 1991 <sup>227,228</sup>. Seis años después, *Hahn et al.* <sup>227</sup> publicó que la All estimulaba el TGF-beta mRNA, con lo que se estableció la primera relación directa entre All y

el TGF-beta<sup>227</sup>. AII también induce el TGF-beta en cultivos de células endoteliales cardíacas<sup>229</sup> y fibroblastos cardíacos<sup>230</sup>. Por consiguiente, se puede admitir que una inducción AII-mediada del TGF-beta juega un importante papel en la hipertrofia cardíaca y en la remodelación vascular<sup>205</sup>.

El inductor más importante y relevante del TGF-beta en las células renales es la AII, lo que implica que parte del efecto renoprotector de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina<sup>231</sup> está relacionado con el bloqueo de la producción del TGF-beta. Estudios de cultivo celular demostraron que la AII estimula la producción del TGF-beta en las células tubulares proximales<sup>232</sup> y las células mesangiales<sup>233</sup>

La AII puede ser un importante mediador en la hipertrofia renal compensatoria después de la pérdida de nefronas<sup>234</sup>. Además, se ha descrito que la expresión del TGF-beta se ve estimulada en los riñones remanentes que desarrollarán hipertrofia compensatoria. Por consiguiente, parte de los efectos de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) en el retardo del desarrollo de la patología renal terminal en dichos riñones remanentes puede ser debido a la inhibición del TGF-beta<sup>235</sup>.

La producción del TGF-β1 puede ser modulada por el sistema renina-angiotensina (SRA) intrarrenal. Del mismo modo, la angiotensina II (AII) induce la producción y secreción del TGF-β1 por las células mesangiales, así como por un efecto directo de la ciclosporina A, que estimula la síntesis y expresión del TGF-β1 *in vitro* y en sistemas de cultivo celulares y de tejidos<sup>236,237</sup> (tabla 2).

La AII estimula la producción y la activación renal del TGF-β1 por medio de los receptores de la angiotensina II tipo-1 (AT1), y la activación del SRA intrarrenal y la sobreexposición renal del TGF-β1 mediante la AII y la ciclosporina A. Todo este mecanismo se encuentra bien descrito en la CAN.

**Tabla 2.** Situaciones en las que la AIJ puede estimular la expresión del TGF-beta <sup>205</sup>:**Observaciones in vitro**

Células vasculares de la musculatura lisa

Fibroblastos cardíacos

Células endoteliales cardíacas

Células tubulares proximales

Células mesangiales

**Observaciones in vivo**

Obstrucción ureteral unilateral

2 riñones-1clip hipertensión

Nefrotoxicidad crónica por CSA

Privación de agua (la expresión del TGF-beta2 en el JGA)

Nefropatía diabética

Pérdida de masa renal

**Relación endotelina-1, tromboxano-A2 y nitritos/nitratos con el TGF-beta**

Las endotelinas pueden estimular la producción del TGF-beta porque los receptores antagonistas de la endotelina disminuyen la sobreexpresión del mRNA-TGF-beta glomerular en ratas diabéticas <sup>238</sup>. También se ha demostrado que el tromboxano-A2 es estimulador de la producción del TGF-beta en las células mesangiales <sup>239,240</sup>.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que el TGF-β1 aumenta la producción de la endotelina-1 (ET-1), que está considerada como el vasoconstrictor conocido más potente, responsable de un papel crucial en el control del tono vascular y potencialmente involucrado en el desarrollo del fallo renal crónico <sup>241,172</sup>. Además, el TGF-β1 inhibe la producción del óxido nítrico por parte de la célula endotelial <sup>242</sup>.

De hecho, el TGF- $\beta$ 1 juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la lesión renal, induciendo la fibrosis intersticial, la glomerulosclerosis y la proliferación arterial que conduce al síndrome de la hiperfiltración glomerular, que desencadena hipertensión arterial y proteinuria<sup>243,244</sup>. Todo este efecto nocivo es producido por la actuación conjunta del TGF- $\beta$ 1 y la ET-1, mediante un mecanismo sinérgico que acelera la fibrosis y el fallo renal. Es conocido que el TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de ET-1. Por lo tanto, la caída del TGF- $\beta$ 1 y de la ET-1 podría tener un papel protector importante y decisivo para impedir la progresión de la CAN<sup>245,246</sup>.

### **Dislipemias**

Puesto que las lesiones vasculares en CAN presentan rasgos similares a la arteriosclerosis, se ha considerado que una hiperlipidemia después del trasplante es un factor de riesgo<sup>247</sup>. Curiosamente, suministrar una dieta rica en colesterol a las ratas produce fibrosis renal intersticial a lo largo de las siguientes 12 semanas, lo cual se asocia con niveles elevados de TGF-beta<sup>248</sup>. Las células glomerulares humanas *in vitro* se estimulan para producir TGF-beta por medio de administración de lipoproteínas oxidadas de baja densidad<sup>249</sup>.

### **Hiperglucemia**

El ambiente rico en glucosa lleva a importantes cambios en el crecimiento celular y en el metabolismo del MEC<sup>250</sup>. Niveles altos de glucosa estimulan la hipertrofia de las células tubulares proximales y la producción de los colágenos tipo I y IV<sup>251</sup>. La glucosa elevada también estimula el crecimiento de las células mesangiales<sup>252</sup> y la producción de fibronectinas y colágeno en las células glomerulares<sup>253,254</sup>.

La lesión renal por la hiperglucemia es la mayor causa de insuficiencia renal en las naciones industrializadas. Múltiples manifestaciones de la nefropatía diabética pueden ser



debidas a la producción y/o respuesta alterada de las citoquinas o factores de crecimiento. El TGF-beta es uno de ellos porque promueve la hipertrofia de las células renales y regula la producción de moléculas de ECM. Además, el ambiente celular rico en glucosa aumenta el mRNA-TGF-beta y los niveles de proteínas en cultivos de células tubulares proximales, del epitelio glomerular y de las células mesangiales. Cuando neutralizamos los anticuerpos anti-TGF-beta o los antisensos oligodeoxynucleotides del TGF-beta, prevenimos el efecto hipertrófico de la glucosa elevada o la estimulación de la síntesis del MEC en las células renales. El incremento de los niveles del TGF-beta intrarrenal reduce significativamente el peso renal, así como la hipertrofia glomerular, y disminuye el incremento de los niveles de ECM. Los factores que participan del aumento de la actividad renal del TGF-beta involucran la hiperglucemia *per se* y también las acciones intermediarias de otros potentes mediadores como la angiotensina II, el tromboxano, las endotelinas, y los factores de crecimiento derivado de las plaquetas<sup>255</sup>.

En los mecanismos patogénicos de nefropatía por hiperglucemia, ha sido posible identificar uno o más factores de crecimiento o sustancias autocrinas/parocrinas como posibles mediadores de patología renal. Todo lo publicado hasta ahora favorece la hipótesis de que la producción elevada y/o la actividad del TGF-beta en el riñón son importantes mediadores de la hipertrofia renal diabética y la expansión de la MEC tanto en modelos experimentales como en la nefropatía diabética humana<sup>255</sup>.

### **Inhibidores de la calcineurina: CSA y FK como estimuladores del TGF-beta**

Cada vez se acepta más el hecho de que los medicamentos inmunosupresores modernos pueden producir efectos adversos en los injertos renales<sup>256</sup>. En modelos experimentales con roedores, la administración de ciclosporina A (CSA) produce hallazgos histológicos similares a los encontrados en los receptores de trasplantes con CAN, y se asocia con una creciente expresión de TGF-beta<sup>257,258</sup>. Administrar anticuerpos anti-TGF-beta a esos animales conduce a esos efectos, lo cual respalda la tesis de que la toxicidad de la

ciclosporina ocurre a través de un mecanismo dependiente del TGF-beta<sup>259</sup>. También se ha demostrado que otro inmunosupresor, el tacrólimus introducido más recientemente, también está asociado a la fibrosis y a la sobreexpresión de TGF-beta<sup>260</sup>.

La expresión del TGF-beta mediada por la AIJ puede ser importante en la nefrotoxicidad crónica por CSA. Así la nefrotoxicidad aguda por CSA que está causada por la vasoconstricción de la arteriola aferente glomerular es reversible, mientras que la nefrotoxicidad crónica está siempre caracterizada por una insuficiencia renal progresiva y una fibrosis tubulo-intersticial infiltrativa<sup>205</sup>. Es más, la CSA induce a la hipertrofia del aparato yuxta-glomerular y aumento de síntesis de los componentes del eje SRA, aumentando la síntesis renal de AIJ que, a su vez, induce a la expresión del TGF-beta, lo que conduciendo a la fibrosis del tejido renal<sup>205</sup>.

### **Lesión isquemia-reperfusión**

Existe un inevitable tiempo de isquemia que se asocia al trasplante renal. La lesión aparece no sólo como consecuencia de la isquemia, sino también durante la reperfusión, lo cual implica la activación de las células endoteliales y la liberación de radicales libres de oxígeno y de diversos mediadores inflamatorios<sup>131</sup>. El TGF-beta es inducido y activado por radicales libres de oxígeno<sup>262,263</sup>, y es probable que el TGF-beta juegue un papel fisiológico a la hora de proteger contra la lesión por isquemia-reperfusión<sup>264</sup>. De hecho, en un modelo experimental en el que el pedículo renal de las ratas es manipulado de modo pasajero con *clamps* para imitar la lesión por isquemia-reperfusión, el mRNA-TGF-beta y los niveles de proteínas son regulados coincidiendo con el período de regeneración tubular, lo que sugiere un papel en la recuperación del daño<sup>246</sup>. A largo plazo, las ratas con lesión renal por isquemia-reperfusión desarrollan una fibrosis marcada, similar a la que se da en la CAN<sup>265</sup>, hecho que se asocia con una persistente regulación del TGF-beta.

### **Papel de las sustancias vasoactivas**

Durante los últimos veinte años se han realizado grandes avances en el estudio del papel regulador del endotelio en la dinámica vascular. Se creía anteriormente que el endotelio sólo era una barrera permeable a los iones y moléculas orgánicas, así como una zona de efectos metabólicos, sobre todo en la microvasculatura pulmonar (por ejemplo, convirtiendo la angiotensina I en angiotensina II y eliminando las prostaglandinas de la circulación). A pesar de que estos descubrimientos eran de importancia considerable, no preveían el importantísimo papel del endotelio vascular como un órgano regulador del tono vascular sintetizando y liberando sustancias vasoactivas, jugando un papel crítico en la regulación hemodinámica de la microcirculación.

Para mantener la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la fluidez de la sangre, las células endoteliales sintetizan algunas sustancias activas, incluyendo grandes moléculas como fibronectina y sulfato de heparina, interleukina-1, activador del plasminógeno tisular, varios factores de crecimiento y pequeñas moléculas como prostaciclina, factor relajante derivado del endotelio (EDRF), hoy conocido como óxido nítrico, factor activador de las plaquetas y Endotelina-1. La producción de estas sustancias es modulada por cambios en la concentración de mensajeros intracelulares como el AMP<sub>c</sub>, GMP<sub>c</sub> y calcio y por interacciones entre el endotelio y sus células, plaquetas o constituyentes del plasma.

En el asentamiento del daño renal en proceso, existen numerosos factores de crecimiento y citoquinas, muchas de las cuales pueden interactuar con TGF-beta; de ellas, una de los más importantes es la AII. Aunque este péptido es conocido básicamente por el papel que desempeña en la presión sanguínea y el control del equilibrio de fluidos, no cabe duda de que también desempeña un importante papel en las enfermedades renales crónicas. Casi toda la evidencia procede de modelos experimentales de fibrosis renal, que han mostrado que un bloqueo de la AII con antagonistas o de los inhibidores de enzima convertidores en angiotensina reduce los cambios patológicos y anula sustancialmente la regulación de TGF-beta<sup>266-268</sup>. Aunque parte de este efecto podría deberse a la reducción de presión sanguínea,

un conocido factor de riesgo para la fibrosis, los estudios *in vitro* que muestran que suministrando All en células mesangiales se incrementa la producción tanto de MEC como de TGF-beta, respaldan un efecto directo<sup>233,269,270</sup>. Este complejo asunto ha sido bien revisado en fechas recientes<sup>271</sup>.

Las endotelinas son otro grupo de mediadores vasoactivos que están implicados en la patogénesis de la fibrosis. Aunque en principio fueron descritas como productos de las células endoteliales, hoy día se sabe que tienen numerosas fuentes<sup>272</sup>, y actúan *in vitro* para estimular la producción de proteínas MEC<sup>273</sup>. Los niveles de mRNA en endotelinas fueron incrementados en el modelo *F344 a Lew* de CAN, y la administración de un antagonista es efectiva para reducir los cambios histológicos<sup>274</sup>. El TGF-beta estimula la liberación de endotelinas del endotelio<sup>275</sup>. Asimismo, existe una compleja relación con la angiotensina II, siendo así que ambas moléculas actúan al menos en parte estimulando síntesis de la otra<sup>276</sup>.

Es importante conocer la importancia fisiológica de las sustancias vasoactivas: endotelina-1 (ET-1), óxido nítrico (NO), tromboxano (TXA<sub>2</sub>) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), su relación en las funciones del endotelio y el papel desempeñado en el daño por isquemia- reperusión<sup>277</sup>.

## Endotelina

En 1988, Yanagisawa *et al.*<sup>278</sup> aislaron, a partir de un medio de cultivo de células endoteliales de aorta porcina, un péptido de 21 aminoácidos llamado endotelina, el cual se ha mostrado como el más potente vasoconstrictor endógeno *in vivo* e *in vitro* conocido hasta ahora. Es diez veces más potente que la All, vasopresina y neuropéptido Y. El término endotelinas<sup>279</sup>, sin embargo, se refiere a la familia de isopéptidos definida como ET-1, ET-2 y ET-3, que contienen dos puentes disulfuro (Cis1-Cis15 y Cis3-Cis11) que les confieren una estructura tridimensional con forma de espiral cónica y, aunque muestran propiedades similares, bioquímica y biológicamente están codificadas por tres genes diferentes localizados

en los cromosomas 6, 1 y 20 respectivamente, y su expresión está regulada de forma diferente según los órganos y tejidos. Tienen una estructura parecida al veneno de serpiente *Atractaspis engaddensis*, llamado sarafotoxina.

La producción de endotelinas está primariamente regulada a nivel transcripcional (mRNA). La transcripción de endotelinas puede estar influenciada por sustancias vasoactivas como angiotensina II, vasopresina, noradrenalina y trombina, pero también por factores de crecimiento, citoquinas, estrés e hipoxia<sup>280</sup>. La naturaleza de estos péptidos deriva de sus grandes precursores, denominados preproendotelinas (203 a 212 aminoácidos), que se transformarán posteriormente en grandes endotelinas (38 a 41 aminoácidos). La proteólisis de las grandes endotelinas a pequeñas endotelinas, por el enzima convertidor de la endotelina (ECE), es un paso necesario para que estos péptidos se transformen en moléculas biológicamente activas de 21 aminoácidos.

Las endotelinas tienen diferentes orígenes celulares. En el territorio vascular, la ET-1 (cerdo, humano) sólo se detecta en las células endoteliales; ello explica, probablemente, que sea la principal isoforma circulante. También se ha detectado en células no vasculares como cerebro, riñón y pulmón. La ET-2 (humano) es prevalente en el tracto gastrointestinal y riñón, y en pequeñas cantidades en miocardio, placenta y útero. ET-3 (rata) puede encontrarse en el torrente sanguíneo, pero a muy bajos niveles. Altas concentraciones de este péptido se describen sobre todo en el cerebro, aunque también en el riñón, suprarrenal, el pulmón y el intestino.

En mamíferos se han identificado dos subtipos de “receptores” de las endotelinas denominados tipo A (ET<sub>A</sub>) y tipo B (ET<sub>B</sub>). El ET<sub>A</sub> es altamente específico para la ET-1 y está ampliamente distribuido en las células del músculo liso vascular. La unión de ET-1 al receptor ET<sub>A</sub> produce la mayoría de los efectos vasoconstrictores de este péptido. A diferencia del receptor ET<sub>A</sub>, el ET<sub>B</sub> responde de la misma forma a todas las isoformas de endotelinas, está presente en las células endoteliales e inicialmente se pensó que estaba implicado en

vasodilatación. Recientemente, datos *in vitro* e *in vivo* demuestran que media en vasoconstricción de vasos arteriales de humanos sanos.

Las diversas acciones vasculares de las endotelinas incluyen: vasoconstricción potente, aumento de las resistencias vasculares, efectos presores, acciones inotrópicas y cronotrópicas positivas, regulan el tono de los vasos linfáticos, aumentan la permeabilidad vascular produciendo edema intersticial al inducir la liberación del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)<sup>281,282</sup>. Están implicadas, también, en un aumento del hematocrito, ya que al producir vasoconstricción se produce una disminución del volumen plasmático y una hemoconcentración (Goetz *et al.* 1988, Millez *et al.* 1989, López-Farré *et al.* 1989). Entre las “acciones no vasculares” destacan: promueven la mitogénesis de células musculares lisas vasculares, fibroblastos, melanocitos, capilares cerebrales, células estrelladas hepáticas. Son potentes constrictores de la vejiga de mamíferos. Inducen contracciones uterinas. Estimulan la producción de testosterona por las células de Leydig. Están implicadas en la glicogenolisis hepática.

En el riñón en concreto, las endotelinas juegan un papel importante en la regulación de la función renal. Prueba de ello es que se han identificado mRNA para ET-1, ET-2 y ET-3 en la médula, corteza y vasos de riñones humanos. Péptidos activos de ET se han localizado principalmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos intrarrenales, incluyendo las arterias arcuatas e interlobares, arteriolas, venas arcuatas vecinas y células endoteliales de los glomérulos. El riñón es rico en receptores para las endotelinas. El receptor ET<sub>A</sub> está localizado principalmente en los vasos renales, mientras que el receptor ET<sub>B</sub> predomina en los túbulos colectores; también está presente en las células mesangiales, glomerulares y en el resto del epitelio tubular<sup>283,284</sup>.

El riñón es cerca de diez veces más sensible que otras regiones vasculares a los efectos constrictores de la ET-1. La ET-1 puede aumentar o inhibir la liberación de renina, participar en la regulación de la excreción de sodio y agua y liberar aldosterona al actuar sobre los túbulos colectores. En el ámbito renal, la ET-1 puede estimular la proliferación de células

mesangiales y su contracción, y también puede aumentar las resistencias vasculares, lo que conlleva una disminución del flujo sanguíneo renal, disminución de la filtración glomerular y el volumen urinario <sup>285</sup>.

Están implicadas en los mecanismos de la hipertensión: primero producen vasodilatación transitoria con la consecuente hipotensión, ya que pueden inducir la liberación de óxido nítrico y prostaciclina (*De Nucci et al.* 1988 y *Hermán et al.* 1989), para finalmente producir una vasoconstricción sustancial: hipertensión por liberación de TXA<sub>2</sub> (*De Nucci et al.* 1988) y/o aumento del Ca<sup>++</sup> (*Yanagisawa et al.* 1988). Por otra parte, *Sirois* contradice que los productos de la ciclooxigenasa estén implicados en el inmediato efecto de la ET-1 en la tensión arterial <sup>282</sup>. También están implicadas en la nefrotoxicidad por ciclosporina <sup>286</sup> y el rechazo agudo del trasplante <sup>286-289</sup> observado en humanos y en el ámbito experimental.

En el fallo agudo renal inducido por isquemia-reperfusión jugarían un papel importante <sup>289,290-292</sup>. *Whilhelm et al.* <sup>293</sup> demuestran, al observar en su modelo experimental en ratas, que es sobre todo tras la isquemia, cuando se activa el preproET-1 mRNA y aumenta la actividad ET-1 en los capilares peritubulares renales. También se han observado aumentos del nivel de ET-1 tras la isquemia-reperfusión en cerdos trasplantados de hígado <sup>294</sup> y en ratas al clampar el pedículo renal y que estos aumentos estaban correlacionados con elevaciones en la creatinina y el BUN <sup>295,296</sup>. En un estudio de *Kon et al.* se observó que, al inyectar un bolus de ET-1 de forma selectiva en la circulación renal o provocar un aumento del nivel de ET-1 (tras inducir isquemia-reperfusión en ratas al clampar el pedículo vascular) se producía un descenso del flujo plasmático renal y filtración glomerular secundaria al aumento de las resistencias vasculares glomerulares <sup>297</sup>. *Espinosa et al.* demostraron en su trabajo experimental en conejos que también la ET-1, tras isquemia-reperfusión, contribuye a la acumulación de PMN <sup>298</sup> al estimular la expresión de las moléculas de adhesión de superficie CD18 (integrinas) de estas células.

En estudios experimentales de trasplante renal en ratas <sup>299</sup>, trasplante hepático en cerdos con donante a corazón parado e isquemia caliente de 90 min <sup>300</sup> e isquemia-reperfusión hepática en ratas <sup>301</sup> y perros <sup>302</sup> pinzando-despinzando el pedículo vascular durante 120 min, se han observado niveles elevados de ET-1 tras la isquemia-reperfusión. Al administrar un antagonista inespecífico de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, (TAK-044 en hígado y BQ-123 en riñón), se atenúa el deterioro de la microcirculación y de la función del órgano y se reduce el grado de infiltración por PMN. Estos antagonistas podrían ser un tratamiento potencial para su uso en clínica <sup>303</sup>.

### **Oxido nítrico y nitritos/nitratos**

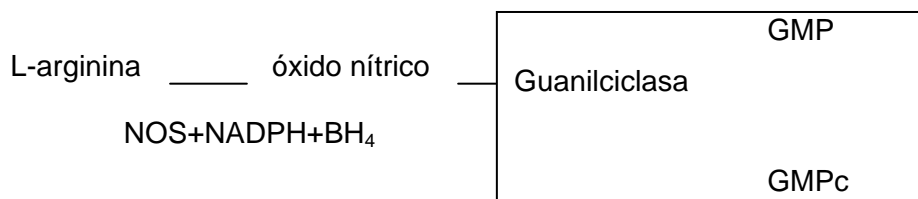
En 1980, *Furchgott y Zawadzki*, usando tiras de aorta en un baño de órganos, descubrieron que el endotelio de los vasos era esencial para el efecto vasodilatador de la acetilcolina. Evidenciaron que este efecto era debido a una sustancia a la que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF) <sup>304</sup>. En 1987, *Palmer y Moncada* <sup>305</sup> demostraron que este factor era el óxido nítrico (NO).

El óxido nítrico es un gas incoloro, escasamente soluble en agua y fácilmente oxidable <sup>306</sup>. La molécula de NO tiene un peso molecular de 30 d. Contiene un electrón no pareado en su capa exterior, por lo que posee las características de un radical, lo cual explica su elevada reactividad y su tendencia a la unión de hemoproteínas reducidas. El óxido nítrico es un radical libre debido a su electrón no pareado, es inestable y se oxida en presencia de oxígeno y agua a nitrito y nitrato, que son sus metabolitos estables. Su vida media es de 3 a 6 segundos, siendo el nitrito (NO<sub>2</sub>) el producto más abundante de su descomposición. El NO actúa activando la forma soluble de la guanilciclase e incrementa el GMPc al nivel de la célula del músculo liso vascular. Para ello se requiere la reducción del hierro (Fe<sup>++</sup> del hemo). El GMPc activa una proteinquinasa que fosforila las cadenas de la miosina, de modo que se produce relajación del músculo liso vascular <sup>306</sup>.



El sustrato para la síntesis del NO es la L-arginina. El enzima que cataliza la formación del NO a partir de L-arginina es la oxidonítrico sintasa (NOS); una dioxigenasa que existe en varias isoformas. La NOS cataliza la oxidación del átomo de nitrógeno de uno de los terminales guanidino de la L-arginina generando citrulina y eliminando NO y anión superóxido. Todas las isoformas enzimáticas requieren L-arginina, oxígeno, NADPH como sustratos y flavinadeninnucleótido, flavinmononucleótido, grupo hemo y tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cofactores<sup>307</sup> (figura 3, página 76).

**Figura 3.** Formación del NO a partir de L-arginina<sup>139</sup>



El terminal nitrógeno guanidino de la L-arginina es transformado a NO por una oxidación. Se requieren cofactores: NADPH, BH<sub>4</sub>. El NO estimula la guanilciclase de la célula, con lo que el GMP se transforma en GMPc. La familia de las isoformas de la NOS se divide principalmente en isoforma constitutiva (cNOS) e isoforma inducible (iNOS). La cNOS requiere del cofactor ca<sup>2\*\*</sup> para unirse a la calmodulina y así activarse (ca<sup>2\*\*</sup>-dependiente)<sup>279,306-308</sup>. Se conocen dos subtipos de ésta: neuronal: NOS I / nNOS y endotelial: NOS III / eNOS. Recientemente se ha aislado una cuarta isoforma a partir de hepatocitos humanos: iNOS hepática. La diferencia en la estructura bioquímica de estas enzimas radica en el terminal NH<sub>2</sub>, mientras que el terminal COOH<sup>-</sup> confiere la similitud entre ellas y con la citocromo P450 reductasa.

La "localización"<sup>306</sup> en el riñón de estas enzimas es la siguiente: cNOS en mácula densa, vasos preglomerulares, túbulos colectores, asa de Henle y glomerulus; iNOS en túbulos colectores, proximales y distales, asa de Henle y glomerulus. Entre los "factores activadores de

cNOS”<sup>306</sup> se encuentran: acetilcolina, bradikina, leucotrienos, FAP, aminoácidos, iones  $Ca^{2+}$ , estímulo eléctrico, mastocitos, PMN, algunas neuronas. Como “factor inhibidor de cNOS” se ha descrito al FNT $\alpha$ . “Factores activadores de iNOS”: endotoxinas (lipopolisacáridos de las membranas celulares bacterianas) y citoquinas (IFN $\gamma$ , FNT $\alpha$ , FNT $\beta$ , IL-1). “Inhibidores de iNOS”: glucocorticoides, citoquinas (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, etc). El L-NAME, L-NNMA tienen efecto inhibitor in específico sobre NOS<sup>309,310</sup>.

El NO presenta “actividades biológicas”<sup>311,312</sup>. Es un potente vasodilatador, inhibe la adherencia leucocitaria y la interacción de las plaquetas con el endotelio vascular, inhibe la mitogénesis y proliferación de las células musculares lisas vasculares. En el riñón el NO juega un papel crucial en la regulación de las funciones hemodinámicas y excretoras<sup>306, 311,312</sup>. Es un importante regulador del tono vascular glomerular y del coeficiente de ultrafiltración de los capilares glomerulares. También juega un papel en la regulación de la reabsorción tubular de sodio y agua. La reducción de su síntesis provoca un aumento de reabsorción tubular de sodio y agua al parecer mediado por la angiotensina II endógena. El descenso de NO provoca un aumento de la actividad plasmática de renina y de los niveles intrarrenales de A II. El flujo sanguíneo es más sensible en la médula que en la corteza renal a la disminución de NO y la actividad de la cNOS es mucho mayor en la médula que en la corteza. La disminución de su síntesis provocaría una disminución en el flujo medular que llevaría a un mayor gradiente osmótico en la médula y a un aumento en la reabsorción de sodio y agua<sup>306, 311,312</sup>.

Al tener un electrón no pareado en su estructura química, puede aceptar electrones y de ese modo ser *scavenger* del anión superóxido. E incluso puede llegar a inhibir la producción del mismo por los neutrófilos. Sin embargo, por otra parte, puede tener efecto citotóxico directo y ha sido implicado en el daño a los tejidos<sup>313</sup>. Los macrófagos son una fuente importante de producción de NO a partir de iNOS ejerciendo acción patógena.

Así pues, existe una gran controversia sobre el papel del NO. Numerosos trabajos han intentado esclarecer dicho papel en el daño por isquemia-reperfusión. Unos apoyan la

hipótesis de que durante la isquemia-reperfusión se produce un aumento de actividad de cNOS<sup>314-316</sup>; otros, de iNOS<sup>309</sup> y otros, de ambos<sup>317</sup>. La mayoría de ellos concluyen afirmando el efecto citoprotector del NO.<sup>312,315-316,318,319-323</sup> Éste jugaría un papel importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo renal durante la recuperación del daño isquémico<sup>316,317</sup>. Al parecer, según Cristol<sup>317</sup>, sería el isoenzima eNOS el que predominaría durante la isquemia-reperfusión, sin que llegara a detectarse iNOS. No obstante, Noiri opina lo contrario<sup>309</sup>. Sin embargo, otros apoyan el efecto citotóxico del NO<sup>287</sup>. *Weight*<sup>323</sup> sugiere que la temprana liberación de NO durante la isquemia caliente-reperfusión es citotóxica, pero que en general ejercería un papel citoprotector. En el caso del hígado existe la misma controversia: a favor del NO<sup>324-327</sup> y en contra.<sup>328-329</sup>

### **Tromboxano**

El TXA<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> rápidamente son hidrolizados de forma no enzimática a metabolitos estables no activos: TXB<sub>2</sub> y 6-keto- PGF<sub>1α</sub> medible en plasma. El balance entre prostaciclina y tromboxano es un factor importante en cuanto a la modulación del daño por isquemia-reperfusión. Inhibidores de la tromboxanosintasa pero no de la ciclooxigenasa previenen de la necrosis tubular aguda (NTA) tras la isquemia renal. Se cree que es debido a la estimulación de la producción endógena de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE<sub>1</sub>, PGI<sub>2</sub>)<sup>330</sup> y que una relación alta entre PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> protege contra la isquemia renal<sup>331</sup>.

Son numerosos los trabajos que indican que la administración de inhibidores de la síntesis del TXA<sub>2</sub> tienen un efecto citoprotector en el daño por isquemia-reperfusión no sólo en riñón<sup>332-334</sup>, sino también en hígado<sup>335-337</sup> y páncreas<sup>333,338</sup>. También la administración de análogos de la prostaciclina atenúa el daño por isquemia-reperfusión, con lo que se mejora el flujo renal y la filtración glomerular, se facilita la recuperación de las células tubulares dañadas en el ámbito renal<sup>339-341</sup>, se mejora la microcirculación hepática y se atenúa la deplección energética y la lipoperoxidación<sup>342,343</sup>.

## Prostaciclina o PGI<sub>2</sub>

La prostaciclina fue descubierta en 1976<sup>344</sup> por *Moncada et al.*, quienes la llamaron en un principio PGX. Es el mayor miembro de la familia de las prostaglandinas producidas por las células endoteliales. Tiene un fuerte poder vasodilatador e inhibe la agregación plaquetar activando la adenilciclase e incrementando el AMPc intracelular. Se transforma rápidamente en el plasma a 6-Keto-prostaglandin F<sub>1α</sub>, que es el metabolito estable<sup>345</sup>.

Las prostaglandinas, derivados del ácido araquidónico, se transforman en diferentes metabolitos siguiendo la vía de la ciclooxigenasa (COX). La COX sigue los mismos caminos que la NOS<sup>279</sup>. Los antiinflamatorios no esteroideos pueden inhibir este enzima bloqueando la síntesis de prostaglandinas. Se han descrito dos isoenzimas de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2. Tienen un 60% de similitud y presentan diferentes propiedades biológicas y farmacológicas. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y está involucrada en la producción fisiológica de las prostaglandinas.

La forma inducible, COX-2 está presente en las células expuestas a agentes proinflamatorios, incluyendo citoquinas, y se expresa en procesos inflamatorios. La inhibición de la COX-2 por los AINEs puede utilizarse como medidas terapéuticas, mientras que la de COX-1 nos podría explicar los efectos no deseados en el estómago y el riñón.

La síntesis de prostaciclina se inicia a partir del enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>, (figura 2, página 35), que libera ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana. Este enzima puede estar inhibido por los glucocorticoides, con lo que se inhibe así la síntesis de prostaciclina. El ácido araquidónico, por medio del enzima ciclooxigenasa (COX), será transformado en endoperóxidos de prostaglandinas: PGG<sub>2</sub>, un inestable compuesto que será

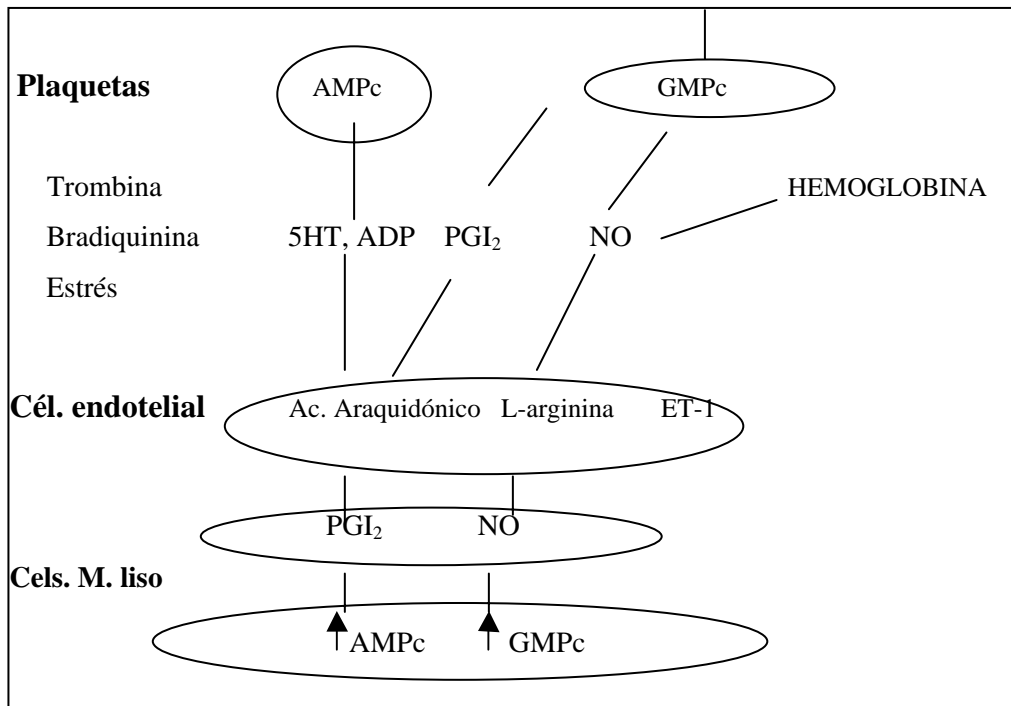
ciclado y oxigenado por una peroxidasa a  $\text{PGH}_2$ . Dependiendo del tejido y tipo de célula, la  $\text{PGH}_2$  es convertida en  $\text{PGE}_2$  o, mayoritariamente, en  $\text{PGI}_2$  por la prostaciclinsintasa en las células endoteliales y musculares lisas. En lo concerniente a macrófagos y plaquetas, la  $\text{PGH}_2$  se transforma en tromboxano  $\text{A}_2$  por medio de la tromboxanosintasa <sup>346</sup>. Estos dos eicosanoides representan biológicamente polos opuestos en el mecanismo que regula la interacción de las plaquetas con el endotelio. El  $\text{TXA}_2$  contrae el músculo liso e induce la agregación plaquetar, pero la  $\text{PGI}_2$  posee un potente efecto vasodilatador y antiagregante plaquetar.

La producción de prostaciclina, al igual que el resto de PGs, puede estar “activada” por perturbaciones químicas o mecánicas de las membranas celulares <sup>347</sup>. Fármacos, presión pulsátil y numerosos mediadores endógenos pueden inducir la formación de prostaciclina a partir de las células endoteliales. Algunas sustancias endógenas derivadas del plasma como bradiquinina, trombina y otras liberadas por las plaquetas, como serotonina, PDGF, IL-1 y adeninnucleótidos pueden estimular su síntesis. Inhiben la síntesis de prostaciclina: antagonistas del calcio, captopril, dipiridamol, diuréticos, nitratos, estreptoquinasa, AINEs, glucocorticoides, lipoperóxidos (éstos inactivan a la prostaciclinsintasa).

Entre las propiedades biológicas de la prostaciclina se encuentran, además de las ya citadas: vasodilatación y antiagregante plaquetar, en el ámbito renal: mantienen el flujo sanguíneo renal (más importante en la médula que en la corteza) y filtración glomerular, regulan la eliminación de sodio y agua debido a su efecto tubular directo, más evidente en la porción gruesa del *asa ascendente de Henle*. Existe una importante interacción entre el NO y las PG en la regulación aguda y a largo plazo de la función renal: las prostaglandinas contribuyen a mantener la hemodinámica y la función excretora renal cuando se reduce la producción de NO <sup>348</sup>.

Endotelina, óxido nítrico, prostaciclina y tromboxano actúan conjuntamente, interaccionando entre sí y modulando el daño por isquemia-reperfusión (figura 4, página 81).

**Figura 4.** Generación e interacción entre prostaciclina, óxido nítrico y endotelina-1 por las células endoteliales <sup>139</sup>



La estimulación de los receptores de las células endoteliales por serotonina (5HT) o ADP liberados de las plaquetas, trombina y bradiquinina, o sustancias liberadas por situaciones de estrés, activan la célula que genera prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) a partir del ácido araquidónico. Dicha célula relaja el músculo liso vascular e inhibe la agregación plaquetar incrementando los niveles de AMPc.

EL óxido nítrico (NO) formado a partir de L-arginina también relaja el músculo liso e inhibe la adhesión y agregación plaquetar, pero incrementando los niveles de GMPc. El aumento simultáneo de AMPc y GMPc, por parte de NO y de PGI<sub>2</sub>, hace que de forma sinérgica éstos inhiban la agregación plaquetar <sup>349</sup>. La hemoglobina inactiva el NO.

La endotelina-1 (ET-1) se une por medio de su receptor a las células endoteliales, con lo que se causa la fosforilación de la mioglobulina, al incrementar el calcio en las células del

músculo liso, lo que produce su constricción. El mecanismo de liberación de la endotelina a partir de las células endoteliales no se conoce con exactitud.

### **Reparación tisular tras síndrome isquemia-reperfusión**

Como consecuencia del daño por isquemia-reperfusión, se produce una alteración del riñón que hay que trasplantar, lo que provoca una necrosis tubular aguda en más o menos grado que puede afectar a la función y viabilidad del órgano, incluso llegar a necrosis cortical, con la pérdida definitiva de éste.

La NTA, como su nombre indica, consiste en la muerte de las células de los túbulos renales. Éstas liberan sus enzimas al exterior pudiendo ser marcadores de dicha lesión y de la viabilidad del órgano. La idea de estudiar la viabilidad de riñones sometidos a daño por isquemia antes del trasplante determinando enzimas marcadores de lesión renal no es nueva. En la década de los setenta, la LDH era medida en el efluente venoso de riñones perfundidos. Sin embargo, debido a la distribución homogénea de este enzima en el tejido renal, no es un marcador específico del daño por isquemia.

### **9. Papel del TGF-beta en la isquemia-reperfusión**

Es sencillo comprender que, después de la lesión por isquemia-reperfusión, la afluencia de mediadores inflamatorios añadida a una degradación de las células necróticas determina un MEC más fluido y, estas enzimas degradantes necesitan ser reguladas en el *interstitium* renal. El incremento de los niveles del TGF-beta observado ya la primera semana de este evento y el delicado *turnover* de las MEC asociado sugieren la participación precoz del TGF-beta en el proceso agudo de la reparación de las lesiones por isquemia-reperfusión (*Jain S, et al. 2000*)

La valorización de los efectos de la lesión isquemia-reperfusión es difícil en humanos debido a la gran cantidad de variables de confusión. Quizá la situación clínica más cercana sea el trasplante renal. Por este motivo, tanto en estudios experimentales como en la práctica clínica, muchísimos otros factores influyen la expresión de los genes involucrados en las lesiones de isquemia fría, caliente e isquemia-reperfusión en los NHBD (*Jain S, et al. 2000*)<sup>350</sup>.



## **HIPÓTESIS**

## HIPÓTESIS

La posibilidad de obtener un riñón de un donante a corazón parado es una fuente para obtener órganos para trasplante que no debe descartarse, dada la diferencia existente entre el número de pacientes en lista de espera y el número de órganos que se extraen. Es necesario conocer el grado de lesión que se produce como consecuencia de la parada cardiaca (isquemia caliente), periodo de almacenamiento (isquemia fría), periodo de isquemia-reperusión, y disponer, en el periodo posterior, de estos datos, con el fin de conocer qué riñones son susceptibles de trasplantarse y modificarse según las condiciones de preservación.

Hasta ahora, el objetivo fundamental para la recuperación de los órganos es conseguir, lo antes posible, el enfriamiento corporal total. Se ha comprobado que periodos de isquemia caliente de hasta cuarenta minutos no afectan a la supervivencia del injerto.

El TGF- $\beta$ 1 es una citoquina que actúa como factor de crecimiento y que tiene un importante efecto en la reparación tisular y en la producción de fibrosis cuando el proceso de reparación es anómalo. Se conoce con detalle la acción de los factores de crecimiento y, específicamente, del TGF- $\beta$ 1, en los procesos tardíos del rechazo del aloinjerto renal, por medio de la producción de fibrosis, pero poco o casi nada se conoce de los cambios y la presunta actuación de esta citoquina en los primeros procesos del trasplante renal (isquemia-reperusión).

**Si se considerara que el TGF-beta1 participa en los procesos de regeneración tisular estimulando la producción de fibrosis, que el TGF- $\beta$ 1 también tiene una importante participación en la regeneración del tejido renal dañado, además de que contribuye a la reparación y el mantenimiento de la estructura y función tubular. Se sabe que la expresión del TGF- $\beta$ 1 depende del tiempo transcurrido después de una lesión**

aguda isquémica y, además, se comprobó que dicha elevación de la expresión del TGF- $\beta$ 1 ya existe a partir de las 12 horas postisquemia, y que persiste durante más de catorce días.

Si se conocieran las características de este tipo de lesión por isquemia-reperfusión y se determinaran los factores predictivos de viabilidad en correlación con la expresión del TGF- $\beta$ 1, con las sustancias vasoactivas, con la carga energética, con los flujos arteriales postreperfusión y el grado de lesión histopatológica, sería posible reconocer aquellos riñones viables para trasplante y establecer, además el tiempo máximo de isquemia a partir del cual los riñones no serían aptos, (cuál sería la correlación ideal de los factores citados), qué conduciría a un mejor rendimiento en el órgano trasplantado. Con ello se podría aumentar de forma efectiva el número de órganos que se podrían trasplantar, ya que creemos que el periodo actual se puede sobrepasar, teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- El riñón es capaz de resistir periodos prolongados de isquemia.
- El proceso de preservación y trasplante de un riñón conlleva de forma inevitable a la producción de una lesión por isquemia-reperfusión de mayor o menor grado.
- Cuando se trata de donantes a corazón parado, la lesión isquémica producida es más grave que en cualquier otra situación.
- Una adecuada sistematización de la obtención del riñón podría disminuir al máximo la progresión de la lesión.

Entonces deberíamos establecer un modelo para obtener órganos a corazón parado que permitiera:

- Conocer el grado de lesión celular producido por los diferentes tipos de isquemia.
- Establecer marcadores de viabilidad renal y correlacionarlos con la expresión del TGF- $\beta$ 1, con las sustancias vasoactivas, con la carga energética, con los flujos arteriales posreperusión y el grado de lesión histopatológica estudiando las diferentes vías de lesión renal en los diferentes tiempos de isquemia.
- Evaluar la calidad y viabilidad del órgano antes de plantear su utilización en el trasplante.

**El hecho de conocer cómo se regula el mecanismo de lesión por isquemia-reperusión puede significar la posibilidad de agregar sustancias citoprotectoras que permitan utilizar riñones que presenten periodos de isquemia más prolongados y minimizar el daño tisular, de modo que se evitaría el trasplante de riñones que nunca debieron utilizarse.**

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis doctoral es **estudiar el papel del TGF-beta 1 en los procesos de lesión/recuperación tisular durante la isquemia fría, isquemia caliente e isquemia-reperfusión, en un modelo de trasplante renal experimental en cerdo.**

De la hipótesis planteada previamente se plantearan unos **objetivos concretos** como son:

1. Valorar la expresión en tejido renal del TGF-beta 1 durante la isquemia fría, y en diferentes tiempos de isquemia caliente y postrasplante inmediato (cinco días).
2. Estudiar la viabilidad de dichos injertos mediante estudios histológicos y el grado de rechazo de los animales.
3. Investigar el papel del TGF-beta 1 y otros marcadores (sustancias vasoactivas, carga energética, resistencias vasculares) en los mecanismos fisiopatológicos del daño tisular y reparación producidos durante la isquemia-reperfusión.
4. Ajustar las correlaciones encontradas a las variables estudiadas.
5. Determinar factores predictivos y pronósticos de la viabilidad del órgano.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. Diseño del estudio

Establecer un modelo experimental de trasplante renal con NHBD resulta difícil pues clínicamente existen varios tipos de donantes inestables y muchas formas de llegar a la parada cardíaca. En este modelo, se optó por la provocación de la parada cardíaca mediante la inyección intravenosa de 20-30 mEq de KCl. Se trata de un método sencillo y rápidamente eficaz para lograr un período de isquemia caliente homogéneo y bien controlado, esto permite su reproducibilidad en todos los grupos del estudio.

Los pares de animales son divididos en 5 grupos. Se detallan a continuación las características de cada grupo. De acuerdo con los objetivos establecidos previamente, se estudiarán tres grupos de diez pares de cerdos cada uno y dos grupos de cinco pares de cerdos.

GRUPO 1 (n= 5 pares). CONTROL, Sin isquemia caliente. Con Csa A

GRUPO 2 (n= 5 pares). CONTROL, Sin isquemia caliente. Sin Csa A

GRUPO 3 (n= 10 pares). Período de isquemia caliente de 30 minutos.

GRUPO 4 (n= 10 pares). Período de isquemia caliente de 45 minutos.

GRUPO 5 (n= 10 pares). Período de isquemia caliente de 90 minutos.

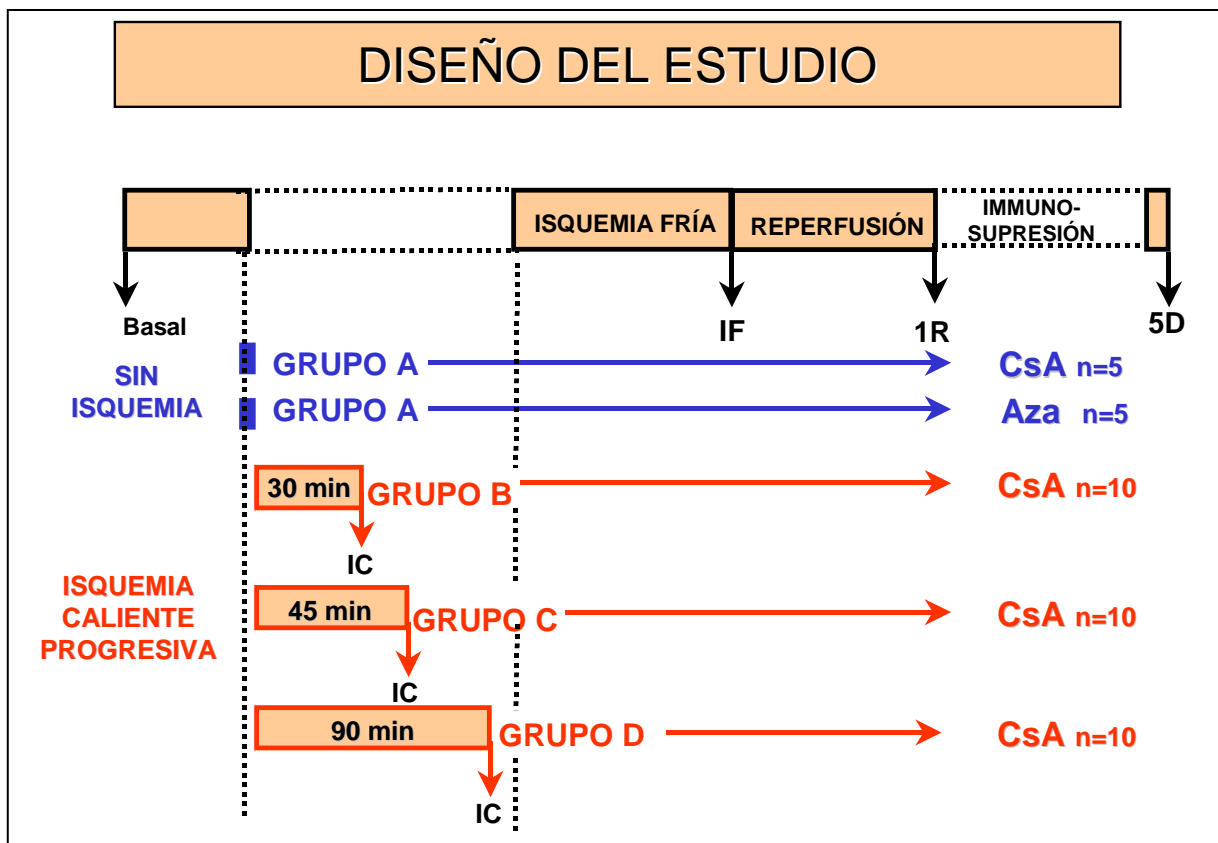
El estudio experimental realizado puede ser subdividido en las siguientes fases:

- 1 - Premedicación y anestesia del animal donante.
- 2 - Incisión de laparatomía media xifopubiana.
- 3 - Disección de extremo caudal de arteria Aorta y vena Cava y canulación de ambas.
- 4 - Heparinización del animal donante.
  
- 5 - Provocación de la parada cardíaca: 30, 45 y 90 minutos.



- 6 - Perfusión renal fría con solución de Wisconsin.
- 7 - Extracción renal y cirugía de banco.
- 8 - Preservación a 4°C durante 6 horas.
- 9 - Preparación del animal receptor.
- 10 - Nefrectomía bilateral en el receptor.
- 11 - Implante del injerto renal. Fin del período de isquemia fría.
- 12 - Control y seguimiento durante 5 días postoperatorios.
- 13 - Sacrificio del animal al quinto día.

**Figura 5:** Diseño del estudio



**Grupos sin isquemia caliente**

GRUPO A (n= 5 pares). CONTROL. Extracción a corazón latiente del riñón donante posterior a la perfusión renal con un litro de solución fría de la Universidad de Wisconsin (UW)

y almacenaje en nevera a 4° C durante 6 horas, tras las cuales se realizó el trasplante. Se introdujo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A (CsA).

GRUPO A (n= 5 pares). CONTROL. Extracción a corazón latiente del riñón donante posterior a la perfusión renal con un litro de solución fría de UW y almacenaje en nevera a 4° C durante 6 horas, tras las cuales se realizó el trasplante. Se introdujo tratamiento inmunosupresor con azatioprina (Aza), sin CsA.

### **Grupos con isquemia caliente**

GRUPO B (n= 10 pares). Período de parada cardiaca de 30 minutos seguido de perfusión renal con un litro de solución fría de UW. Y almacenaje en nevera a 4° C durante 6 horas, tras las cuales se realizó el trasplante. Se introdujo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A (CsA).

GRUPO C (n= 10 pares). Período de parada cardiaca de 45 minutos seguido de perfusión renal con un litro de solución fría de UW. Y almacenaje en nevera a 4° C durante 6 horas, tras las cuales se realizó el trasplante. Se introdujo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A (CsA).

GRUPO D (n= 10 pares). Período de parada cardiaca de 90 minutos seguido de perfusión renal con un litro de solución fría de UW. Y almacenaje en nevera a 4° C durante 6 horas, tras las cuales se realizó el trasplante. Se introdujo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina A (CsA).

## **2. Infraestructura da la actividad experimental**

La actividad quirúrgica experimental fue desarrollada a partir de Septiembre de 1998 hasta el Diciembre del 2000, en el Departamento de Cirugía Experimental de la Facultad de

Medicina de la Universidad Central de Barcelona que poseía las instalaciones necesarias para llevar a cabo la extracción e implantación renal al animal de experimentación (fotografía 1 página 100).

La realización de un trasplante renal necesita la utilización de varios aparatos de control y monitorización tanto en el acto anestésico como en el acto quirúrgico, y el quirófano estaba compuesto con :

- un aparato de ventilación mecánica (respirador Temel).
- un monitorizador de presiones y electrocardiograma (*Hewlett-Packard*).
- un analizador de gases (*Ciba-Corning*).
- un oxigenador pediátrico (*William Harvey* (H-300) *Bard* pediátrico).
- un bisturí eléctrico (Magari 1, Cuatro.S.A).
- un aspirador de campo quirúrgico (Ordisi. S.A).
- un calentador de sueros.

### **3. Animales de experimentación**

Los animales de estudio son 40 pares de cerdos de raza ibérica *large white*, de peso de  $28,9 \pm 2.6$  Kg, divididos en donantes y receptores. Todos los animales han sido suministrados por la misma granja especializada (casa Isoquimen).

El cerdo utilizado como animal de experimentación en el campo del trasplante renal es ideal ya que posee una anatomía y fisiología muy similares al humano. Además, es un animal domesticable, de crecimiento rápido y reproducción numerosa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es de naturaleza muy lábil y sensible a las situaciones de estrés por lo que su manejo debe ser cuidadoso para evitar la muerte del animal durante su preparación para la intervención.

Todos los animales se han mantenido en condiciones en corralinas estandarizadas donde se les proporciona agua y comida en forma de pienso ecológico sin aditivos. Tanto los donantes como los receptores son sometidos a un período de ayunas de 8 horas previo a la cirugía con un acceso libre a la ingesta de agua.

### **Preparación preoperatoria de los animales**

Se realiza en todos ellos una premedicación con Azaperona® intramuscular a dosis de 10 mg/kg de peso. Quince minutos después, se trasladan al quirófano donde, tras canalización de la vena del pabellón auricular, se realiza la inducción anestésica con Tiopental® sódico endovenoso a dosis de 15 mg/kg y se procede a la intubación orotraqueal y ventilación mecánica controlada del animal (ver descripción de la técnica en el apartado 4.).

Una vez anestesiado, se realiza un lavado de todo el abdomen, tórax y cuello del animal con agua y jabón con yodo-povidona. Se rasuran las extremidades para la colocación de los electrodos de monitorización electrocardiográfica y se pesa. Después se traslada a la mesa de quirófano donde se coloca en decúbito supino para proceder a la sujeción, conexión al aparato de ventilación mecánica y preparación del campo operatorio en condiciones de esterilidad.

## **4. Modelo de trasplante renal en el cerdo**

### **Técnica anestésica, monitorización y mantenimiento del cerdo**

Después de la preparación preoperatoria ( premedicación con Azaperona a dosis de 10 mg/kg e inducción con Pentotal a dosis de 15 mg/kg) e intubación de la vía aérea del animal, se procede a la ventilación mecánica (*Engstrom*) con oxígeno al 100%, empleando un volumen tidal necesario para mantener la fracción espirada de CO<sub>2</sub> (“ETCO”) entre 30 y 40 mmHg. La anestesia se mantiene con Isoflurane al 0,7-1% y el bloqueo neuromuscular con Besilato de

atracurio (10 mg/hora). La analgesia intraoperatoria se realiza con Fentanilo a dosis de 50 µg/hora.

La monitorización hemodinámica de los animales se inicia mediante la disección de la región cervical derecha y la colocación de un catéter arterial (16 G, *Arrow*) a nivel de la arteria carótida derecha (fotografía 2, página 100). En el receptor se coloca además el mismo tipo de catéter en la vena yugular externa derecha, previamente tunelizado a la región dorsal por el plano subcutáneo. Así se monitorizan de forma continua la presión arterial y la presión venosa central. La monitorización electrocardiográfica también se lleva a cabo de forma continua mediante las derivaciones II y V.

Durante el trasplante en el receptor, los controles hemodinámicos y analíticos rutinarios se hacen en las siguientes fases bien definidas: en el momento de la inducción anestésica, previamente al despinzamiento de los vasos renales antes de la reperusión, y por último a la hora de la reperusión.

La hidratación del animal durante el trasplante se realiza de la siguiente manera:

- En la fase de nefrectomía bilateral, se administra un total de 500 ml de suero Ringer Lactato®.
- Antes del pinzamiento vascular, se inicia una perfusión continua de 500 ml de Hemoce® que se mantiene durante toda la fase arrenal.
- Tras la reperusión, se inicia una perfusión de suero glucosado al 5% hasta un total de 300 a 500 ml que se mantiene hasta la finalización del trasplante.

### **Técnica quirúrgica en el donante**

Tras la práctica de una laparatomía xifopubiana se exploran los riñones para verificar que no hayan contraindicaciones para su utilización como donantes. Las contraindicaciones

serían alteraciones de color, presencia de tumoraciones, mal formaciones vasculares, cuadros infecciosos, etc.

Se disecó el retroperitoneo del animal, en cuya izquierda se identificaron los vasos del hilio renal y se tomaron los flujos arterial y venoso basales (fotografía 3, página 101). Los 2 transductores *Transonic*® de 3 y 5 mm utilizados en el experimento, se muestran en la fotografía 4, página 101.

Se disecan la arteria Aorta y la vena Cava en su extremo más distal para la canulación (fotografías 5 y 6, página 102) y previa a la heparinización del animal a dosis de 3 mg/kg peso, se provoca entonces la parada cardíaca mediante la inyección intravenosa de 20-30 mEq de KCl. En el grupo control del estudio se extraen los riñones a corazón latiente, una vez perfundidos con solución UW, sin período de isquemia caliente.

Tras los minutos de isquemia caliente correspondientes a cada grupo (30, 45 y 90 minutos) se procede a la perfusión fría "in situ" de los riñones a través de la arteria Aorta con un litro de solución UW (fotografía 7, página 103). Previamente, se había ocluido la Aorta por debajo del tronco celíaco y se había ligado la arteria mesentérica superior. Se liga la vena Cava inferior por debajo de las venas renales.

Una vez se constate que haya finalizado el período de perfusión fría, se procede a la extracción de los riñones seccionando la vena cava infrahepática y la aorta por encima de las venas y arterias renales. Posteriormente, realizamos una nefrectomía radical en bloque bilateral simultánea seccionando la vena Cava inferior y la Aorta distalmente, sobreelevando las cánulas, y seccionando ambos uréteres a nivel del cruce con los vasos ilíacos.

### **Cirugía de banco**

Se realizan las siguientes maniobras que no difieren de las realizadas a nivel clínico:

Los riñones se separan dividiendo la Aorta en primer término en su superficie posterior, luego en su superficie anterior y por último mediante la división de la vena renal izquierda a nivel de su desembocadura en la vena cava inferior. La arteria renal tendrá un *patch* de Aorta y la vena renal de Cava. Se realiza exéresis de los ganglios linfáticos hiliares.

Los riñones ya preparados se colocan en una bolsa de órganos estéril con suero Ringer Lactato® “pilé” a 4 °C y se introducen en una nevera portátil con abundante hielo que la rodeará. Permanecerán durante 6 horas hasta su colocación en el receptor.

## **Técnica quirúrgica en el receptor**

### **Nefrectomía bilateral**

Se practica inicialmente una pequeña incisión de lumbotomía izquierda extraperitoneal hasta llegar al riñón izquierdo, realizando nefrectomía. Seguidamente se practica una incisión pararectal derecha extraperitoneal disecando el riñón derecho y el hilio y la pelvis renal, ligando el pedículo renal en bloque y seccionando la vía renal a nivel de pelvis preservando el uréter propio.

### **Implante de un riñón.**

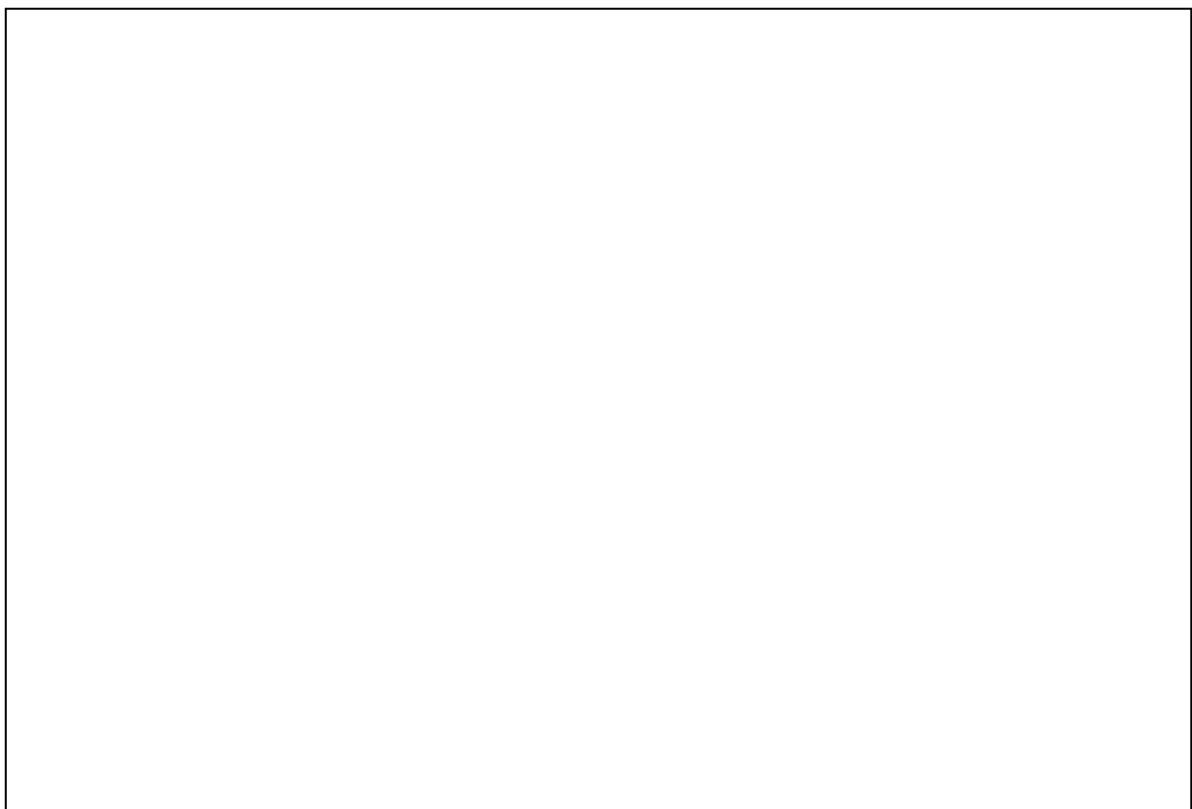
Se coloca el riñón derecho donante a nivel del retroperitoneo del cerdo receptor. Se realiza disección de la vena Cava inferior y de la Aorta ligando los vasos linfáticos a nivel de la zona donde realizaremos la anastomosis: generalmente en el territorio comprendido entre bifurcación de los vasos renales y bifurcación de los vasos ilíacos.

Se realizan las anastomosis vasculares en el siguiente orden: primero se realiza la anastomosis término-lateral entre vena renal con *patch* de cava pinzando la vena renal con un *bulldog*; en segundo lugar la anastomosis término-lateral entre arteria renal con *patch* de aorta

y la aorta abdominal (fotografía 8, página 103). Ambas anastomosis se realizan con sutura continua 180° con monofilamento irreabsorbible de prolipropileno 6 ceros; la cara posterior por dentro y la anterior por fuera. Procederemos al despinzamiento siguiendo el orden: primero vena renal y después arteria renal. De esta manera ya se reperfunde el riñón (fotografía 9, página 104) La reconstrucción del tracto urinario se realiza con sutura continua de catgut® 6 ceros mediante pieloureterostomía dejando tutorizada ésta con un “doble-jota” (fotografía 10, página 104).

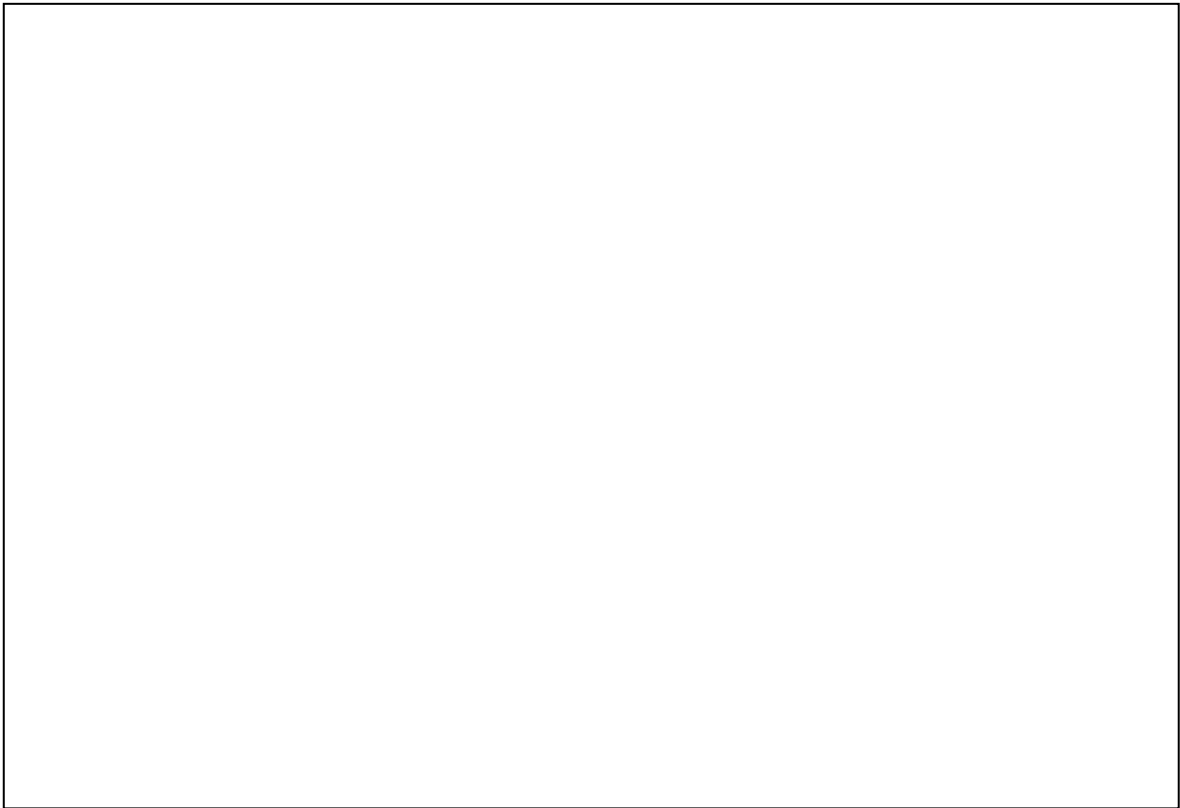
Tras finalizar las anastomosis vasculares y una vez despinzado los vasos, se toman los flujos arteriales y venosos renales a tiempo cero, 5 y 10 minutos (fotografía 11, página 105).

La incisión pararrectal derecha y la lumbotomía izquierda se cierran por planos con Vicryl® del cero y la piel con sutura continua de seda triangular del cero.

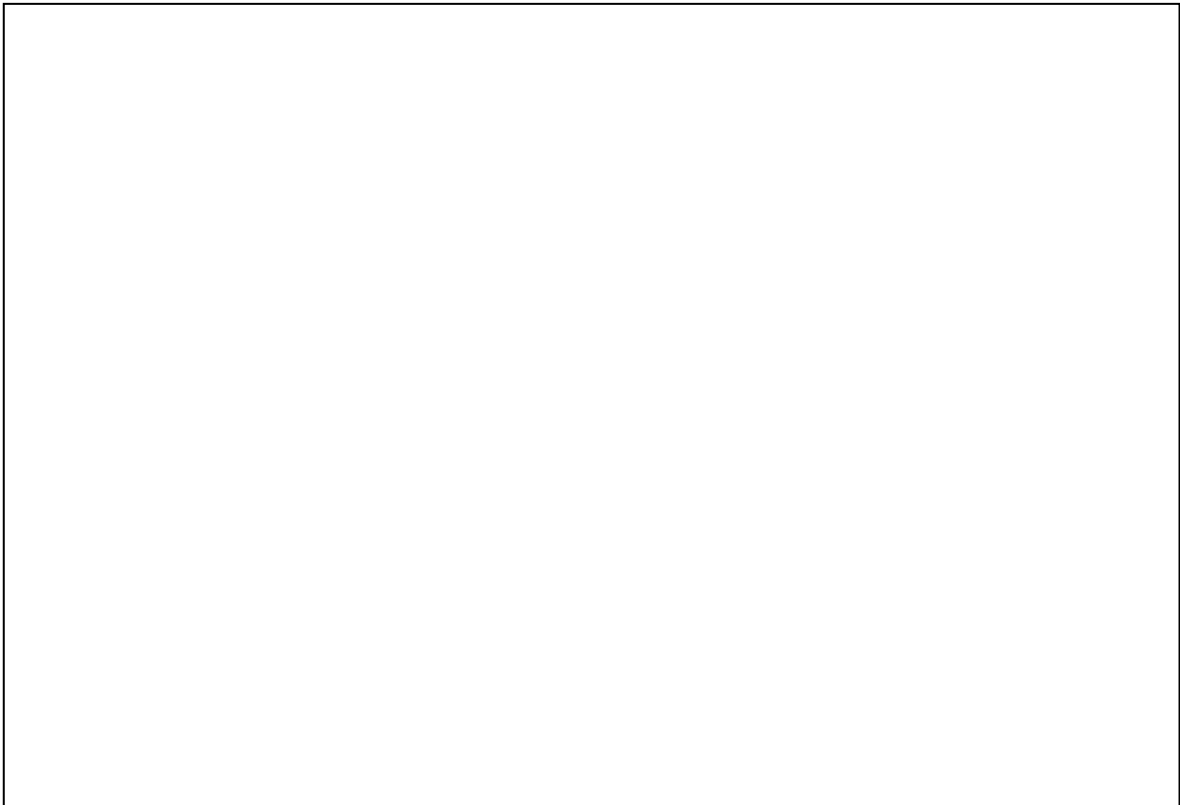




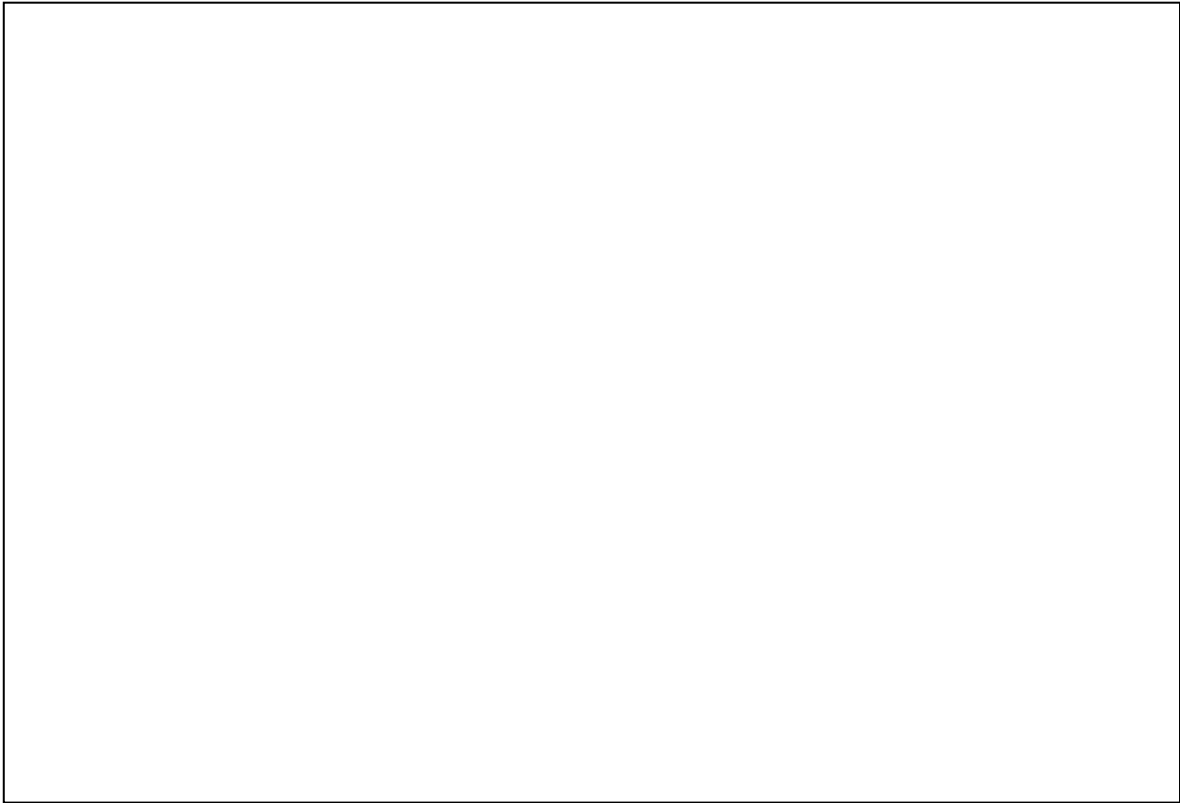
**Fotografía 1.** Infraestructura y aparataje del quirófano experimental.



**Fotografía 2.** Disección de arteria carótida y vena yugular externa



**Fotografía 3.** Tomada de Flujos arterial y venoso en momento Basal.



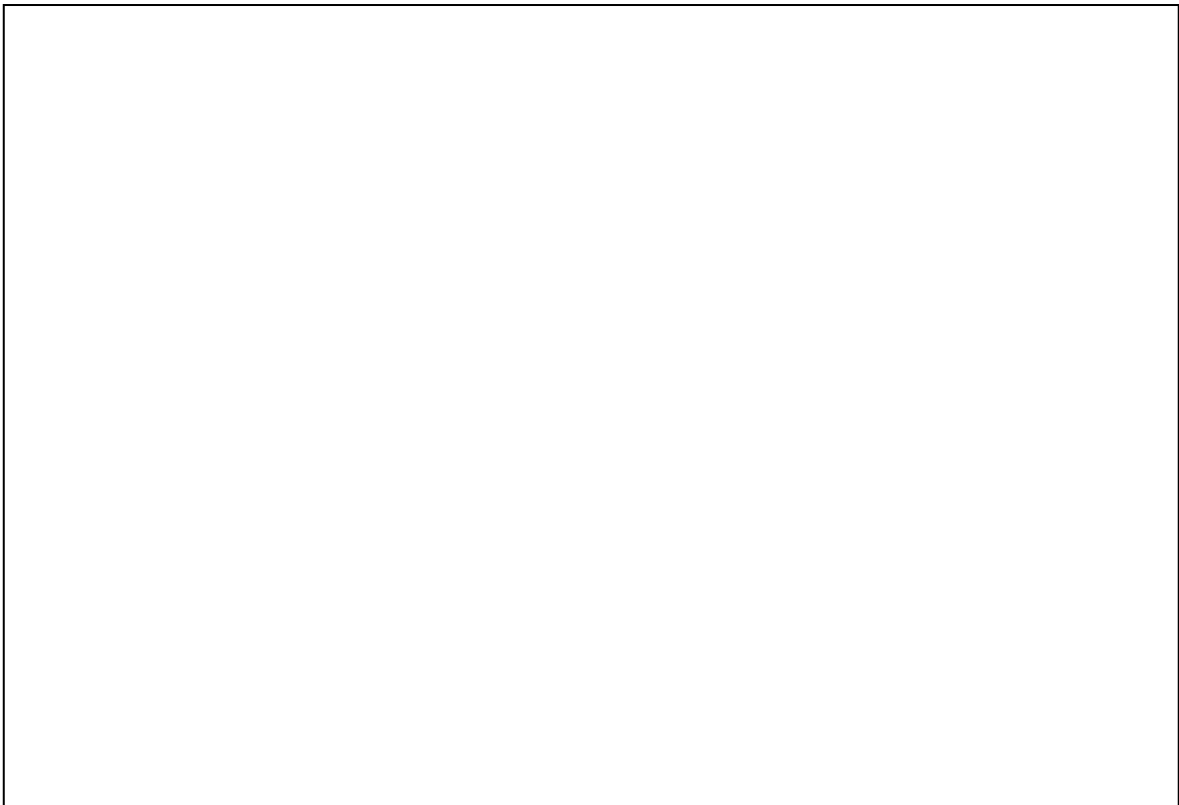
**Fotografía 4.** Transdutores de flujo arterial y venoso.



**Fotografía 5.** Disección de arteria aorta abdominal y vena cava.



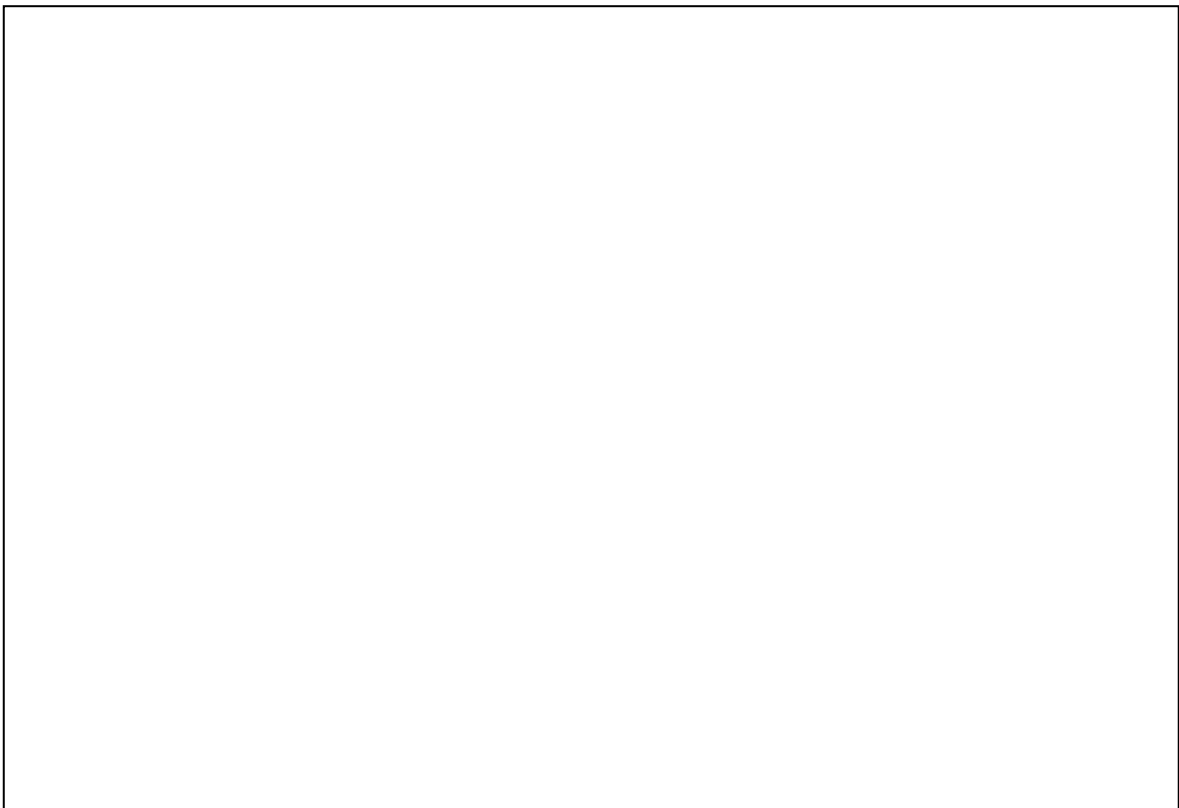
**Fotografía 6.** Canulación de Cava y Aorta.



**Fotografía 7.** Riñones *in situ* tras la perfusión fría con solución de UW.



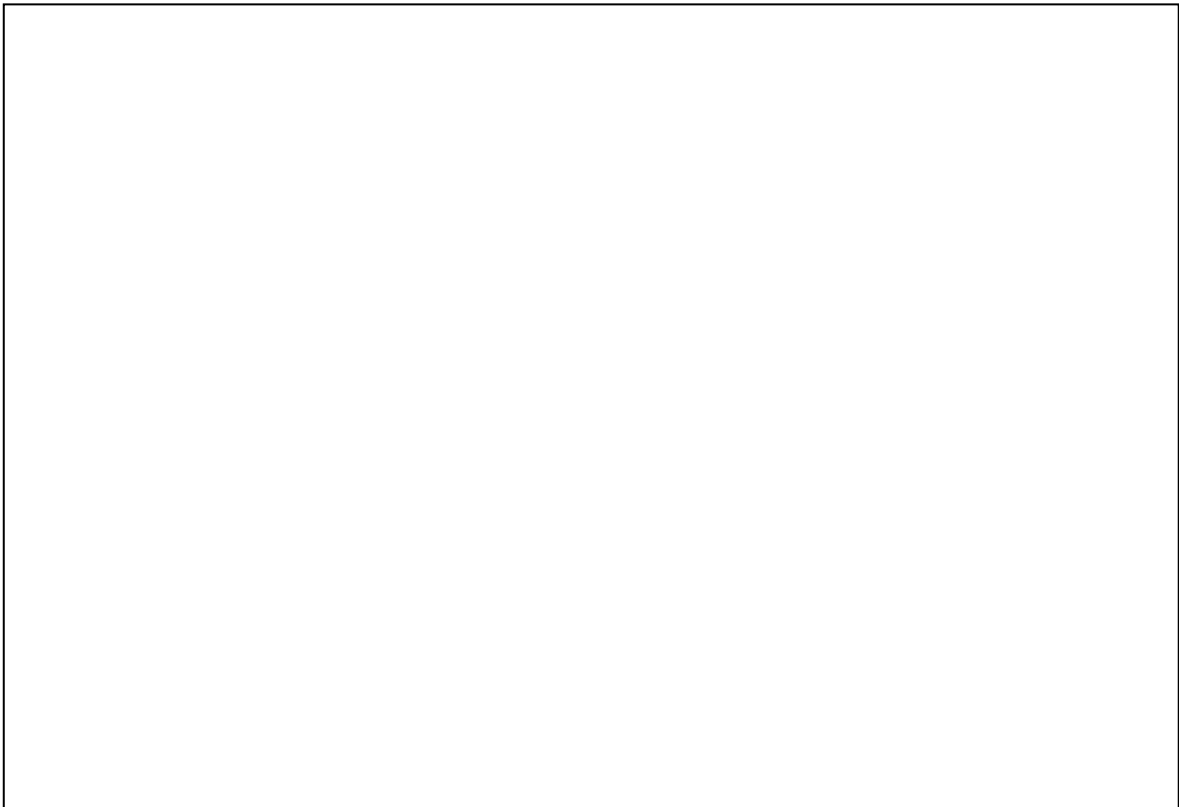
**Fotografía 8.** Anastomosis venosa a vena cava. Arteria renal con su *patch*.



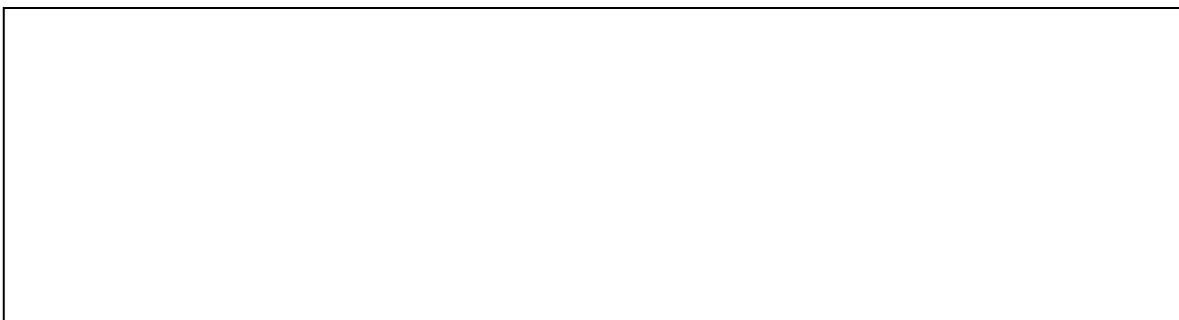
**Fotografía 9.** Anastomosis arterial y venosa. Reperusión



**Fotografía 10.** Reconstrucción del trato urinario.



**Fotografía 11.** Anastomosis arterial y venosa. Reperfusion y tomada de flujos post-reperfusion



## **Fotografía 12. Despertar anestésico**

### **Cuidados postoperatorios**

Una vez finalizada la intervención quirúrgica, el animal permanece intubado con respiración espontánea hasta que el tono neuromuscular y las constantes biológicas se normalicen. A continuación, se procede a la extubación del mismo (fotografía 12, página 69) y se transporta a la corralina. Las muestras de sangre se toman a través del catéter central colocado en la vena yugular externa y tunelizado hasta el dorso. Se controlarán los gases sanguíneos en el postoperatorio inmediato. Se tomarán análisis en los días sucesivos al trasplante. La analgesia se realiza con Meperidina intramuscular (50-100 mg) durante la fase del despertar.

El tratamiento inmunosupresor se inicia después de la inducción anestésica con una dosis de 250 mg de metilprednisolona. Antes de la reperfusión renal, se administran otros 250 mg de metilprednisolona. A partir de las 24 horas, se administró ciclosporina oral a dosis de 20 mg/kg/día hasta el día del sacrificio, además de Aza a 1,5 mg/Kg en todos los grupos de estudio.

La alimentación se inicia a partir de las 12 horas con agua y dieta blanda (yoghurts mezclados con pienso). A partir del segundo día dieta normal. El sacrificio del animal se realiza con Tiopental sódico y KCL (20-30 mEq) por vía intravenosa el quinto día del trasplante. En la necropsia, nos fijaremos fundamentalmente en el aspecto macroscópico del riñón, la integridad de las anastomosis vasculares, la presencia de trombosis vascular y de líquido libre retroperitoneal (linfa, orina, sangre, etc.).

## 5. Determinaciones analíticas y biopsias

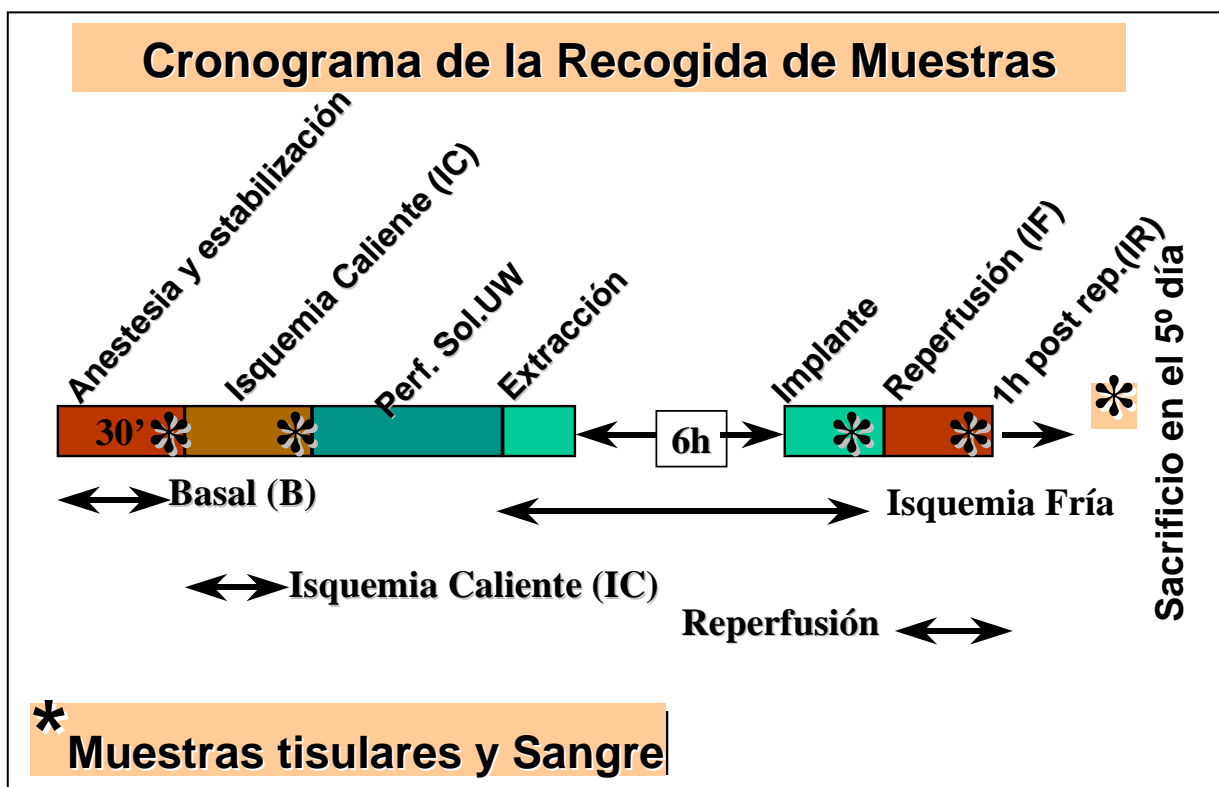
### Cronograma de la recogida de muestras

Las muestras de sangre y de tejido renal se obtienen en los siguientes momentos definidos (figura 6, página 108).

1. - En el animal donante una vez colocados los catéteres, antes de iniciar la parada cardíaca. Sirve como muestra basal (**B**) del propio animal (sangre y muestras de tejido renal en formol y nitrógeno).
2. - Al final del período de parada cardíaca (**IC**). Traduce la lesión aparecida durante todo el período de isquemia caliente (sangre y muestras de tejido renal en nitrógeno). Los animales control no tendrán esta toma de muestras.
3. - Inmediatamente antes de la reperfusión vascular en el animal receptor, durante la realización del trasplante (**IF**). Traduce la lesión después del período total de isquemia, caliente y fría (sangre y muestras de tejido renal en nitrógeno).

4. - Una hora después de la reperfusión vascular (**IR**). Traduce la lesión por isquemia – reperfusión (sangre y muestras de tejido renal en nitrógeno).
5. - Al primer día (**1D**), sólo se obtiene una muestra de sangre (bioquímica) para control evolutivo.
6. - Al tercer día (**3D**), también únicamente se obtiene una muestra de sangre con el mismo fin.
5. - Al quinto día (**5D**), en el animal superviviente (sangre, y muestras de tejido renal en formol y nitrógeno).

**Figura 6:** Cronograma de la recogida de muestras tisulares y de sangre.



**Tipos de muestras y marcadores**



Las muestras que se obtienen en todos los animales, tanto donantes como receptores, en los momentos concretos, son de sangre y biopsias renales. Se explica, con detalle, la extracción y tratamiento de las mismas y los parámetros que se estudian una vez procesadas:

### **Marcadores de lesión celular renal.**

Desde el punto de vista biológico, la lesión renal se manifiesta como un aumento de la **creatinina sérica** que se traduce clínicamente en una insuficiencia renal postoperatoria de diferentes grados. Para cuantificar el nivel de creatinina a lo largo del estudio, se obtienen en cada momento 6 ml de sangre que se depositan en un tubo al vacío (*Vacutainer*®) a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos; el plasma se almacena en alíquotas de 1 ml en microtubos *Eppendorf*® y se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Factores de crecimiento y sustancias vasoactivas.**

- **TGF-beta1:** Ver más extensamente en el apartado 6.2. en la página 75.
- **Endotelina-1 (ET-1):** Se toman 10 ml de sangre y se colocan en un tubo especial de polipropileno que contiene 0.5 ml EDTA sódica con aprotinina (10KU) y *soybean trypsin inhibitor* (1000 U). Se requiere de un mínimo de 2,5 ml de sangre. Se ha de conservar en hielo hasta el momento de la centrifugación. La temperatura óptima de extracción es de  $4^{\circ}\text{C}$ , la temperatura de centrifugación es de  $4^{\circ}\text{C}$  y las alíquotas se conservarán a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- **6-keto-PGF1 $\alpha$  y Tromboxano B2** (se trata del mismo proceso para ambas sustancias y se mide la concentración plasmática de 6-keto-PGF1 $\alpha$  y TXA B2; metabolitos estables de PGI $_2$  y TXA B2). Se toman 7 ml de sangre y se colocan en un tubo especial de polipropileno que contiene 100 $\mu\text{l}$  de solución de aspirina (0,6% inyesprin y 15% EDTA-K3). Se requieren mínimo 3 ml de sangre. El tubo se introducirá en hielo hasta el momento de la

centrifugación. La temperatura óptima de extracción es de 4°C. La temperatura de centrifugación es de 4°C y las alícuotas se conservan a -20 °C.

- **Nitritos/Nitratos (NO):** Se toman 5 ml de sangre y se colocan en tubo de vidrio vacío. La cantidad mínima requerida de sangre es de 0.5 ml. La temperatura de extracción óptima es de 4°C, la de centrifugación de 4°C y las alícuotas se han de conservar a -20°C.

### **Marcadores del estado energético celular.**

La valoración de la reserva energética renal consiste en cuantificar la energía acumulada en la célula renal. Varios parámetros reflejan el estado energético del tejido: el nivel de ATP tisular, el nivel del total de nucleótidos de la adenina y la carga energética tisular (CE).

El nivel de ATP celular indica el nivel de energía que dispone el tejido. La CE representa la habilidad de los mecanismos tisulares para producir energía y esto se correlaciona con la función mitocondrial. Es decir, indica el potencial intacto del tejido para producir energía en detrimento de la cantidad del sustrato que dispone ATP o precursores.

En los momentos del estudio ya definidos (figura 6, página 72), se obtiene una biopsia renal que se congelará rápidamente a -170°C en nitrógeno líquido con el fin de detener el rápido proceso de degradación del ATP. Seguidamente, se guarda en un tubo de Nunc® de 3 ml dentro de una nevera portátil de nitrógeno líquido para su traslado y posterior almacenamiento en un container grande.

### **Estudio histológico**

La lesión renal es evidenciable desde el punto de vista histológico como degeneración y/o necrosis. Las biopsias en cuña que se obtienen del riñón a lo largo del proceso

experimental se guardan en un tubo *Eppendorf*® que contiene formol al 10% para su examen histológico al microscopio óptico.

### **Flujos arteriales y venosos**

Tras finalizar las anastomosis vasculares y habiendo despinzado los vasos se toman los flujos arteriales y venosos renales a tiempo: cero, 5 y 10 minutos tras despinzamiento. La determinación del flujo de la arteria renal se tomará como un índice de las resistencias vasculares dentro del riñón trasplantado; ésta se llevará a cabo mediante un flujómetro electromagnético *Transonic*® de 3 y 5 mm (36), inmediatamente tras la reperfusión sanguínea, a los 5 minutos de la reperfusión y a los 10 minutos de la reperfusión.

## **6. Métodos analíticos y procesamiento de muestras**

Todas la muestras de plasma y de tejido renal se remitieron a los laboratorios de Bioquímica, Anatomía Patológica y Hormonal del Hospital Clínic de Barcelona para que fuesen procesadas. La extracción, procesamiento, y financiación del TGF-beta1 mRNA estuvieron a cargo de los siguientes servicios; laboratorio Hormonal (biólogos moleculares, Sr. Sergio Lario y Sra. Mónica Bescós), Unidad de Trasplante Renal Hospital Clínic de Barcelona (Dr. Josep M Campistol) y Servicio de Nefrología Hospital Clínic de Zaragoza (Dr. Pablo J Iñigo).

### **Pruebas bioquímicas**

La determinación de la **creatinina sérica** se realizó mediante la reacción cinética tamponada de *Jaffé* sin desproteinización en un analizador Cobas Mira® S (*Roche*). El principio de este método se basa en que, en medio alcalino, la creatinina forma con el ácido pícrico un complejo de color amarillo rojizo. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina y se determina fotométricamente a 500 nm. La imprecisión del método para la creatinina sérica se determinó en dos sueros control comercial

(*Precinorm* y *Precipath*, Roche) a dos niveles de concentración. La imprecisión intraserie fue del 1% y la interserie del 1,7% a los dos niveles.

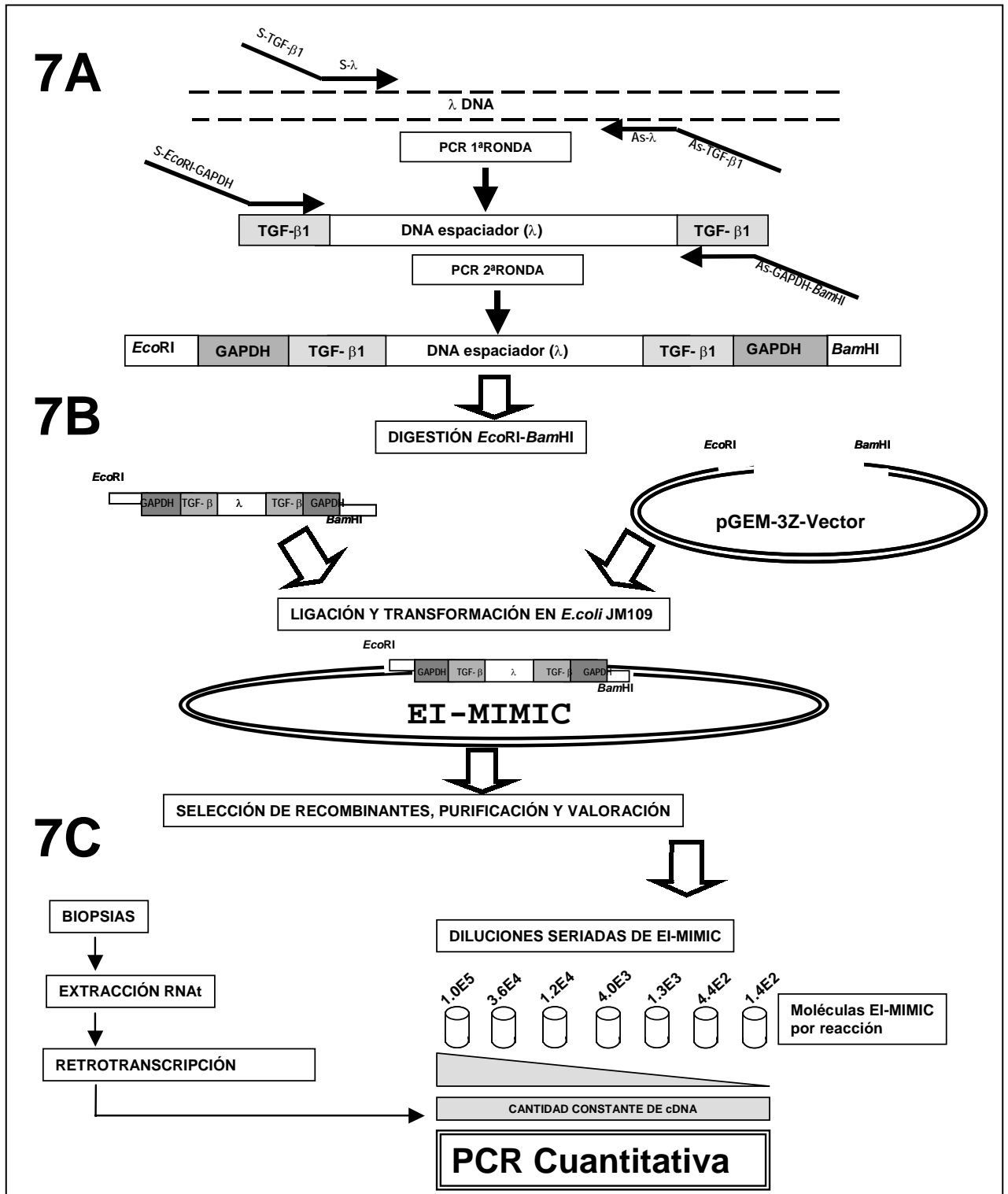
## Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 Y 18s rRNA

### Generación del estándar interno de DNA heterólogo (EI-MIMIC)

Se diseñó un estándar interno heterólogo compuesto por: fago lambda ( $\lambda$ , N° acceso: J02459) como espaciador, secuencias para los cebadores de TGF- $\beta$ 1 (N° acceso: M23703) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, N° acceso: AF017079) y las dianas de restricción para *EcoRI* y *BamHI* para su posterior clonaje. El EI-MIMIC se realizó utilizando una modificación de la metodología PCR MIMICS (*Siebert et al.*). Tanto los cebadores simples como los compuestos fueron diseñados y testados mediante el programa Oligo® 4.01 (*Molecular Biology Insights*). En una primera fase se obtuvo un fragmento de PCR que contenía el DNA espaciador de fago  $\lambda$  y las secuencias para TGF- $\beta$ 1. En una segunda ronda, utilizando este primer amplicón como sustrato, se obtuvo el producto final que contenía el DNA espaciador  $\lambda$ , las secuencias para TGF- $\beta$ 1, las secuencias GAPDH y las dianas de restricción para *EcoRI* y *BamHI* (figura 7A, página 110). El producto de PCR así obtenido y el vector de clonaje pGEM-3Z fueron sometidos a una digestión doble con *EcoRI* y *BamHI* (Promega). Las digestiones fueron purificadas y ligadas con T4 DNA ligasa. La transformación se realizó en células competentes *E.coli*-JM109. Las bacterias transformadas se seleccionaron por screening en presencia de ampicilina-tetraciclina y X-Gal/IPTG (figura 7B, página 110) (pGEM Vector System; Promega). Las colonias que presentaron el plásmido recombinante se hicieron crecer en medio LB, purificándose el plásmido por miniprep (*QIAprep Spin Miniprep kit*, Qiagen). EI-MIMIC fue secuenciado con tal de verificar su identidad (*ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Perkin Elmer®) y cuantificado por espectrofotometría ultravioleta a 260nm (*Kontron Instruments*). Tras determinar el intervalo de expresión de TGF-

$\beta 1$  en riñón de cerdo se realizaron diluciones seriadas del EI-MIMIC que se alicuotaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en la PCR cuantitativa )<sup>354</sup> (figura 7C, página 110).

**Figuras 7A, 7B y 7C:** Procesos de generación del estándar interno de DNA heterólogo.



### 6.2.2. Aislamiento del RNA total:

Las biopsias renales obtenidas durante la cirugía fueron inmediatamente congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido. El RNA total (RNAt) fue aislado por el método del guanidinio-isotiocianato tal y como lo describe (*Chirwin et al.*) Las biopsias renales corticales fueron homogeneizadas en una solución que contiene guanidinio-isotiocianato 4.0M y 2-mercaptoethanol 0.14M con Polytron® (*Kinematica*). El homogenado obtenido se dispensó sobre una solución de cloruro de cesio 5.7M y fue centrifugado a 140.000xg durante 18 horas a 20°C (L8-M *Beckman Ultracentrifuge*). El pellet fue resuspendido en agua tratada con dietilpicrocarbonato (H<sub>2</sub>O-DEPC; *Ambion*), precipitado con acetato sódico 3.0M y etanol absoluto, lavado con etanol 70% (v/v) y resuspendido de nuevo en H<sub>2</sub>O-DEPC. La cuantificación y pureza del RNAt se realizó por espectrofotometría ultravioleta a 260-280nm y la integridad se valoró por visualización de los RNA ribosómicos (rRNA) 18S y 28S en gel de agarosa desnaturizante al 1% (figura 8, página 115). El RNAt fue congelado y almacenado a -80°C hasta su uso en la retrotranscripción <sup>355</sup>.

### 6.2.3. Retrotranscripción (RT)

4 µg de RNAt se retrotranscribieron a cDNA en una reacción que contenía RT *buffer* 1X (50mM Tris-HCl, 50mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM espermidina, 1.0mM DTT)(*Promega*), 500µg/ml de *random primers* (*Promega*), 1.0mM deoxinucleótidos (dNTPs)(*Boehringer Mannheim*), 20U de inhibidor de las RNAsas (Rnasin; *Amersham Pharmacia Biotech*) y 15U de transcriptasa reversa del virus del mioblastoma aviar (AMV; *Promega*). La síntesis del cDNA se realizó en un termociclador *PTC-200 DNA Engine®* (*MJ-Research*) durante 1h a 42°C y posteriormente se desnaturizó la AMV durante 5' a 95°C. Se realizaron dos controles en este paso que después se sometieron a PCR: el primero verifica la posible contaminación de DNA

genómico en el RNAt (AMV-) y el segundo controla la posible contaminación de amplicones en los reactivos de la retrotranscripción (RNA-). Las RTs se mantuvieron a 4°C hasta su uso por no más de 24h. Previa a la reacción encadenada de la polimerasa (PCR) cuantitativa las RT y sus respectivos controles fueron diluidos en ¼ en H<sub>2</sub>O<sup>355</sup>.

### PCR cuantitativa para TGF-β1

Para cada una de las 5 retrotranscripciones (RT) de cada animal se realizó una PCR cuantitativa compuesta por un total de 12 reacciones:

- 7 diluciones de EI-MIMIC que comprendían el intervalo desde  $1.0 \times 10^5$  a  $1.4 \times 10^2$  moléculas por tubo.
- 2 controles positivos, uno conteniendo cDNA (RT+) y otro conteniendo EI-MIMIC (EI-MIMIC+)
- 3 controles negativos: el control de genómico (AMV-), el control de reactivos de la retrotranscripción (RNA-), y el control de reactivos de la PCR sin cDNA ni EI-MIMIC (H<sub>2</sub>O).

La mezcla de reacción estaba compuesta por: buffer de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; Ecogen), 2.0mM dNTPs (*Boehringer Mannheim*), 0.25µM de cebadores (sentido 5' GCC GCT GCT GCT GCC GCT GCT GT; antisentido 5' TCA TAG ATT TGG TTG CCG CTT TC), 0.9mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5U *Taq* DNA polimerasa (Ecogen). Las reacciones que formaban parte de la curva estándar de la PCR cuantitativa contenían 32µl de la mezcla de reacción, 4µl de EI-MIMIC y 4µl de cDNA (diluido ¼). Las muestras así preparadas se dispusieron en un *PTC-200 DNA-Engine®* (*MJ-Research*) en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 5' y 35 ciclos de PCR compuestos por desnaturalización a 94°C 30'', *annealing* a 57°C 30'' y extensión a 72°C 30''. Se incluyó una extensión final de 72°C 5'.

Posteriormente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en agarosa-nusieve al 2.5% (Pronadisa®) durante 90' a 6V/cm y fueron teñidos con bromuro de etidio. El competidor MIMIC presenta un tamaño de 196pb, mientras que el cDNA para TGF- $\beta$ 1 rinde una banda de 339pb. Los geles fueron fotografiados con el sistema *Kodak DC120 Digital Access®* y las intensidades cuantificadas por densitometría mediante el programa *Phoretix-1D® (Nonlinear Dynamics)*. Un experimento representativo de la cuantificación de TGF- $\beta$ 1 se muestra en las (figura 8B, página 115). Los controles negativos se muestran en la (figura 8C, página 115) <sup>354</sup>.

El cociente entre las densidades corregidas por tamaños de EI-MIMIC y cDNA (factor de corrección: EI-MIMICx1.73) se representaron en función de la cantidad inicial de EI-MIMIC presente en cada reacción y sometida a regresión lineal por medio de *GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software Inc)*. El punto de corte con el eje de abcisas representa la cantidad inicial de cDNA presente en la muestra. El resultado final se expresa como moléculas de TGF- $\beta$ 1/ $\mu$ g de RNA<sub>t</sub> (figura 8B, página115). Antes de normalizar los resultados con logaritmo natural (ver ANÁLISIS ESTADÍSTICO), el coeficiente de variación intraensayo (%CVi) para la suma de RT, PCR cuantitativa y densitometría fue del 21.2% (n=8), tras la normalización el %CVi se fijó en 2.8%.

### **Amplificación de 18S rRNA como *housekeeping***

En este estudio se decidió sustituir el gen *housekeeping* GAPDH presente en el EI-MIMIC por la valoración semicuantitativa de 18S rRNA con la finalidad de confirmar tanto la celularidad como la valoración de los RNA testados. Existen evidencias (*Zhong et al.*) que indican que GAPDH es muy variable bajo condiciones de hipoxia y se sugiere que estas variaciones serían más acusadas durante la isquemia que sufre el riñón durante el transplante. De entre todos los genes *housekeeping* revisados por este grupo bajo condiciones de hipoxia el 28S fue el menos variable (28S y 18S se transcriben en un mismo rRNA 45S que es después cortado para obtener los distintos rRNA) <sup>356</sup>.

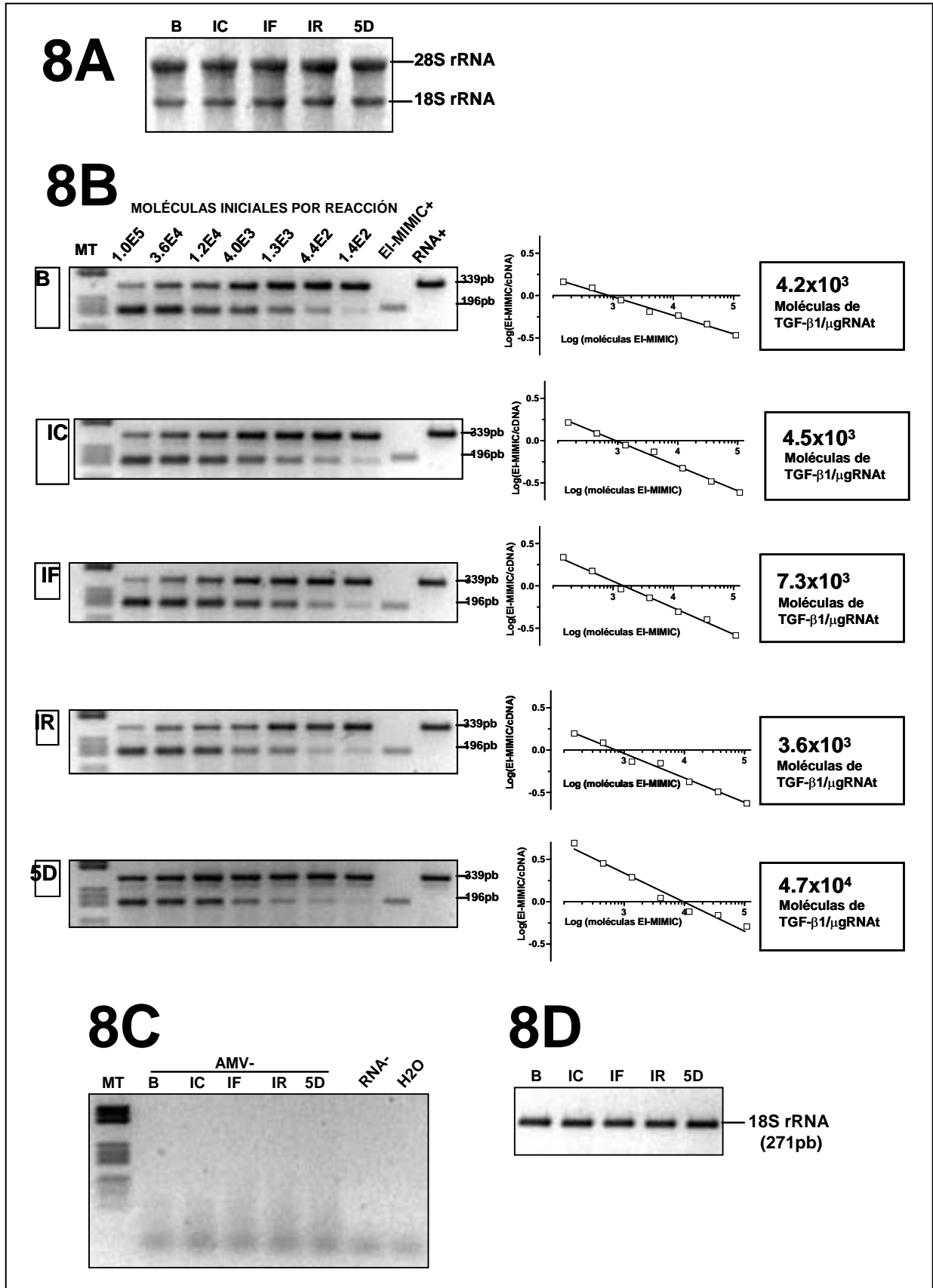


Se diseñaron unos cebadores específicos para 18S rRNA: (Nº Acceso: AF179868, AF102857): sentido 5' CGT CCC CGC CCC TTG CCT CT; antisentido 5' GCT TTC GCT CTG GTC CGT CTT que generan un producto de 271bp. Se testaron varias diluciones del cDNA a distintos ciclos de PCR con tal de determinar la linealidad de la PCR. Las condiciones finales fueron: PCR buffer 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; Ecogen), 2.0mM dNTPs (*Boehringer Mannheim*), 0.5 $\mu$ M de cebadores, 2.0mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5U *Taq* DNA polimerasa (Ecogen). El cDNA se diluyó 1/40 y 4.0 $\mu$ l fueron sometidos a 22 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 5' y 35 ciclos de PCR compuestos por desnaturalización a 94°C 30", *annealing* a 60°C 30" y extensión a 72°C 30". Se incluyó una extensión final de 72°C 5'. Posteriormente, los productos de PCR se cargaron en agarosa 2.0% (Pronadisa®), se hicieron correr 60' a 6V/cm y fueron teñidos con bromuro de etidio (figura 8D página 115). Las imágenes fueron adquiridas y tratadas como en el caso de TGF- $\beta$ 1. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densitometría (UAD). El %CVi para la suma de la RT, PCR semicuantitativa y densitometría fue del 4.4% (n=7).

Figura 8A: Aislamiento de RNA total

Figura 8B y 8C: PCR cuantitativa para TGF-beta1

Figura 8D: Amplificación del 18S rRNA como *housekeeping*.



## Método analítico para la determinación de marcadores endoteliales.

### Óxido Nítrico (NO)

Es una modificación de la técnica <sup>360</sup> de la determinación fluorimétrica de nitritos. Se basa en la reacción del 2,3-Diaminonaftaleno con los nitritos que en condiciones ácidas da lugar al compuesto fluorescente 1-(H)- naphotriazole. Es necesaria la filtración previa en columna *Ultrafree® MC, (UFC4 LGC, Millipore Corp, Bedford Ma)* para evitar interferencias de componentes del suero. Se trata de una técnica de desarrollo propio del Hospital Clínico. Los límites de detección abarcan: 0.01 nmol/ml –50 nmol/ml.

Posibles interferencias:

- Químicas : hemoglobina, proteínas séricas, rojo fenol. Se debe prestar atención a la posible contaminación de nitratos en los reactivos (incluso agua bidestilada)
- Medicamentosas: nitrovasodilatadores.

### Endotelina 1 (ET-1)

La concentración plasmática de endotelina se determina <sup>357</sup> . por radioinmunoensayo (RIA) previa extracción del péptido en cartuchos de *Sep-Pak® C18 (Waters Associates, Mildford, MA, USA)*. Las muestras plasmáticas (2ml) se acidifican con ácido acético (4%, 3 ml) y se aplican a los cartuchos preactivados con metanol (5ml) y ácido acético (5ml, 4%). Recogemos el eluato y se aplica a la columna de nuevo. A continuación, se procede al lavado del cartucho con agua bidestilada (3ml) y etanol (25%, 3ml). La endotelina inmunoreactiva se eluye (2ml) con ácido acético (4%) y etanol (86%). El eluato se concentra mediante *Speed Vac®* y la concentración del péptido en el extracto se determina por RIA.

La marca del aparato es: *Nichols Institute Diagnostics® B.V.* El origen: *Wijchen, The Netherlands*. El límite de detección es de 1 pg/ml. El coeficiente de variación intraensayo es

de 8%, el coeficiente de variación interensayo es del 13%. El rango de los valores es de 2-5 pg/ml.

- **6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  y TXA A2**

Tanto el TXA B2 como la 6-Keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  se extraen del plasma mediante columnas de Sep-Pak® (Waters Associates, ODS C-18) y se determinan <sup>358,359</sup> por enzimoimmunoensayo (Amersham Int., Buckinghamshire, UK). Una vez acidificado el plasma (1ml) con ácido acético, la muestra se aplica a los cartuchos preactivados con etanol y agua destilada. Los cartuchos se lavan con agua destilada y éter de petróleo, el Tromboxano A2 o la PGI2 se diluyen con 4 ml de formiato de metilo. La concentración de ambos en el concentrado del eluato se determina por EIA. El límite de detección es de 0,5/pozo. El coeficiente de variación intraensayo es de 9% y el interensayo es del 17%. Los resultados se expresan en pg/ml.

Posibles interferencias:

- Químicas: paraaminohipurato
- Medicamentosas: inhibidores de la ciclooxigenasa y para la prostaglandina también los antiinflamatorios no esteroideos.

### **Método analítico para la determinación de nucleótidos de la adenina y sus derivados metabólicos**

La concentración de ATP y de los nucleótidos derivados de su degradación metabólica se han determinado, en el tejido renal, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) <sup>360</sup>.

Se ha elegido este método por considerar que se trata de una técnica de mayor sensibilidad que los métodos enzimáticos, y solo requiere pequeñas muestras de tejido para su cuantificación.

- **“Procesamiento”**

A las muestras de tejido renal se les añadió ácido perclórico (1 ml, 0,6 N) a una temperatura de 4 ° C con la finalidad de homogeneizar y separar los compuestos de interés de la matriz proteica. Posteriormente, las biopsias fueron homogenizadas con un sistema *Polytron*® 10 ST durante 3 x 10 segundos manteniendo el medio a 4°C mediante inmersión de las muestras en baño de hielo. Tras centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos manteniendo la temperatura, el sobrenadante obtenido (0,5 ml) fue neutralizado con carbonato potásico al 9% hasta obtener un pH 7 (0,3 ml). Una vez transcurridos 15 minutos, se realizó una segunda centrifugación en frío para separar el precipitado del perclorato potásico formado.

El extracto neutralizado obtenido fue diluido a la mitad con tampón de dihidrogenofosfato de amonio 0,10 M (fase móvil), e inyectado para su análisis en el sistema cromatográfico.

- **“Análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía en fase reversa”**

La determinación de las concentraciones de los nucleótidos y sus derivados se realizó mediante HPLC en columna de fase reversa de 20 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro interno empaquetadas con Nucleosil C.18, de 5 micrometros de diámetro de partícula.

Para la fase móvil se utilizó un tampón dihidrogenofosfato de amonio 0,10 M preparado a partir de 6,7 ml de ácido fosfórico (PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>) al 85 % por litro y amoniaco (NH<sub>4</sub>) al 25% hasta alcanzar un pH 6. El flujo se mantuvo a 1 ml/min.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se identificaron los metabolitos de las muestras en estudio, mediante la comparación de los tiempos de retención en la columna con los tiempos obtenidos de una mezcla de estándares de ATP, ADP, AMP, hipoxantina y xantina de concentración conocida.

Las concentraciones de las sustancias en estudio (expresadas en  $\mu\text{mol/ml}$  de extracto), se obtuvieron por extrapolación de las áreas del cromatograma sobre rectas de calibración construidas a partir de cinco concentraciones distintas de estándares.

A partir del valor de las concentraciones de nucleótidos en las biopsias se calcula para cada muestra de tejido renal la proporción sobre el basal de cada nucleótido y derivados (ATP + ADP + AMP + Hipoxantina + Xantina) en cada fase del estudio y la carga energética de adenilatos (CE). Para esta última, se ha empleado la siguiente fórmula de *Atkinson* descrita en la literatura <sup>361</sup>:

$$\text{CE} = (\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$$

### Muestras histológicas

- “Procesamiento de las muestras”

Se obtuvieron muestras en cada una de las etapas del estudio citadas:

Basal (**B**) y 5º día (**5D**).

El examen anatomopatológico se realizó con el microscopio óptico. El material para microscopía óptica fue fijado en una solución de formol al 10% e incluido en parafina. La inclusión se realizó con un procesador de tejido *Citadel 2000®* de (*Shandon*). El punto de fusión de la parafina utilizada fue de 58º-60ºC.

Los bloques de tejido parafinado fueron cortados con un microtomo de rotación de *Reichert-Jung 2035®* hasta obtener cortes de tejido con un espesor aproximado de 3 micras. Estos cortes fueron desparafinados y teñidos con Hematoxilina-Eosina.

- **“Valoración anatomopatológica de las muestras”**

Para clasificar los riñones en viables y no viables se siguió el criterio anatomopatológico en la muestra histológica tomada al 5º día. Se definió como **Riñón no viable aquel que presentaba necrosis cortical**. Esto se comparó con la evolución clínica del animal y la existencia o no de diuresis (habíamos observado orinar al cerdo y/o presentaba orina al 5D en pelvis renal).

A continuación se exponen los criterios anatomopatológicos teóricos que se han seguido para clasificar el grado de las lesiones a nivel de las diferentes células de la nefrona y vasos, detectadas en las muestras de biopsias renales obtenidas en los diferentes tiempos evolutivos.

**“Valoración de la necrosis”:**

se realizó de modo cualitativo. La **necrosis cortical** fue valorada como presente o ausente y en los casos en que se observó necrosis cortical parcial se describió el porcentaje de área afectada respecto al total de la muestra estudiada. Muestra una afectación difusa de todos los componentes de la corteza renal. Los cambios típicos de necrosis consisten, básicamente, en una marcada eosinofilia celular global con preservación de los límites celulares.

La **necrosis tubular aguda** fue valorada en 4 grados (0: ausente, 1: leve, 2: moderada, 3: severa) en función de la extensión y severidad de las lesiones observadas en el examen histológico de las muestras. Resultó dificultosa de evaluar en los casos en que se observó algún signo de rechazo. Se manifiesta característicamente por un edema en la región intersticial acompañado de un escaso infiltrado inflamatorio que no afecta a las células tubulares. Frecuentemente, los túbulos muestran lesiones leves y focales que consisten en dilatación de la luz tubular y adelgazamiento del citoplasma de las células epiteliales tubulares.

El borde luminal “en cepillo” de las células tubulares se halla alterado, estando parcial o totalmente ausente. También puede observarse ruptura de la membrana basal y fenómenos de apoptosis (visibles en la microscopía óptica) en múltiples puntos de la nefrona. A diferencia de la necrosis cortical, no se observa afectación de los glomérulos y vasos, aunque ocasionalmente se evidencian trombos de fibrina en los vasos intraglomerulares. En ocasiones, se pueden apreciar fenómenos de regeneración tubular con aumento del tamaño nuclear y presencia de nucleolo evidente.

**“Valoración del rechazo”:**

se realizó según los criterios de *Banff* correspondientes a la revisión de 1997 <sup>362</sup> (tablas 3,4,5 y 6):

Criterios cuantitativos para:

**Tabla 3: criterio para el análisis de la Tubulitis**

<b>Tubulitis (“T”)</b>	
T0	No células mononucleadas en los túbulos
T1	Focos con 1 a 4 células/ sección tubular o 10 células tubulares
T2	Focos con 5 a 10 células/sección tubular
T3	Focos con >10 células/sección tubular, o presencia de al menos 2 áreas de membrana basal destruida acompañada por inflamación i2/i3 y t2 tubulitis en otra parte de la biopsia

**Tabla 4: criterio para el análisis de la Inflamación intersticial**



<b>Inflamación Intersticial por mononucleares (“i”)</b>	
I0	Inflamación inexistente o trivial (<10% del parénquima afecto)
I1	10 al 25% de células inflamatorias en el parénquima
I2	26 al 50% del parénquima inflamado
I3	>50% del parénquima inflamado
Indica la presencia de un número remarcable de eosinófilos, polimorfonucleares y/o células plasmáticas.	

**Tabla 5: criterio para el análisis de la Glomerulitis**

<b>Glomerulitis temprana del injerto (“g”)</b>	
G0	No glomerulitis
G1	Glomerulitis en la minoría de glomérulos
G2	Glomerulitis segmental o global (25-75% de glomérulos)
G3	Glomerulitis global en todos o casi todos los glomérulos

**Tabla 6: criterio para el análisis de la Arteritis intimal**

<b>Arteritis intimal (“V”)</b>	
V0	No arteritis
V1	Arteritis intimal media-moderada en, al menos, una sección arterial
V2	Arteritis intimal severa con pérdida, como mínimo del 25% del área luminal de al menos una sección arterial transversa
V3	Cambio fibrinoide arterial y/o arteritis transmural con necrosis del músculo liso de la media

“Valoración de otras lesiones observadas”: en algunas muestras se observaron evidentes lesiones de pielonefritis aguda. Ello dificultó la evaluación de las lesiones propias del daño por isquemia-reperfusión. En los casos en que la muestra se tomó en el animal muerto, se observó autólisis.

## 7. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS <sup>363-366</sup>.

Se presentarán los resultados de los cuarenta casos estudiados divididos en: los resultados descriptivos, los resultados analíticos, la evolución temporal de las variables en función de los grupos, las correlaciones entre los marcadores, el estudio de viabilidad de manera univariante y finalmente un modelo pronóstico y predictivo de la viabilidad con los marcadores estudiados.

Para el análisis descriptivo de la muestra, las variables cuantitativas, los marcadores en todas sus fases, se expresaron con la media, desviación típica, mínimo y máximo. Las variables cualitativas se expresaron con el número de casos y su porcentaje.

Se realizó la prueba de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*, de los marcadores continuos para evaluar si cumplían las condiciones de aplicabilidad de las pruebas paramétricas posteriores. Después de rechazada la hipótesis nula de normalidad en ADP, NO y PGI<sub>2</sub>, estos fueron normalizados utilizando la transformación logarítmica. Aunque el modelo Lineal General empleado ya lo contempla también se estudió la homogeneidad de los parámetros basales entre los grupos de estudio mediante un *ANOVA (análisis de la varianza)*.

- Bajo el primer objetivo, en el estudio del TGF-beta y los demás marcadores durante las fases del estudio en función de los grupos de isquemia progresiva y control se procedió con un análisis de la variancia (ANOVA) proporcionado por el Modelo lineal General de

medidas repetidas. Este modelo contrasta los efectos tanto de los factores inter-sujetos (Grupos), intra-sujetos (Fases) como la interacción (Grupos x Fases);

- a) Evolución de la variable en general a través de las fases del estudio; Intrasujetos
- b) Evolución de la variable en función del grupo a través de las fases. Interacción.
- c) Grupos de estudio: Control, 30, 45 y 90 minutos de isquemia; Intersujetos

El estudio del comportamiento de las sustancias vasoactivas (ET-1, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, NO), se analizó por separado para los animales donantes (fases B y IC) y para los animales receptores (fases IF, IR y 5D) dado que las muestras eran de dos órganos totalmente independientes por la característica de la liberación sanguínea de las sustancias aquí estudiadas.

- En el estudio bivalente de viabilidad (S/N) se utilizó la prueba ANOVA de un factor (análogo al *Test* de la *T-d'student*) para la comparación de los marcadores (variables continuas) entre los dos grupos. Y para evaluar la existencia de asociación entre los Grupos y el hecho de ser viable el órgano o no, se utilizó la prueba exacta de *Fisher* dado que los datos no cumplían las condiciones de aplicabilidad de la Chi-cuadrado.
- Un análisis de correlación bivalente entre todas las variables cuantitativas entre si mediante el *coeficiente de correlación de Pearson* sirvió para se determinar que marcadores estaban correlacionados y su significación estadística de manera general, por fases y por grupos de estudio.
- El estudio de viabilidad a nivel multivariante se realizó mediante un modelo de *regresión Logística*. La construcción de un modelo predictivo y pronostico permitió analizar que marcadores eran determinantes en la fase I-R para la viabilidad del órgano.

La introducción de datos se realizó mediante la Hoja de datos *Excel*® 7,0 y *Windows*® 98 y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico *SPSS*® 10,0 para *Windows*® 98.

Se tomó como significación estadística  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1. Resultados descriptivos

#### 1.1. Variables cualitativas

Se estudiaron aisladamente las variables categóricas o cualitativas con el objetivo de describir sus distribuciones de frecuencia, de observar la histología al quinto día, de identificar cómo se relacionaba la viabilidad con el tiempo de isquemia.

#### **Distribución de frecuencias de las variables cualitativas**

Se observó en la distribución de frecuencias de los animales estudiados según las variables cualitativas del estudio: tiempo de isquemia caliente, viabilidad, uso de CsA, histología al quinto día. Los cuarenta casos estudiados fueron válidos para el análisis estadístico, no hubo casos perdidos.

#### **Distribución de frecuencia según los tiempos de isquemia**

En lo concerniente a la distribución de las frecuencias de los casos válidos para los grupos estudiados –control y tiempos de isquemia progresivos 30, 45 y 90 minutos, se observa una distribución uniforme y constante de diez animales en cada grupo de estudio.

#### **Distribución de frecuencia según la viabilidad de los órganos**

En lo concerniente a la viabilidad de los órganos estudiados, se observó que a los cinco días del trasplante, la viabilidad obtenida con los diferentes grupos de estudio sumados conllevaba una viabilidad general del 80%, que queda reflejada en la tabla 7.

La viabilidad de los órganos a los cinco días del trasplante, según los datos obtenidos en los diferentes grupos de estudio y en función del tiempo de isquemia caliente (IC) de 30, 45 y 90 minutos presentaron una viabilidad del 80% para los dos primeros, y del 60% para el último.

**Tabla 7–** Distribución de frecuencias de la viabilidad general del estudio

<b>Viabilidad</b>		
	Frecuencia	Porcentaje
No	8	20.0
Sí	32	80.0
Total	40	100.0

#### **Distribución de frecuencia según el uso de la ciclosporina**

Como se puede deducir de la observación de las tablas 8 y 9, en el grupo de control apenas se compararon animales con el uso de la ciclosporina A y sin él, ya que en todos los grupos con isquemia caliente se mantuvo el uso de la CsA.

**Tabla 8 –** Distribución de frecuencia del uso de la CsA en el grupo de control estudiado

<b>Uso de Ciclosporina</b>		
	Frecuencia	Porcentaje
No	5	12.5
Sí	35	87.5
Total	40	100.0

**Tabla 9** – Distribución de frecuencia del uso de la CsA en el grupo de control y los grupos con isquemia caliente progresiva

			Uso de Ciclosporina		
			No	Sí	Total
Tiempo de isquemia	0	Recuento	5	5	10
	30	Recuento		10	10
	45	Recuento		10	10
	90	Recuento		10	10
Total		Recuento	5	35	40
			12.5%	87.5%	100.0%

### Anatomía patológica

#### Muestra basal

Los cambios encontrados en las muestras intraoperatorias (basal) no fueron destacables. **Sólo** destacó la presencia de una vacuización citoplasmática e edema celular en algunas muestras aisladas que, en ocasiones, se produce durante el procesamiento histológico habitual de las muestras.

#### Muestra al quinto día

Se dio una distribución equitativa de lesiones histológicas identificadas al quinto día (tabla 10). Permanecía en estado normal (Normal) un 27,5% de los órganos; 12,5% presentaron necrosis cortical total (NC), y el 60% restante de los órganos presentó necrosis tubular aguda (NTA). Tres órganos presentaron concomitantemente NC 10% y NTA +++ (tabla 11) .



**Tabla 10** - Distribución de frecuencia del diagnóstico histopatológico al quinto día para todos los casos estudiados

NECROSIS TUBULAR		
	Frecuencia	Porcentaje
No	11	27.5
NTA +	15	37.5
NTA ++	5	12.5
NTA+++	4	10.0
NC	5	12.5
Total	40	100.0

Una vez distribuidos el grupo de control y los grupos de isquemia, no se observaron variaciones significativas para el diagnóstico histopatológico al quinto día (tabla 10). Tres órganos presentaron concomitantemente NC 10% y NTA+++; uno en el grupo de 30 minutos de isquemia y dos en el grupo de 90 minutos de isquemia (tabla 11).

**Tabla 11** – Distribución de frecuencia del diagnóstico histopatológico al quinto día según el grupo control y los grupos de isquemia

		NECROSIS TUBULAR					Total
		Normal	NTA +	NTA ++	NTA+++	NC	
Tiempo de isquemia	0	5	5				10
	30	3	3	2	1	1	10
	45	2	5		1	2	10
	90	1	2	3	2	2	10
Total		11	15	5	4	5	40

La distribución de la necrosis cortical fue de dos órganos para cada grupo de 30 y 60 minutos, y cuatro para el grupo de 90 minutos de isquemia (tabla 12). Tres órganos presentaron concomitantemente NC 10% y NTA+++; uno en el grupo de 30 minutos de isquemia y dos en el grupo de 90 minutos de isquemia (tabla 13). Las variaciones no fueron significativas.

- **Grupo de control**

No se observaron cambios de necrosis cortical en ninguno de los animales del grupo (n=10). **Sólo** destacaron dos casos de necrosis tubular aguda leve (NTA +) (fotografía 13, página 136). Se observaron signos leves de tubulitis en tres animales (fotografía 14, página 136). Un animal presentó signos de rechazo vascular.

- **Grupo de 30 minutos de isquemia**

Se observó necrosis cortical en dos animales; en uno de ellos, con afectación del 10% y en el otro, del 100% de la muestra. Cinco animales presentaron NTA: dos moderada, 3 leve. Tres animales presentaron histología normal. Los cambios en túbulos, glomérulos e intersticios fueron leves. Se evidenciaron dos casos de rechazo vascular (fotografía 15, página 137).

- **Grupo de 45 minutos de isquemia**

Dos animales presentaron necrosis cortical. Seis animales presentaron NTA, cinco leve y uno grave (fotografía 16, página 137). Dos animales presentaron histología normal. Los cambios en túbulos, glomérulos e intersticios fueron leves. No se evidenció rechazo vascular.

- **Grupo de 90 minutos de isquemia**

En este grupo se evidenciaron los cambios más destacables. Se observó necrosis cortical en cuatro animales, aunque **sólo** en dos fue del 100% (fotografía 17, página 138). En los

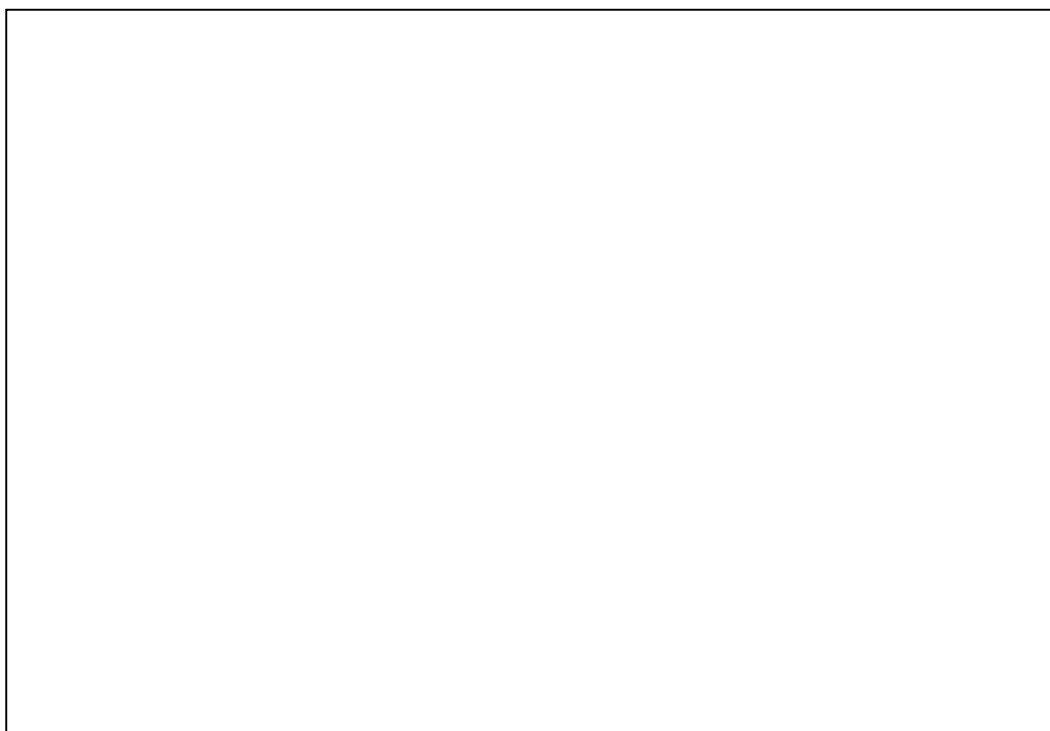
otros dos casos fue parcial y se acompañaba de NTA muy marcada. Únicamente un caso no evidenció cambios de NTA. La afectación intersticial y tubulitis fueron moderadas o graves. No se evidenció lesión glomerular ni rechazo vascular.

**Tabla 12** – Distribución de frecuencia del diagnóstico de necrosis cortical según los grupos de estudio

			Necrosis cortical		
			0 No	1 Sí	Total
Tiempo de isquemia	0	Recuento	10		10
		Porcentaje	100.0%		100.0%
	30	Recuento	8	2	10
		Porcentaje	80.0%	20.0%	100.0%
	45	Recuento	8	2	10
		Porcentaje	80.0%	20.0%	100.0%
	90	Recuento	6	4	10
		Porcentaje	60.0%	40.0%	100.0%
Total		Recuento	32	8	40
		Porcentaje	80.0%	20.0%	100.0%

**Tabla 13** – Distribución de frecuencia de los cuarenta casos estudiados según la NC, la NTA, la histología normal

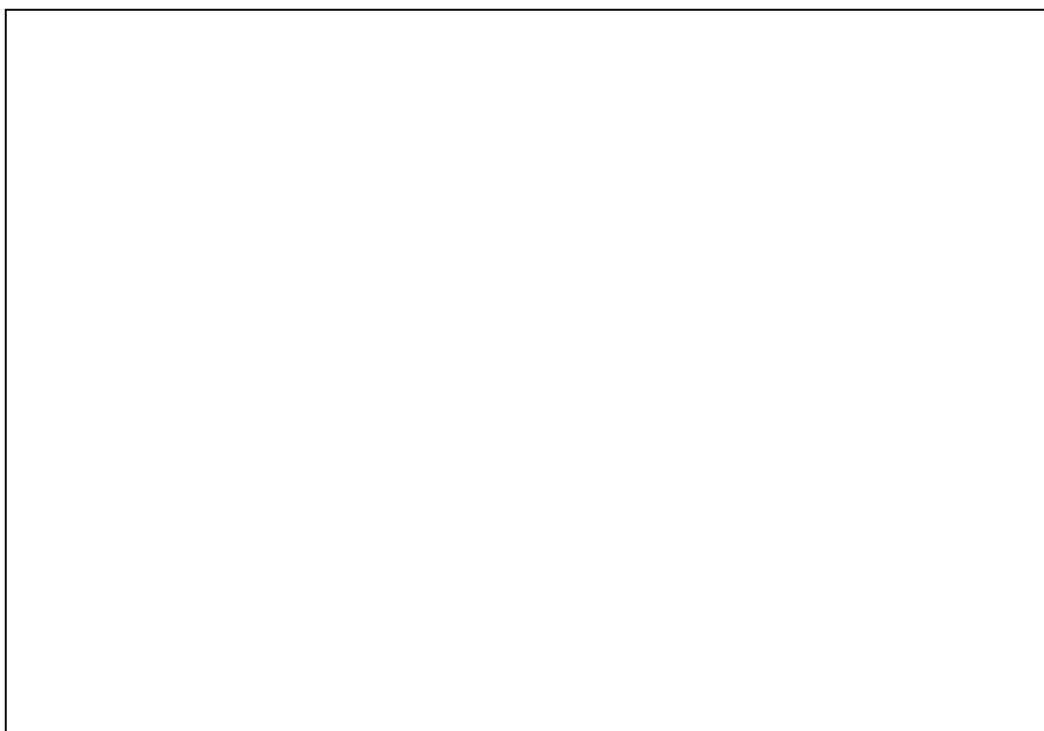
Recuento		Necrosis cortical		
		0 No	1 Sí	Total
Necrosis Tubular	Normal	11		11
	NTA +	15		15
	NTA ++	5		5
	NTA+++	1	3	4
	NC		5	5
Total		32	8	40



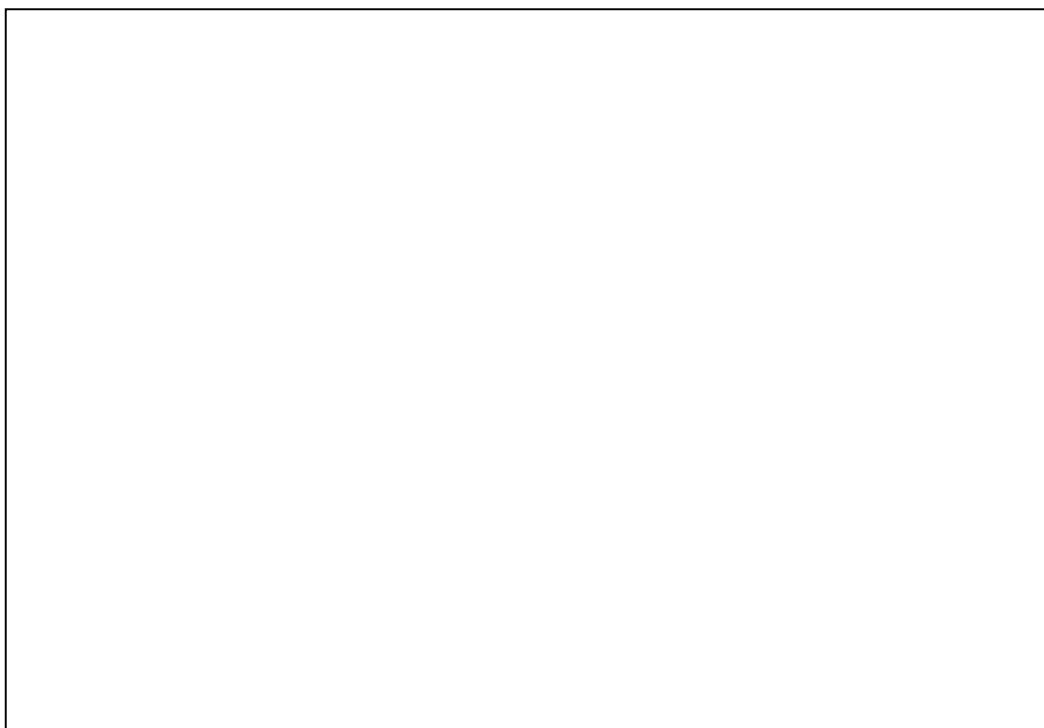
**Fotografía 13.** Necrosis tubular aguda. Hematoxilina-eosina 200x



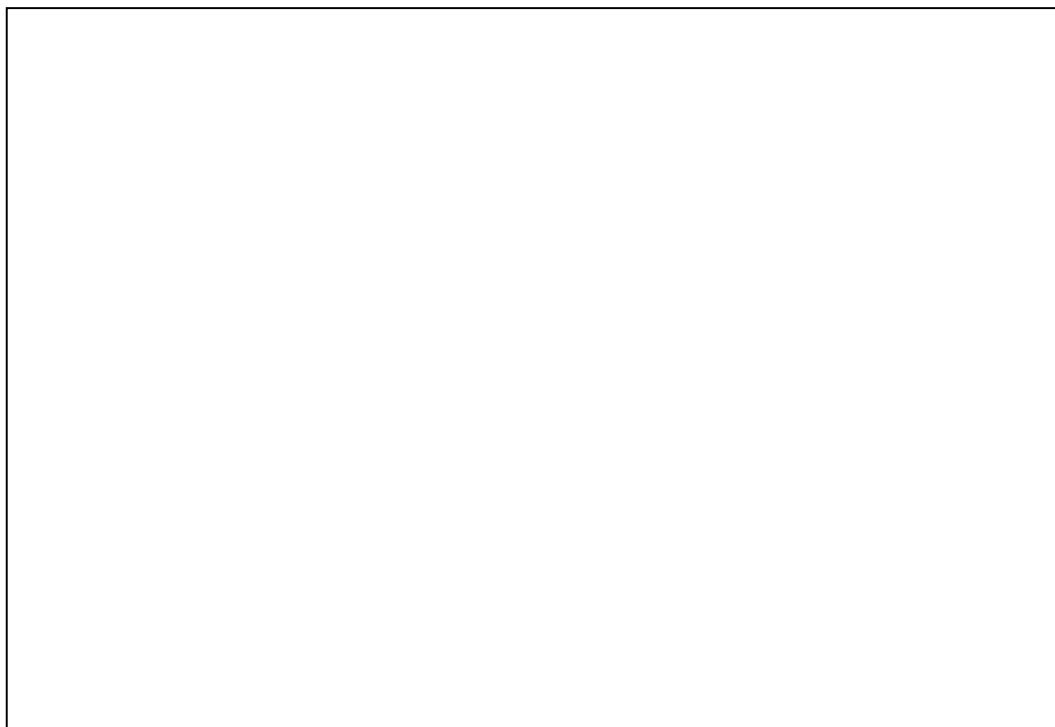
**Fotografía 14.** Tubulitis leve. Infiltración de un túbulo por linfocitos. Hematoxilina-eosina 400x



**Fotografía 15.** Rechazo vascular leve. Arteria con infiltración de linfocitos. Hematoxilina-eosina 400x



**Fotografía 16.** Tubulitis severa. Los túbulos han desaparecido debido a la inflamación masiva por linfocitos. Hematoxilina-eosina 400x



**Fotografía 17.** Necrosis cortical. Hematoxilina-eosina 400x

### Viabilidad según los grupos de estudio

La viabilidad de los órganos fue analizada para los cuatro grupos estudiados, presentando un resultado estadísticamente significativo ( $p=0,011$ ). De manera que a mayor tiempo de isquemia, menor viabilidad, según los datos obtenidos en los cuatro grupos (tabla 14).

**Tabla 14** – Viabilidad por grupos de estudio

		Viabilidad		
		No	Sí	Total
Tiempo de isquemia	0		10	10
	30	2	8	10
	45	2	8	10
	90	4	6	10
<b>Total</b>		8	32	40

## 1.2. VARIABLES CUANTITATIVAS

Se estudiaron de forma aislada las variables cuantitativas o continuas con el objetivo de describirlas, y determinar si seguían una distribución normal, conocer las medias, desviaciones estándar, valores mínimos y máximos y de indicar cómo se distribuyeron según el tiempo de isquemia.

Las variables cuantitativas analizadas en los animales estudiados fueron: la creatinina, el TGF-beta1, el 18S, el flujo arterial, las sustancias vasoactivas, la ET-1, el TXA<sub>2</sub>, la PGI<sub>2</sub>, el NO, la carga energética, el ATP, ADP, y AMP. Los cuarenta casos estudiados resultaron válidos para el análisis estadístico, pero se descartaron los casos no viables para el análisis conjunto de todos los datos.

### **Distribución normal de las variables cuantitativas estudiadas**

Para comprobar que los marcadores (variables) seguían una distribución normal, se aplicó la prueba de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*, de la que se pudo concluir que las variables cumplieron una distribución normal, a excepción del ADP, del NO y de la PGI<sub>2</sub>.

Para normalizar los datos que no describieron una distribución normal, que fueron el ADP, el NO y la PGI<sub>2</sub>, se aplicó la función logaritmo neperiano (LN). Acto seguido, se aplicó una nueva prueba de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*, de la que se pudo concluir que las variables, una vez tratadas con el LN, cumplieron una distribución normal. Así, se pudo aplicar a todas las variables las pruebas preceptivas.

### **Descriptivo de las variables según el tiempo de isquemia**

Una vez tratadas las variables o marcadores, se distribuyeron según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva de 30, 45, 90 minutos (tablas 15, 16, 17 y 18 respectivamente).



**Tabla 15** – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 00

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Flujo basal arterial	10	70.00	170.00	97.5000	30.8374
Flujo arterial medio	10	43.00	141.33	92.3000	29.5653
Flujo venoso medio	10	43.33	200.00	116.1000	41.9994
Creatinina Basal	10	1.10	2.10	1.5800	.3425
Creatinina IC	10	.70	1.70	1.3100	.2923
Creat. IF	10	1.40	1.90	1.6800	.1751
Creat. 1º Día	10	1.50	2.90	2.5100	.4533
Creat. 3º Día	10	1.70	10.20	4.6200	3.5894
Creat. 5º Día	10	2.00	12.50	5.3400	4.2592
Carga Energética basal	10	.20	.38	.2739	5.891E-02
ATP Basal	10	.08	.24	.1420	5.525E-02
ADP Basal	10	.08	.24	.1798	5.777E-02
AMP Basal	10	.32	.63	.5135	9.462E-02
Carga Energética IC	0				
ATP IC	0				
ADP IC	0				
AMP IC	0				
Carga Energética IF	10	.10	.30	.2015	8.390E-02
ATP IF	10	.02	.18	9.490E-02	6.376E-02
ADP IF	10	.02	.11	6.350E-02	3.015E-02
AMP IF	10	.37	.75	.4830	.1086
Carga Energética I/R	10	.10	.44	.2968	.1101
ATP I/R	10	.04	.27	.1560	7.803E-02
ADP I/R	10	.10	.25	.1716	4.554E-02
AMP I/R	10	.37	.76	.4855	.1214
Carga Energética 5º Día	10	.21	.53	.3544	.1115
ATP 5º Día	10	.10	.36	.2076	9.054E-02
ADP 5º Día	10	.10	.30	.2203	6.525E-02
AMP 5º Día	10	.30	.59	.4569	.1056
N válido (según lista)	0				

a. Tiempo de isquemia = 0

Las variables tomadas en la fase IC no existieron en el grupo sin isquemia.

**Tabla 15** – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 00

<b>Estadísticos descriptivos<sup>a</sup></b>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
ET-1 Basal	10	3.20	9.20	4.8700	1.6991
NOX Basal	10	22.80	201.00	84.0700	54.5290
TBX2 Basal	10	47.00	1210.00	429.3000	323.6902
Prostaciclina Basal	10	30.00	360.00	225.0000	121.4651
ET-1 IC	0				
NOX IC	0				
TBX2 IC	0				
Prostaciclina IC	0				
Endotelina-1 IF	10	3.99	8.60	5.4190	1.4939
Nitritos/nitratos IF	10	47.00	569.00	118.8100	158.9541
Tromboxano IF	10	109.00	4955.00	1008.0000	1455.3007
Prostaciclina IF	10	59.00	238.00	189.9000	50.5886
ET-1 I/R	10	4.30	11.60	7.3600	2.0277
NOX I/R	10	42.00	561.00	121.0900	156.1400
TBX2 I/R	10	109.00	1824.00	604.7000	594.7042
Prostaciclina I/R	10	62.00	1261.00	442.1000	375.2802
ET-1 5º Día	10	3.30	10.30	6.5600	2.2979
NOX 5º Día	10	48.70	205.00	114.8700	55.7978
TBX2 5º Día	10	109.00	1488.00	858.1000	544.1073
Prostaciclina 5ºDía	10	47.00	1828.00	344.5000	523.6246
Mol. del TGF Basal	10	774.00	6545.00	3366.7000	1882.6932
Mol. del 18S Basal	10	.81	1.52	1.0350	.2104
Mol. TGF IC	0				
Mol. 18S IC	0				
Mol. TGF IF	10	1227.00	22180.00	9002.5000	6916.3128
Mol. 18S IF	10	.89	1.44	1.1710	.1959
Mol. TGF I/R	10	807.00	18922.00	5908.0000	5043.8442
Mol. 18S I/R	10	.81	1.43	1.0480	.2083
Mol. TGF 5º Día	10	2944.00	117211.00	54553.2000	39667.2243
Mol. 18S 5º Día	10	.71	1.55	1.1170	.2912
N válido (según lista)	0				

<sup>a</sup>. Tiempo de isquemia = 0

Las variables tomadas en la fase IC no existieron en el grupo sin isquemia.

**Tabla 16 –** Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 30

<b>Estadísticos descriptivos<sup>a</sup></b>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Flujo basal arterial	9	60.00	230.00	105.3333	52.1632
Flujo arterial medio	10	37.00	120.67	70.4333	22.7108
Flujo venoso medio	10	25.67	84.00	48.1667	16.9380
Creatinina Basal	10	1.20	2.20	1.5000	.2828
Creatinina IC	10	1.00	1.70	1.4000	.2357
Creat. IF	10	1.30	2.40	1.7100	.3178
Creat. 1º Día	10	2.40	5.80	4.6500	.9253
Creat. 3º Día	10	2.70	12.10	7.9200	3.0742
Creat. 5º Día	9	2.40	15.30	7.5000	4.5673
Carga Energética basal	10	.13	.36	.2746	7.107E-02
ATP Basal	10	.09	.22	.1566	4.023E-02
ADP Basal	10	.06	.25	.1794	5.280E-02
AMP Basal	10	.41	.76	.5678	.1097
Carga Energética IC	10	.125900	.384100	.19211000	7.2676031E-02
ATP IC	10	.050	.206	9.4800E-02	4.2697E-02
ADP IC	10	.046	.096	7.1100E-02	1.6292E-02
AMP IC	10	.355	.637	.52460	9.2170E-02
Carga Energética IF	10	.10	.31	.1943	6.319E-02
ATP IF	10	.02	.16	8.580E-02	4.611E-02
ADP IF	10	.05	.19	9.230E-02	5.434E-02
AMP IF	10	.34	.58	.4581	6.317E-02
Carga Energética I/R	10	.18	.39	.2725	5.277E-02
ATP I/R	10	.07	.16	.1346	2.845E-02
ADP I/R	10	.11	.50	.2141	.1168
AMP I/R	10	.32	.63	.5420	8.721E-02
Carga Energética 5º Día	9	.25	.57	.4212	.1027
ATP 5º Día	9	.14	.36	.2524	7.635E-02
ADP 5º Día	9	.13	.25	.2011	3.236E-02
AMP 5º Día	9	.23	.55	.4054	.1077
N válido (según lista)	9				

a. Tiempo de isquemia = 30

Tabla 16 – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 30

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
ET-1 Basal	10	2.75	15.20	6.6150	3.3490
NOX Basal	10	24.00	99.00	66.2600	22.7491
TBX2 Basal	10	204.00	719.00	514.2000	160.8718
Prostaciclina Basal	10	101.00	1841.00	827.6000	630.8603
ET-1 IC	10	6.60	14.20	9.3500	2.5514
NOX IC	10	26.00	95.00	53.4500	20.3537
TBX2 IC	10	446	1204	696.20	256.07
Prostaciclina IC	10	235	1821	1284.40	562.04
Endotelina-1 IF	10	3.70	9.60	5.9500	2.0051
Nitritos/nitratos IF	10	37.60	344.00	101.1020	88.8380
Tromboxano IF	10	82.60	1172.00	533.2600	320.5125
Prostaciclina IF	10	127.00	428.00	280.2000	91.5032
ET-1 I/R	10	4.10	11.75	7.5350	2.4120
NOX I/R	10	44.00	221.00	81.0200	52.1025
TBX2 I/R	10	257.00	810.00	480.2000	175.1715
Prostaciclina I/R	10	278.00	404.00	334.3000	39.4688
ET-1 5º Día	9	4.30	10.50	6.7778	1.8185
NOX 5º Día	9	34.00	626.00	179.0556	213.7083
TBX2 5º Día	9	187.00	710.00	493.5556	182.6541
Prostaciclina 5ºDía	9	115.00	1280.00	481.4444	390.9697
Mol. del TGF Basal	9	1073.00	27350.00	7172.1111	8860.7516
Mol. del 18S Basal	9	1.02	1.36	1.2233	9.772E-02
Mol. TGF IC	5	391	9571	3327.20	3962.25
Mol. 18S IC	5	1.090	1.320	1.16400	9.1815E-02
Mol. TGF IF	5	1273.00	7310.00	3580.4000	2846.2835
Mol. 18S IF	5	1.02	1.22	1.1420	7.823E-02
Mol. TGF I/R	5	457.00	3881.00	2175.2000	1210.6668
Mol. 18S I/R	5	1.22	1.26	1.2400	1.414E-02
Mol. TGF 5º Día	9	2443.00	143208.00	30857.8889	44050.0991
Mol. 18S 5º Día	9	1.06	1.29	1.1944	6.579E-02
N válido (según lista)	5				

<sup>a</sup>. Tiempo de isquemia = 30

Tabla 17 – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 45

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Flujo basal arterial	10	50.00	244.00	119.2000	61.8238
Flujo arterial medio	10	34.67	93.33	64.7000	19.7005
Flujo venoso medio	10	31.33	89.33	56.4333	19.8892
Creatinina Basal	10	1.20	1.90	1.5400	.2413
Creatinina IC	10	.90	1.70	1.3400	.2797
Creat. IF	10	1.10	2.10	1.5800	.3190
Creat. 1º Día	9	3.90	6.10	4.8111	.9117
Creat. 3º Día	10	4.70	12.70	8.9800	2.9683
Creat. 5º Día	10	3.80	16.50	10.7300	4.9786
Carga Energética basal	10	.23	.68	.3658	.1233
ATP Basal	10	.11	.50	.2091	.1128
ADP Basal	10	.16	.32	.2329	5.452E-02
AMP Basal	10	.16	.57	.4425	.1229
Carga Energética IC	10	.109900	.501400	.24685000	.10656338
ATP IC	10	.025	.278	8.3900E-02	7.2018E-02
ADP IC	10	.049	.340	.11620	8.7738E-02
AMP IC	10	.276	.505	.36670	6.6593E-02
Carga Energética IF	10	.11	.26	.1811	4.301E-02
ATP IF	10	.02	.09	4.880E-02	2.432E-02
ADP IF	10	.05	.14	8.160E-02	3.115E-02
AMP IF	10	.29	.44	.3646	4.686E-02
Carga Energética I/R	10	.27	.39	.3275	3.735E-02
ATP I/R	10	.12	.26	.1877	4.572E-02
ADP I/R	10	.15	.30	.2135	4.787E-02
AMP I/R	10	.44	.60	.4969	4.618E-02
Carga Energética 5º Día	10	.14	.77	.4770	.1809
ATP 5º Día	10	.02	.60	.2661	.1853
ADP 5º Día	10	.08	.36	.2527	9.025E-02
AMP 5º Día	10	.08	.43	.2686	.1416
N válido (según lista)	9				

a. Tiempo de isquemia = 45

Tabla 17 – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 45

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
ET-1 Basal	10	3.90	17.80	7.9600	3.7863
NOX Basal	10	37.00	466.00	191.8200	148.3360
TBX2 Basal	10	36.00	763.00	365.3000	269.5824
Prostaciclina Basal	10	23.00	1390.00	434.2000	471.7054
ET-1 IC	10	5.00	27.00	15.0100	6.3844
NOX IC	10	17.00	266.00	132.5400	94.8486
TBX2 IC	10	83	1521	642.20	581.64
Prostaciclina IC	10	84	2079	792.10	715.28
Endotelina-1 IF	10	4.00	24.50	7.5900	6.0521
Nitritos/nitratos IF	10	50.00	396.00	120.3600	113.0310
Tromboxano IF	10	34.00	2333.00	573.3000	703.7763
Prostaciclina IF	10	21.00	569.00	203.0000	184.2179
ET-1 I/R	10	4.90	22.40	9.6300	4.8309
NOX I/R	10	39.00	356.00	114.4500	100.6000
TBX2 I/R	10	45.00	1876.00	493.2000	553.4748
Prostaciclina I/R	10	24.00	678.00	265.8000	237.7537
ET-1 5º Día	10	4.40	17.30	8.8300	4.1732
NOX 5º Día	10	46.00	848.00	268.7000	266.1666
TBX2 5º Día	10	64.00	2370.00	598.6000	697.8103
Prostaciclina 5ºDía	10	30.00	870.00	284.5000	282.0915
Mol. del TGF Basal	8	487.00	13488.00	6503.8750	4411.3783
Mol. del 18S Basal	8	.84	1.36	1.1550	.1592
Mol. TGF IC	5	439	10255	5071.00	4619.46
Mol. 18S IC	5	.880	1.230	1.14200	.14822
Mol. TGF IF	5	680.00	3881.00	2251.4000	1423.4252
Mol. 18S IF	5	.93	1.30	1.0960	.1514
Mol. TGF I/R	5	215.00	15594.00	5250.4000	6401.5113
Mol. 18S I/R	5	1.03	1.28	1.1580	9.602E-02
Mol. TGF 5º Día	8	5469.00	183641.00	44257.3750	60022.2070
Mol. 18S 5º Día	8	.94	1.38	1.1225	.1243
N válido (según lista)	5				

<sup>a</sup>. Tiempo de isquemia = 45

Tabla 18 – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 90

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Flujo basal arterial	10	50.00	194.00	103.1000	46.1482
Flujo arterial medio	10	19.00	104.33	51.2667	30.9806
Flujo venoso medio	10	17.33	108.67	43.7333	31.7835
Creatinina Basal	10	1.00	1.90	1.3100	.2644
Creatinina IC	10	1.10	1.50	1.2400	.1174
Creat. IF	10	1.20	1.80	1.5200	.1687
Creat. 1º Día	10	4.50	7.20	5.5600	.7806
Creat. 3º Día	7	6.60	15.80	11.9143	3.0922
Creat. 5º Día	6	4.20	17.50	12.5667	4.6059
Carga Energética basal	10	.22	.50	.3384	8.918E-02
ATP Basal	10	.11	.28	.1873	5.565E-02
ADP Basal	10	.16	.25	.2075	3.098E-02
AMP Basal	10	.21	.59	.4783	.1205
Carga Energética IC	10	.177000	.273900	.23224000	3.6007043E-02
ATP IC	10	.034	.067	4.4300E-02	1.0822E-02
ADP IC	10	.040	.189	7.0000E-02	4.3387E-02
AMP IC	10	.147	.295	.23030	4.8806E-02
Carga Energética IF	10	.12	.26	.1665	4.095E-02
ATP IF	10	.02	.07	3.080E-02	1.842E-02
ADP IF	10	.05	.09	6.780E-02	1.241E-02
AMP IF	10	.23	.37	.2851	3.899E-02
Carga Energética I/R	10	.26	.40	.3288	3.500E-02
ATP I/R	10	.12	.26	.1768	3.784E-02
ADP I/R	10	.12	.22	.1924	2.978E-02
AMP I/R	10	.37	.54	.4627	5.985E-02
Carga Energética 5º Día	6	.28	.80	.5558	.1811
ATP 5º Día	6	.10	.65	.3734	.1890
ADP 5º Día	6	.15	.28	.2391	4.573E-02
AMP 5º Día	6	.02	.35	.1920	.1236
N válido (según lista)	6				

<sup>a</sup>. Tiempo de isquemia = 90

Tabla 18 – Descriptivo de las variables con tiempo de isquemia = 90

Estadísticos descriptivos <sup>a</sup>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
ET-1 Basal	10	4.20	8.40	6.4400	1.6794
NOX Basal	10	22.00	211.00	102.0500	63.3212
TBX2 Basal	10	56.00	1111.00	485.8000	303.3208
Prostaciclina Basal	10	35.00	2015.00	648.2000	659.3134
ET-1 IC	10	4.90	17.20	11.9100	3.8243
NOX IC	10	29.00	126.00	74.2800	35.7713
TBX2 IC	10	58	1662	844.90	481.23
Prostaciclina IC	10	61	3280	1639.50	968.22
Endotelina-1 IF	10	3.40	10.50	5.7900	2.1320
Nitritos/nitratos IF	10	31.00	622.00	203.1300	178.7940
Tromboxano IF	10	23.00	2467.00	610.8000	692.4460
Prostaciclina IF	10	19.00	634.00	248.1000	163.5940
ET-1 I/R	10	4.80	13.30	8.9800	2.9510
NOX I/R	10	27.00	620.00	183.5000	177.1272
TBX2 I/R	10	14.00	2467.00	665.1000	694.3826
Prostaciclina I/R	10	6.00	685.00	371.5000	208.6407
ET-1 5º Día	6	2.90	10.30	5.5167	2.5826
NOX 5º Día	6	37.00	520.00	178.7167	174.4184
TBX2 5º Día	6	19.20	816.00	503.0333	317.6496
Prostaciclina 5ºDía	6	15.40	475.00	242.7333	149.1545
Mol. del TGF Basal	8	437.00	12501.00	6912.7500	4439.7915
Mol. del 18S Basal	8	.76	1.41	1.1450	.1954
Mol. TGF IC	5	206	9527	4062.60	3552.77
Mol. 18S IC	5	.800	1.090	.99600	.11524
Mol. TGF IF	5	222.00	8034.00	3473.6000	3031.2079
Mol. 18S IF	5	1.10	1.37	1.2260	.1048
Mol. TGF I/R	5	1315.00	12941.00	5376.4000	4636.4251
Mol. 18S I/R	5	.93	1.22	1.0340	.1137
Mol. TGF 5º Día	8	2870.00	118296.00	41735.8750	44222.9237
Mol. 18S 5º Día	8	.55	1.41	1.0863	.2794
N válido (según lista)	5				

<sup>a</sup>. Tiempo de isquemia = 90



## 1. RESULTADOS ANALÍTICOS

### VARIABLES CUANTITATIVAS

Para estudiar analíticamente las variables cuantitativas, primero se contrastó la homogeneidad de los parámetros basales, ya que así se comprobó que las posibles variaciones que se encontraron se debieron a las condiciones del experimento y no a que antes ya fueran diferentes (tabla 19). Se comprobó que las variables no presentaban diferencias *a priori*, por lo tanto las condiciones de inicio del experimento eran iguales para todas las variables estudiadas, aunque el modelo lineal general ya lo contempla.

**Tabla 19** – Comprobación de la homogeneidad de los parámetros basales según la isquemia

ANOVA	
	Sig.
Flujo basal arterial	.786
Creatinina Basal	.173
Carga Energética basal	.059
ATP Basal	.168
AMP Basal	.099
ET-1 Basal	.124
TBX2 Basal	.628
LNNOXB	.090
LNADPB	.105
LNPCIB	.097
Mol. del TGF Basal	.409
Mol. del 18S Basal	.141

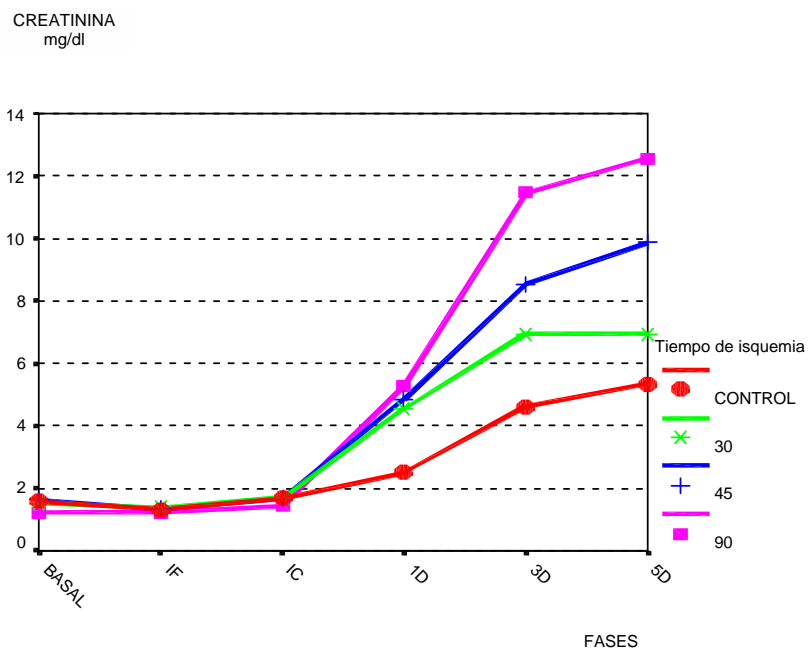
### 1.1.1. CREATININA

**La creatinina aumentó tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 1D, 3D, 5D) de manera significativa ( $p=0,001$ ), como en función del grupo ( $p=0,003$ ), para los órganos viables. Del mismo modo, también resultó significativa la interacción fase-isquemia ( $p=0,006$ ), es decir, durante el proceso las diferencias entre los grupos iban aumentando.**

En la figura 9 se puede observar la evolución de la creatinina a lo largo de las fases del estudio, para todos los grupos de isquemia, despejando su perfil de comportamiento. Así se pudo comprobar que la creatinina admite una variación a lo largo de las fases del estudio, otra según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente y, a la vez, una interacción entre las variaciones de la fase con la isquemia (figura 9).

La creatinina presentó una elevación durante el primer y tercer día y posteriormente una tendencia a la estabilización en el quinto día. Las diferencias encontradas entre los tiempos de isquemia caliente progresiva y el grupo control fueron evidentes en cuanto a los valores séricos alcanzados. Además presentó una pendiente de crecimiento menor en el grupo control, cuando se comparó con las pendientes de los grupos de isquemia.

**Figura 9** - Perfil del comportamiento de la creatinina en todas las fases según los grupos de isquemia caliente y control



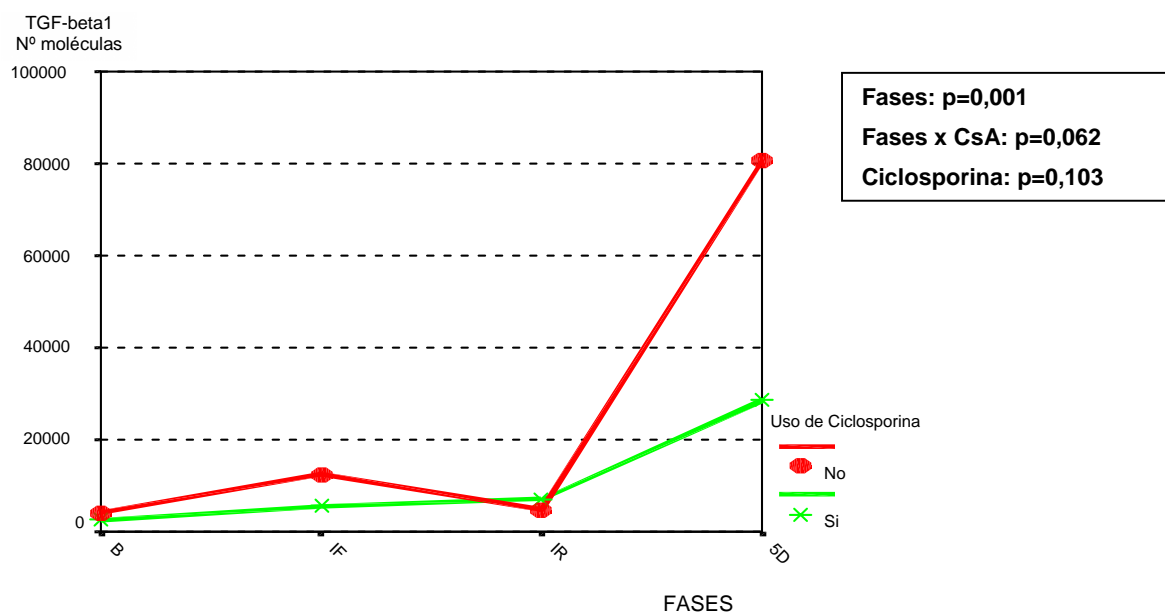
### 1.1.2. EXPRESIÓN DEL TGF-BETA1 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

#### Expresión del TGF-beta1 dentro del grupo de control según el uso de la CsA

La expresión del TGF-beta1 durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), según el uso de la CsA en el grupo control sin isquemia, para los órganos viables, resultó significativo sólo intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,001$ ); pero no como intersujetos, es decir, según los dos grupos de estudio ( $p=0,103$ ), ni hubo la interacción fase-ciclosporina ( $p=0,062$ ).

En la figura 10 se puede observar la evolución de la expresión del TGF-beta1 a lo largo de las distintas fases del estudio, según el uso de CsA o de Aza, dentro del grupo control sin isquemia. Se demostró que las variaciones en la expresión del TGF-beta1 se mantuvieron estables tras la isquemia total (IF e IF) y tras una hora postreperfusión (IR). Hubo un aumento estadísticamente significativo al quinto día, pero sin que produjera diferencias entre el uso o no de CsA. Así se comprobó que la utilización de CsA comparada con Aza no determinó diferencias, de manera que se pudo afirmar que las dos ramas del grupo control no son diferentes y, por lo tanto, les analizaremos como un único grupo.

**Figura 10** - Perfil del comportamiento de la expresión del TGF-beta1 en las fases según el uso de la ciclosporina para el grupo control

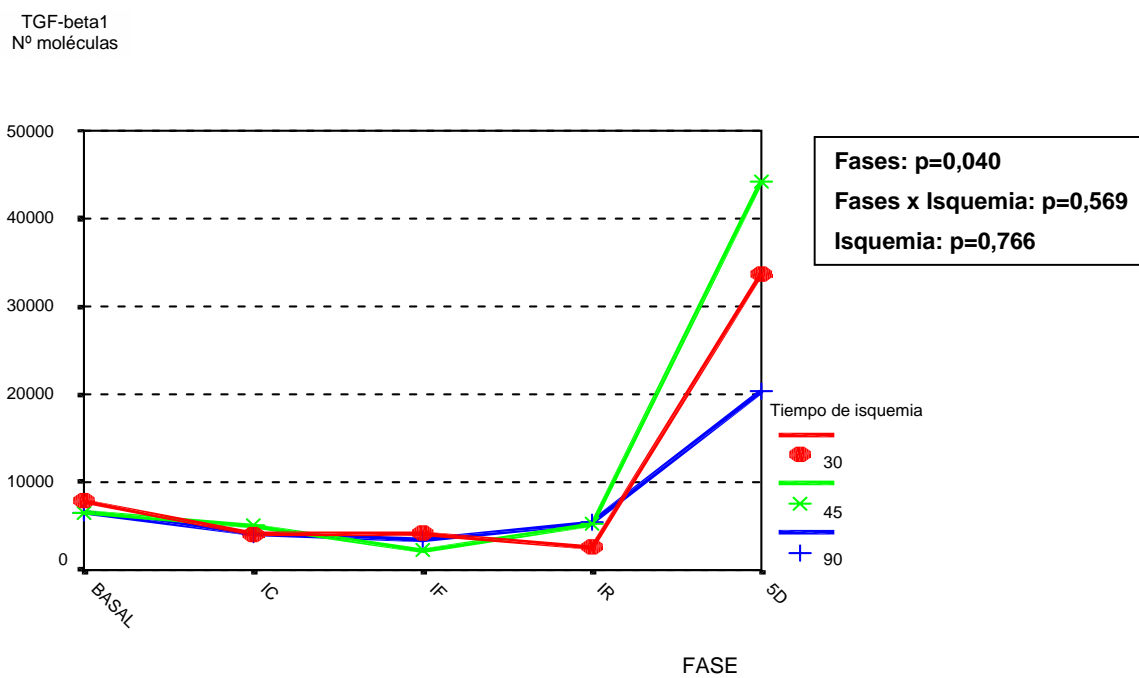


### **Expresión del TGF-beta1 exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión del TGF-beta1 durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, resultó significativa sólo intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,040$ ), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia ( $p=0,766$ ); tampoco hubo interacción fase-isquemia, ya que durante el proceso no se demostró interacciones entre los grupos ( $p=0,569$ ).**

En la figura 11 se puede observar la evolución de la expresión del TGF-beta1 a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la expresión del TGF-beta1 se mantuvieron estables tras la isquemia caliente (IC), isquemia fría (IF) e isquemia-reperfusión (IR), sólo aumentando significativamente en el quinto día, sin que hubiera diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de isquemia progresiva estudiados. De esta manera, no se pudo afirmar que el tiempo de isquemia interfiera en la expresión del TGF-beta1, pero sí en la mayor cantidad de TGF-beta1 expresada al quinto día.

**Figura 11** - Perfil del comportamiento de la expresión del TGF-beta1 en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva



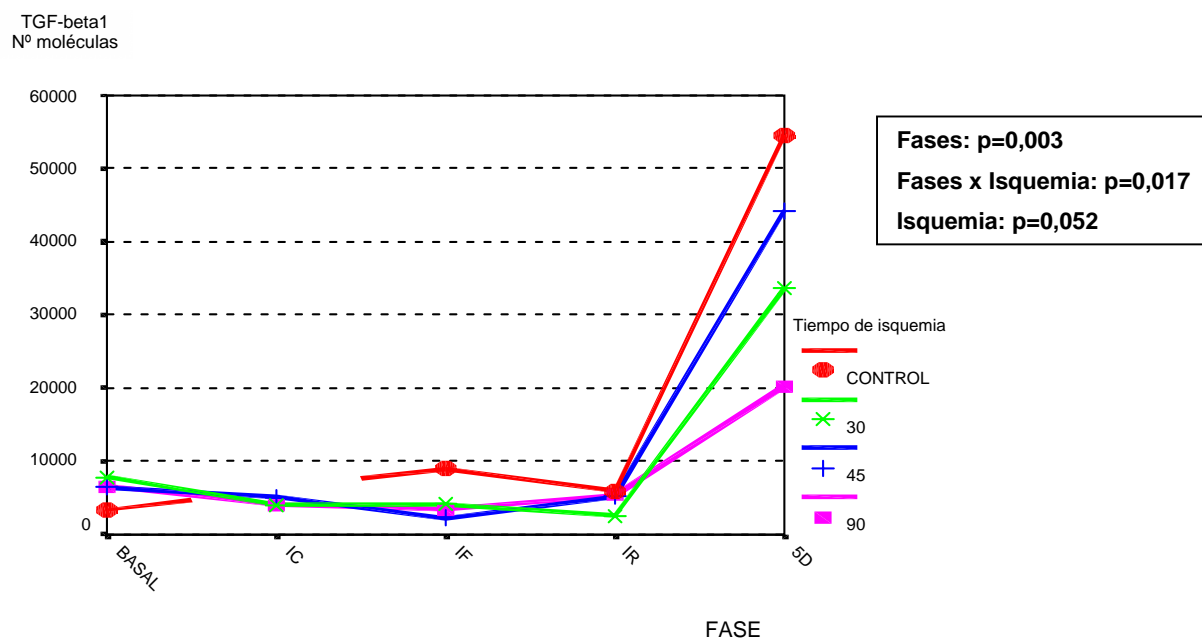
### **Expresión del TGF-beta1 en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión del TGF-beta1 durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,003$ ), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia ( $p=0,052$ ); sin embargo, se demostró una interacción fase-isquemia, ya que durante el proceso se demostró interacciones entre los grupos ( $p=0,017$ ).**

En la figura 12 se puede observar la evolución de la expresión del TGF-beta1 a lo largo de las fases del estudio según el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la expresión del TGF-beta1 se mantuvieron estables tras la isquemia caliente (IC), isquemia fría (IF) e isquemia-reperfusión (IR), sólo aumentando significativamente en el quinto día, sin que hubiera diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de isquemia progresiva estudiados. Hubo una mayor expresión del TGF-beta1 al quinto día en los cuatro grupos en general. Este hecho demostró que la sobreexpresión del TGF-beta1 está asociada con las fases del estudio **(B, IF, IR, 5D)**, y que las fases de isquemia caliente progresiva no redundaron en una expresión diferente (mayor o menor) de la citoquina.



**Figura 12** - Perfil del comportamiento de la expresión del TGF-beta1 en las fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva

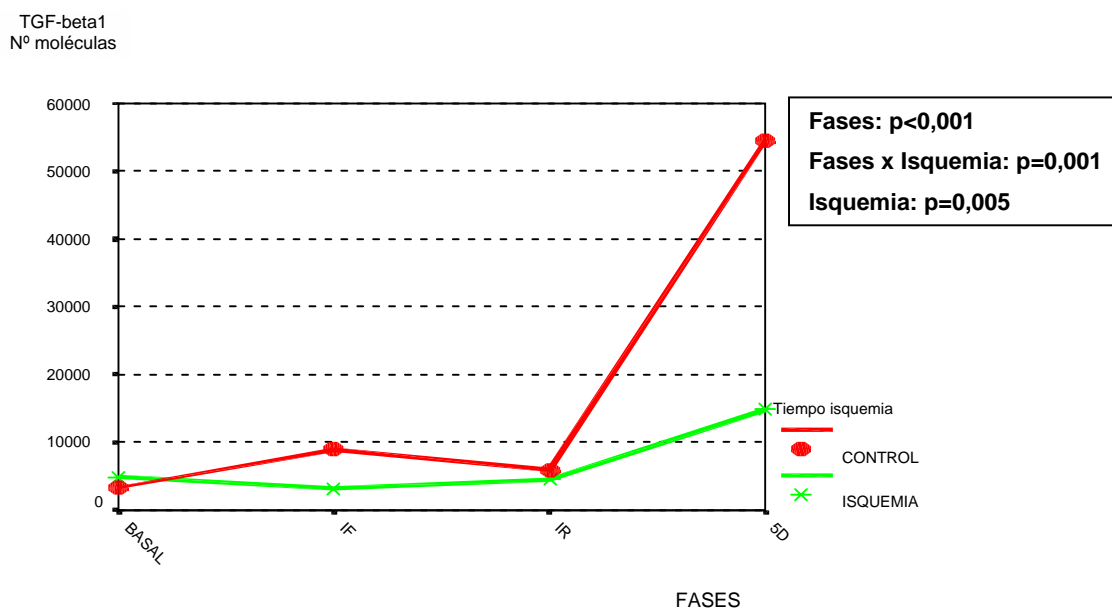


### **Expresión del TGF-beta1 en el grupo de control y en la media de los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión del TGF-beta1** durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), **en el grupo control y en la media de los grupos de isquemia caliente progresiva**, para los órganos viables, **resultó significativa** intrasujetos, o sea, **a lo largo de las fases del estudio** ( $p < 0,001$ ), también como intersujetos, es decir, **según los grupos de isquemia** ( $p = 0,005$ ); **además**, se logró demostrar una interacción fase-isquemia, ya que **durante el proceso se demostró interacciones entre los grupos** ( $p = 0,001$ ).

En la figura 13 se puede observar la evolución de la expresión del TGF-beta1 a lo largo de las fases del estudio según el grupo control y en la media de los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que las variaciones en la expresión del TGF-beta1 presentaban diferencias significativas al quinto día y que esta sobreexpresión al quinto día era estadísticamente mayor en la media de los grupos con tiempo de isquemia progresiva (30,45,90 min). Pero siguieron inalteradas las diferencias en las fases de isquemia fría (IF) e isquemia-reperusión (IR). Así, **la isquemia caliente progresiva redundó en una mayor expresión de la citoquina respecto a los riñones sin isquemia, sólo cuando fue analizada en conjunto.**

**Figura 13** - Perfil del comportamiento de la expresión del TGF-beta1 en las fases del estudio según el grupo de control y en la media de los grupos de isquemia caliente progresiva

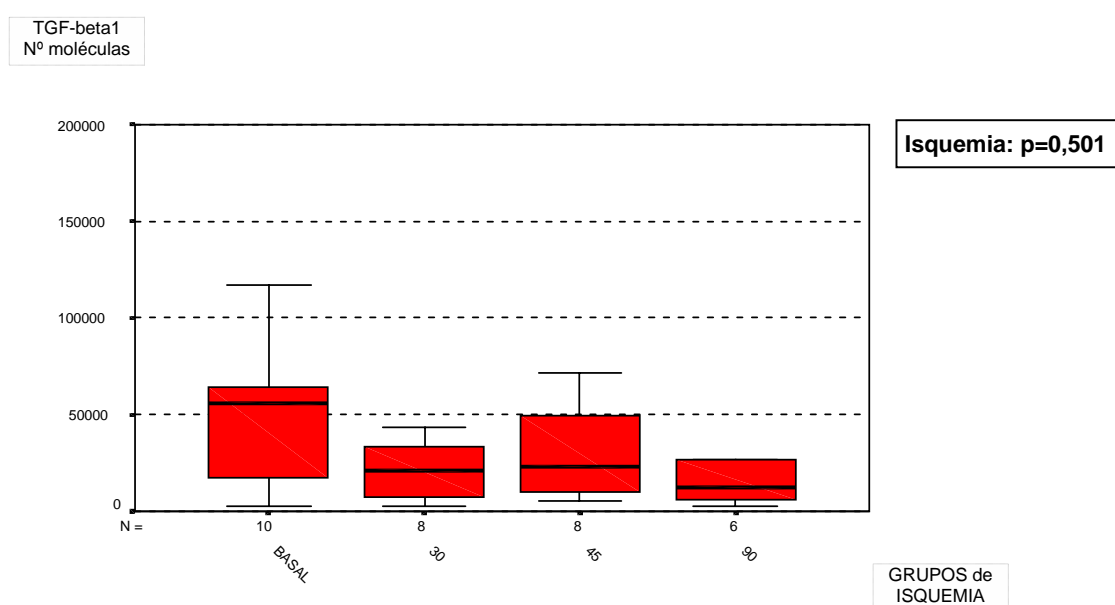


### 1.1.3. Expresión media al quinto día del TGF-beta1 en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva

La expresión media al quinto día del TGF-beta1 en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **no resultó significativa**.

Así se demostró en la figura 14 que las variaciones en la expresión **media del TGF-beta1 al quinto día en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva no determinó diferencias estadísticamente significativas, de manera que se pudo afirmar que dichas expresiones no son distintas**. En todos los grupos se demostró un aumento de expresión del TGF-beta1 al quinto día, que fue independiente de si los riñones habían sufrido o no isquemia caliente.

**Figura 14** - Perfil del comportamiento de la expresión media al quinto día del TGF-beta1 en el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva

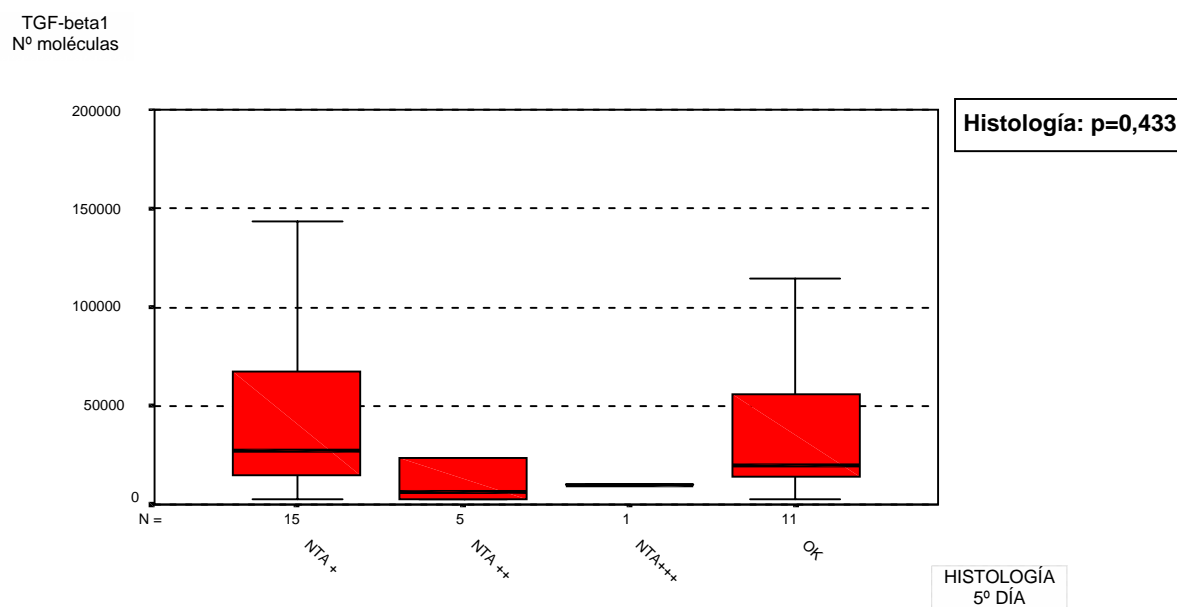


#### 1.1.4. Expresión media al quinto día del TGF-beta1 según la histología

La expresión media al quinto día del TGF-beta1 según la histología al quinto día, para los órganos viables, no resultó significativa. En la figura 15 se puede observar que las variaciones en la expresión **media al quinto día del TGF-beta1 según la histología** al quinto día no determinó diferencias estadísticamente diferentes, de manera que se pudo afirmar que dichas expresiones no son distintas **según la histología demostrada al quinto día**.

La evolución de la expresión media al quinto día del TGF-beta1 según la histología no tuvo ninguna relación con los hallazgos histológicos (Normal, NTA+, NTA++, NTA+++) al quinto día. O sea, los riñones con NTA no expresaban niveles de TGF-beta1 diferentes a los riñones normales.

**Figura 15** - Perfil del comportamiento de la expresión media al quinto día del TGF-beta1 según las alteraciones histológicas



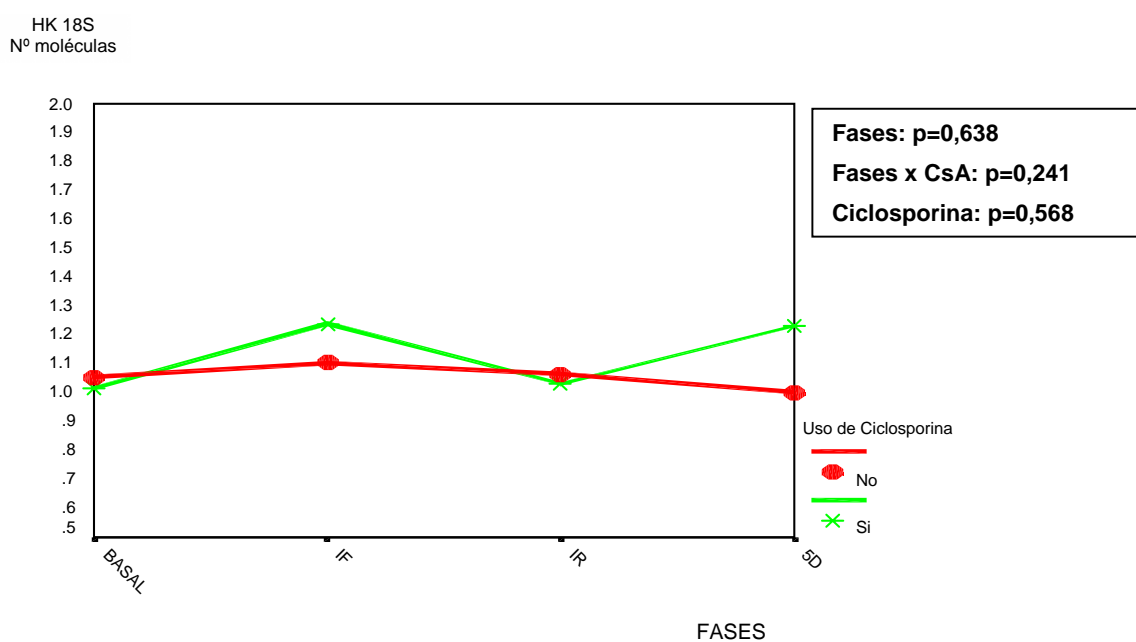
### 1.1.5. Expresión del 18S

#### Expresión del 18S dentro del grupo de control según el uso de la CsA

La expresión del 18S durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), según el uso de la CsA en el grupo de control sin isquemia, para los órganos viables, **no resultó significativa intrasujeto(s), o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,638$ ), ni como intersujeto(s), es decir, según los grupos de isquemia ( $p=0,568$ ); tampoco hubo interacción fase-CsA ( $p=0,241$ ).**

En la figura 16 se puede observar la evolución de la expresión del 18S a lo largo de las sucesivas fases del estudio, según el uso de la CsA o de la Aza, en el grupo de control sin isquemia caliente. Así se demostró que la expresión del 18S no presentó variaciones a lo largo del estudio relacionadas con el uso de CsA y comparado con Aza, **además de haberse comportado como un excelente control interno de la expresión del TGF-beta1 en los dos grupos control sin isquemia caliente.**

**Figura 16** - Perfil del comportamiento de la expresión del 18S en las fases del estudio según el uso de la ciclosporina, para el grupo de control

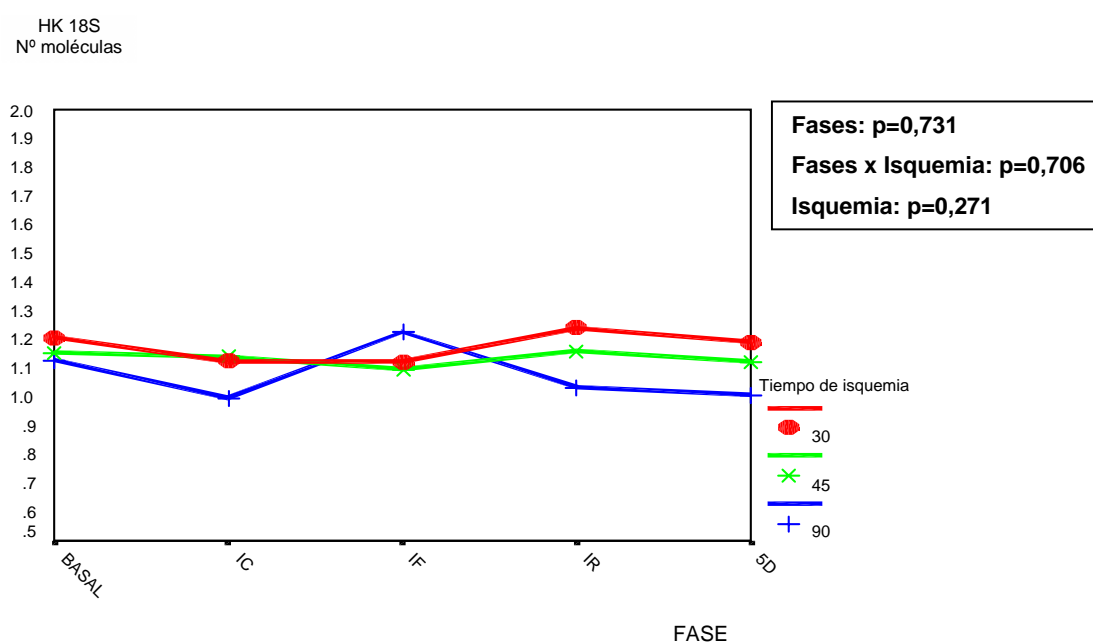


### Expresión del 18S exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva

La expresión del 18S durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **no resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,731$ ), ni como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia ( $p=0,271$ ); tampoco se dio interacción fase-isquemia ( $p=0,706$ ).**

En la figura 17 se puede observar la evolución de la expresión del 18S a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la expresión del 18S no variaron en ningún momento del experimento, tampoco admitieron variaciones entre los tiempos de isquemia progresiva, lo cual equivale a decir que se comportaron de modo absolutamente semejante.

**Figura 17** - Perfil del comportamiento de la expresión del 18S en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

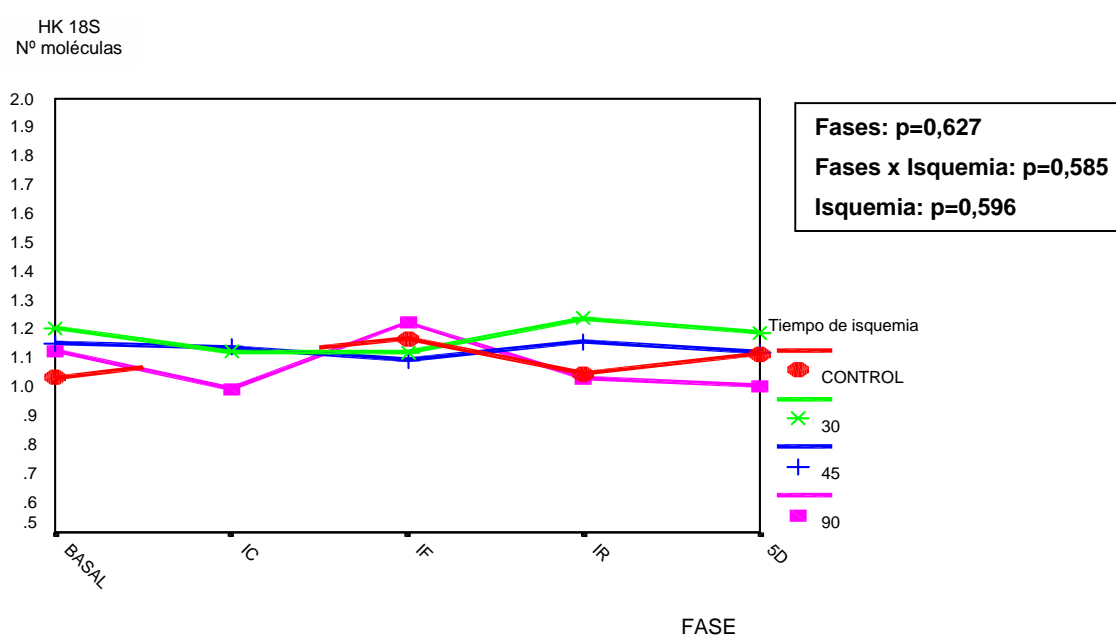


## Expresión del 18s en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva

La expresión del 18S durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, no resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,627$ ), ni como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia ( $p=0,596$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p=0,585$ ).

En la figura 18, se puede observar la evolución de la expresión del 18S a lo largo de las fases del estudio, en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la expresión del 18S no variaron en ningún momento del experimento y tampoco admitieron variaciones entre los tiempos de isquemia progresiva, equivale a decir que se comportaron de modo absolutamente semejante. La expresión del 18S se comportó como un excelente control interno de la expresión del TGF-beta1.

**Figura 18** - Perfil del comportamiento de la expresión del 18S en las fases según el grupo control y los grupos de isquemia caliente progresiva



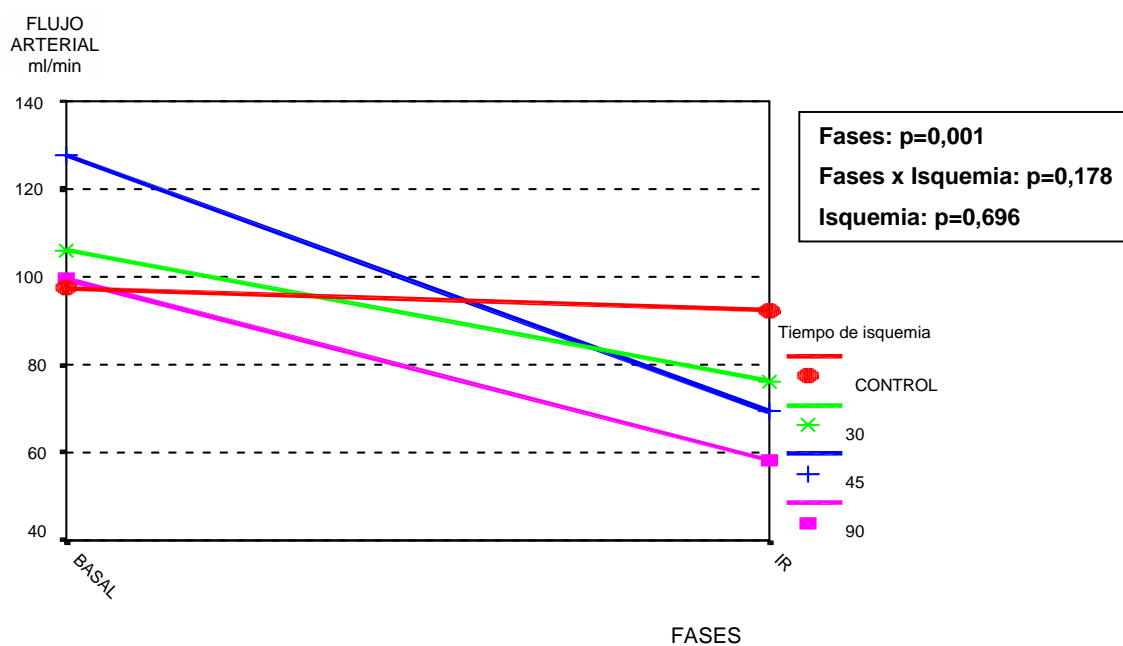


### 1.1.6. COMPORTAMIENTO DEL FLUJO ARTERIAL

En el análisis del flujo arterial, éste se tomó en la fase basal. Las medias aritméticas de los flujos arteriales tomados en los momentos inmediatamente posterior y 5 y 10 minutos después de la reperfusión del órgano se compararon con el grupo de control y con los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos **viables**. **Sólo resultaron significativas las diferencias intrasujeto(s), o sea, las diferencias halladas a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,001$ ).** No obstante, no se identificaron diferencias significativas según los tipos de isquemia ( $p=0,696$ ), **ni se dio la interacción fase-isquemia ( $p=0,178$ )** .

En la figura 19 se puede observar la evolución del flujo arterial para las dos fases estudiadas (Basal *versus* IR). Las diferencias observadas demostraron que hubo una disminución estadísticamente significativa del flujo arterial renal en todos los grupos con isquemia caliente y/o fría. Así, los riñones sometidos a un mayor tiempo de isquemia caliente no presentaron en una mayor disminución en el flujo arterial, que los riñones sin isquemia caliente.

**Figura 19** - perfil del comportamiento de las variaciones del flujo renal arterial en las dos fases estudiadas según el grupo control y los grupos de isquemia caliente progresiva



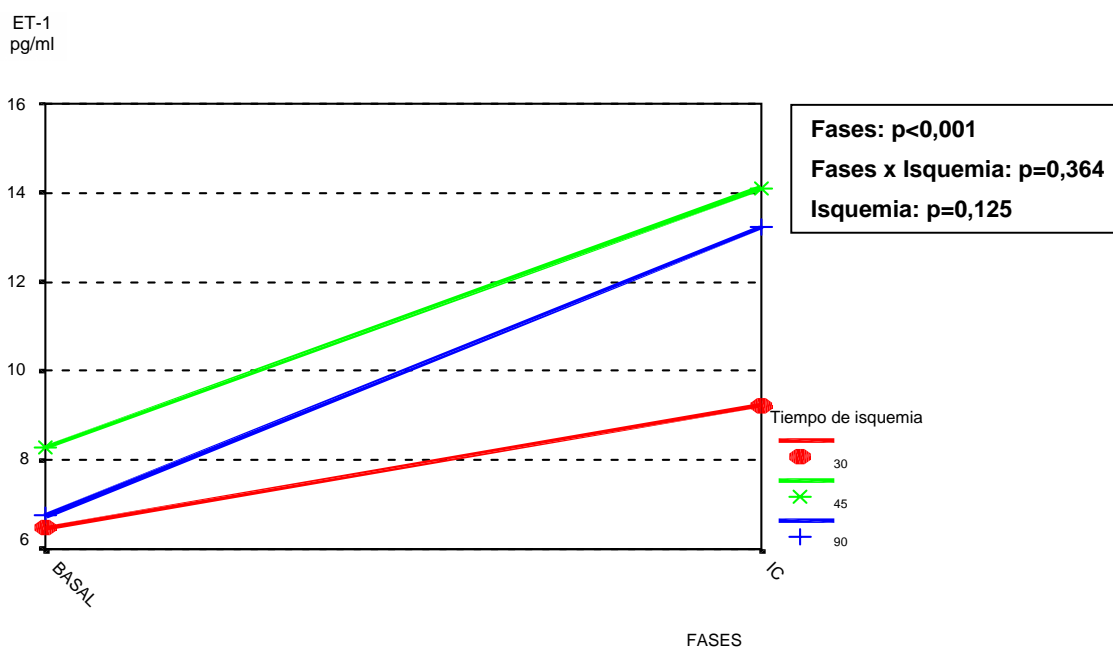
### 1.1.7. SUSTANCIAS VASOACTIVAS

#### Expresión de la ET-1 exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva

La **determinación de la ET-1** durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), **exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva**, para los órganos viables, **fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D)**. Resultó significativo el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p < 0,001$ ), exclusivamente, para los animales donantes (fases B y IC), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,125$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,364$ ). Para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), no se dio ninguna significación estadística.

En la figura 20 se puede observar una elevación de la expresión de la ET-1 entre las dos primeras fases del estudio (Basal *versus* IC), para los animales donantes, respecto a los riñones con isquemia caliente progresiva, que ocurrió en todos los órganos sometidos a los tres diferentes periodos de isquemia caliente estudiados. Así se demostró que las variaciones en la determinación de la ET-1 **sólo** estaban relacionadas con la fase IC, en los grupos de isquemia caliente del estudio.

**Figura 20** - perfil del comportamiento de la expresión de la ET-1 en las primeras dos fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

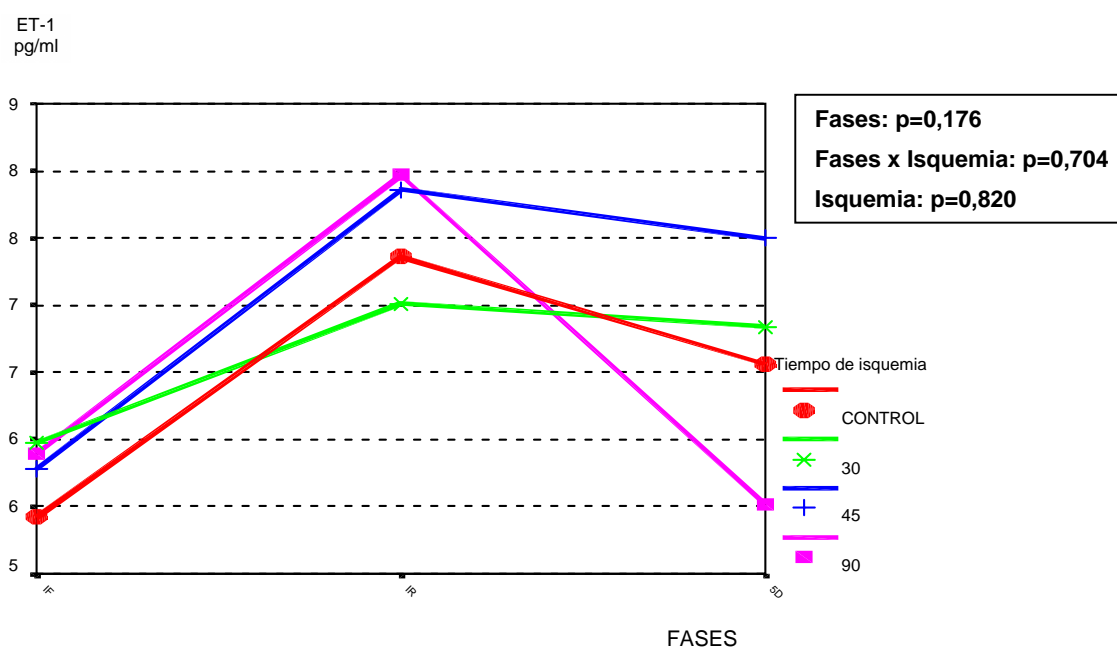


### **Expresión de la ET-1 en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión de la ET-1 durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D). ).** No resultó significativa el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,176$ ), ni para los animales donantes (fases B y IC) ni para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), tampoco ninguna otra significación estadística fue encontrada, ni como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p=0,820$ ); ni tuvo lugar la interacción fase-isquemia ( $p=0,704$ ).

En la figura 21 se puede observar la evolución de la expresión de la ET-1 a lo largo de las tres últimas fases del estudio (IF, IR, 5D), para los animales receptores, tanto en el grupo de control como en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así, para la ET-1 se confirmaron los datos ya descritos en la literatura, que reflejan su comportamiento fisiológico. No se demostró ninguna variación estadísticamente significativa entre los riñones de los animales receptores. Sin embargo, **en los animales donantes, se confirmó la relación: a mayor isquemia caliente, mayor liberación de la ET-1.**

**Figura 21** - perfil del comportamiento de la expresión de la ET-1 en las tres últimas fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva

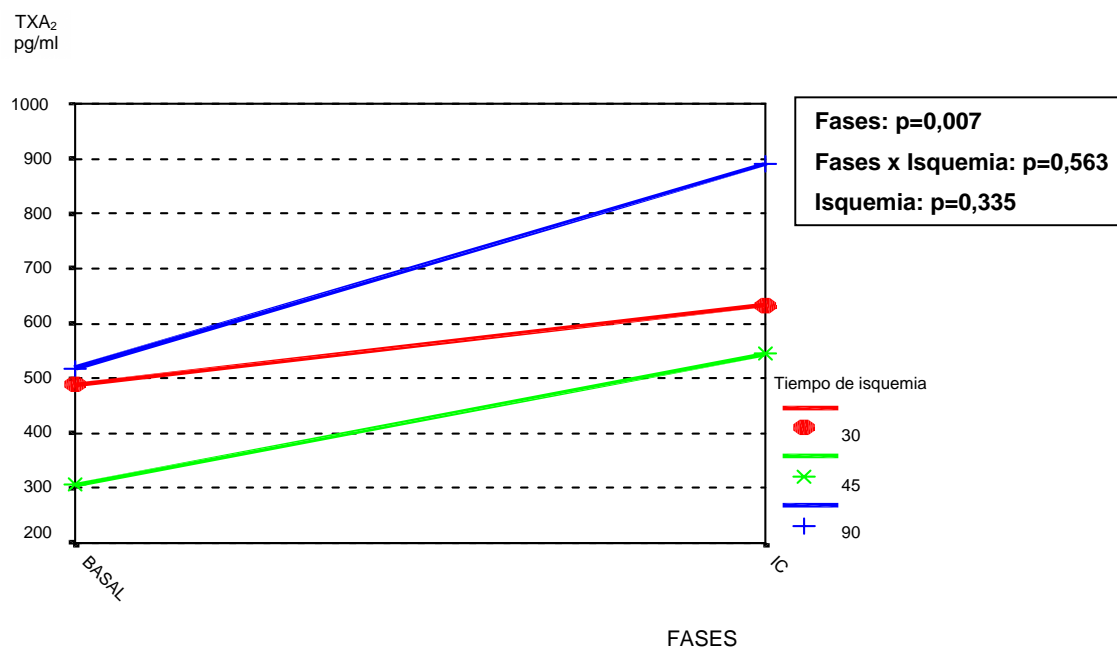


### **Expresión del TXA<sub>2</sub> exclusivamente en los grupos de isquemia caliente**

**La determinación del TXA<sub>2</sub> durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D).** Apenas resultó significativa el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,007$ ), exclusivamente, para los animales donantes (fases B y IC), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p=0,335$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p=0,563$ ). Para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), ninguna significación estadística fue encontrada.

En la figura 22, se puede observar la evolución de la expresión del TXA<sub>2</sub> a lo largo de las primeras dos fases del estudio (Basal *versus* IC), para los animales donantes, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la determinación de la ET-1 **sólo** estaban relacionadas con la fase IC en los grupos de isquemia caliente del estudio.

**Figura 22** - perfil del comportamiento de la expresión del TXA<sub>2</sub> en las primeras dos fases según los grupos de isquemia caliente progresiva



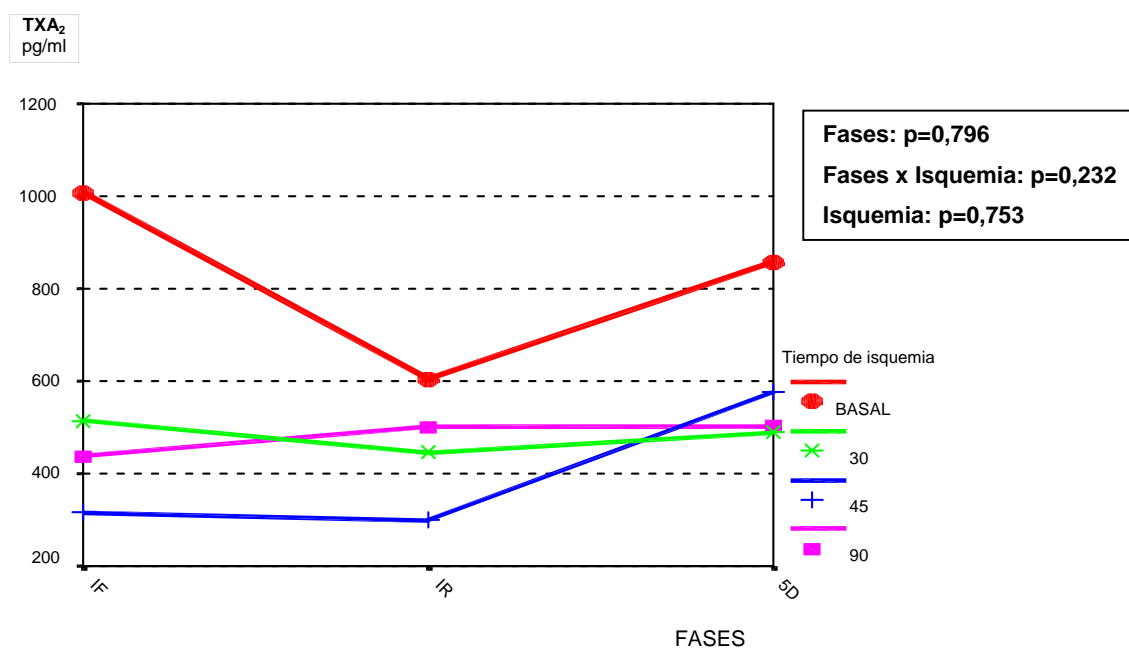
### **Expresión del TXA<sub>2</sub> en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión del TXA<sub>2</sub> durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D).** No resultó significativa el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,796$ ), ni para los animales donantes (fases B y IC) ni para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), tampoco ninguna otra significación estadística fue encontrada, ni como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p=0,335$ ); ni tuvo lugar la interacción fase-isquemia ( $p=0,563$ ).

En la figura 23 se puede observar la evolución de la expresión del TXA<sub>2</sub> a lo largo de las tres últimas fases del estudio (IF, IR, 5D), para los animales receptores, tanto en el grupo de control como en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así, para el TXA<sub>2</sub> se confirmaron los datos ya referidos en la literatura, que reflejan su comportamiento fisiológico. No se demostró ninguna variación estadísticamente significativa entre los riñones de los animales receptores. Sin embargo, **en los animales donantes, se confirmó la relación: a mayor isquemia caliente, mayor liberación del TXA<sub>2</sub>.**



**Figura 23** - perfil del comportamiento de la expresión del TXA<sub>2</sub> en las tres últimas fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva

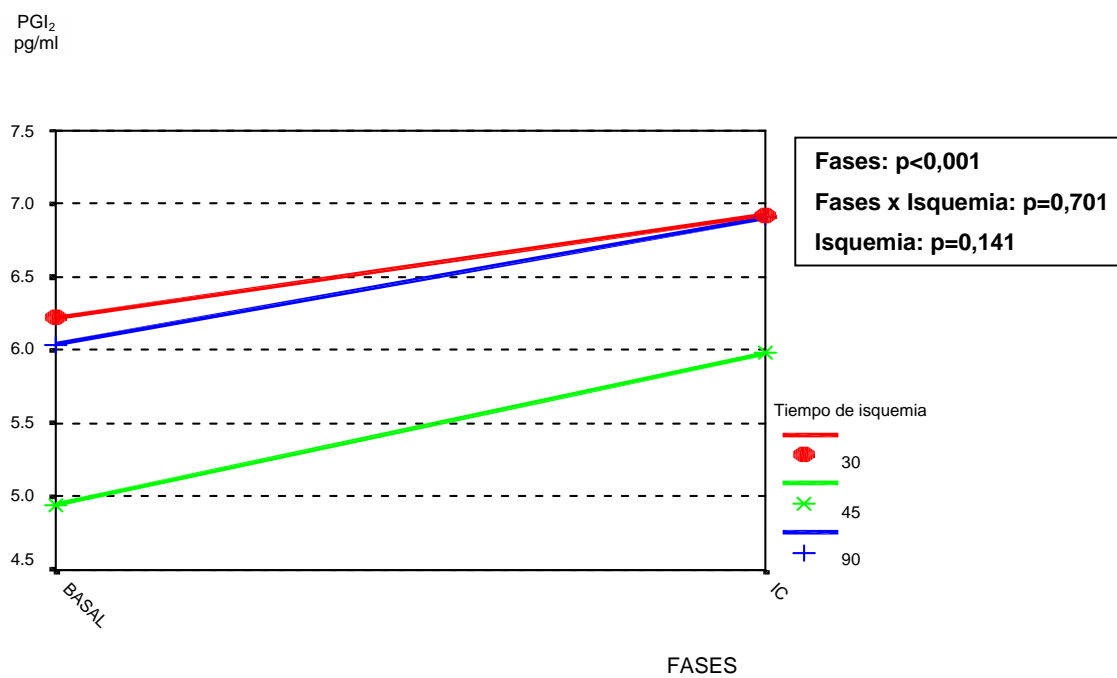


### **Expresión de la PGI<sub>2</sub> exclusivamente en los grupos de isquemia caliente**

**La determinación de la PGI<sub>2</sub> durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D).** Apenas resultó significativa el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p < 0,001$ ), exclusivamente, para los animales donantes (fases B y IC), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,141$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,701$ ). Para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), ninguna significación estadística fue encontrada.

En la figura 24 se puede observar la evolución de la expresión de la PGI<sub>2</sub> a lo largo de las dos primeras fases del estudio (Basal *versus* IC), para los animales donantes, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así se demostró que las variaciones en la determinación de la PGI<sub>2</sub> **sólo** estaban relacionadas con la fase IC en los grupos de isquemia caliente del estudio.

**Figura 24** - perfil del comportamiento de la expresión de la PGI<sub>2</sub> en las primeras dos fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

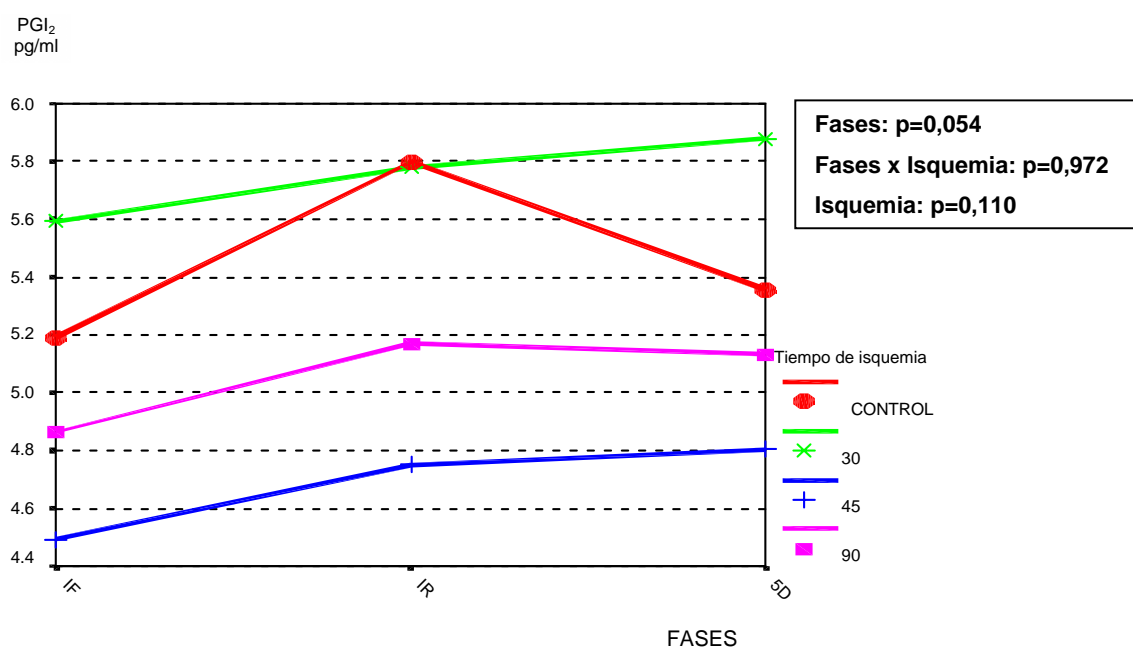


### **Expresión de la PGI<sub>2</sub> en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La expresión de la PGI<sub>2</sub> durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D).** Apenas resultó significativa el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p=0,110$ ), exclusivamente, para los animales donantes (fases B y IC), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p=0,141$ ); ni tuvo lugar la interacción fase-isquemia ( $p=0,972$ ). Para los animales receptores (fases IF, IR y 5D), ninguna significación estadística fue encontrada.

En la figura 25 se puede observar la evolución de la expresión de la PGI<sub>2</sub> a lo largo de las tres últimas fases del estudio (IF, IR, 5D), para los animales receptores, tanto en el grupo de control como en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así, en el caso de la PGI<sub>2</sub> se confirmaron los datos ya descritos en la literatura, que reflejan su comportamiento fisiológico. Por tanto, se confirmó la relación: a mayor isquemia caliente, mayor liberación de PGI<sub>2</sub>, en compensación a la liberación de la ET-1. No se demostró ninguna variación estadísticamente significativa entre los riñones de los animales receptores. En ausencia de isquemia caliente, la PGI<sub>2</sub> sigue un comportamiento plano y constante.

**Figura 25** - perfil del comportamiento de la expresión de la PGI<sub>2</sub> en las últimas tres fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva



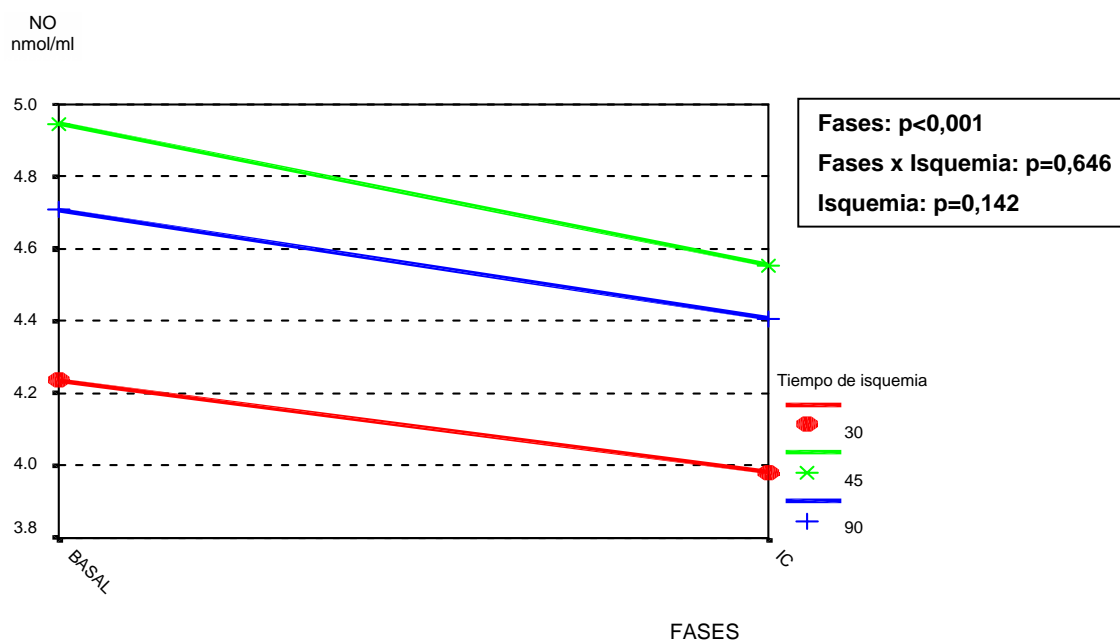
### **Expresión del NO exclusivamente en los grupos de isquemia caliente**

**La determinación del NO** durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D)**. Resultó significativa en el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p < 0,001$  y  $p = 0,033$ ), tanto para los animales donantes (fases B y IC), como para los animales receptores (fases IF, IR y 5D). Entretanto no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,142$  y  $p = 0,602$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,646$  y  $p = 0,212$ ). En las figuras 26 y 27 se puede observar la evolución de la expresión del NO a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva.

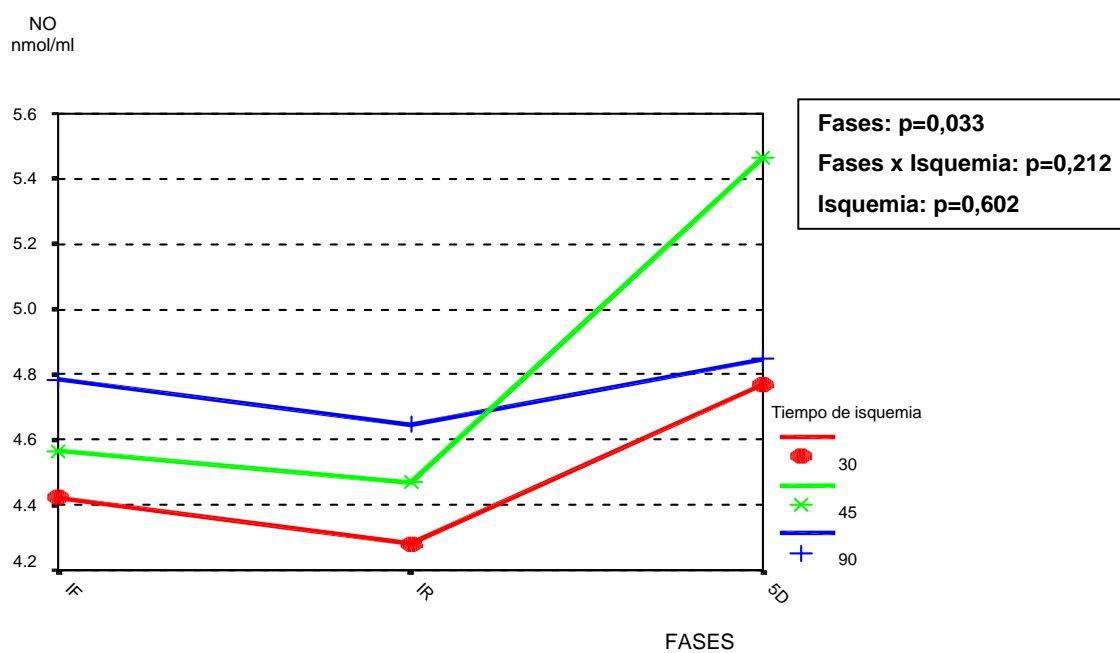
Así se demostró en los grupos de isquemia caliente que tanto en el animal donante como en el receptor, las variaciones en la determinación del óxido nítrico estaban relacionadas con las fases del estudio (Basal, IC, IF, IR, 5D). En el grupo donante la isquemia caliente (IC) fue la responsable de la disminución de su expresión. También en los animales receptores el incremento del NO se demostró estadísticamente significativo al quinto día (5D) en los riñones sometidos a isquemia caliente. No hubo variación estadísticamente significativa entre los distintos grupos de isquemia caliente entre sí, comportándose ambos de manera homogénea (figuras 26 y 27).

Por tanto, se comprobaron incrementos estadísticamente significativos de la expresión del NO, en los tres grupos de isquemia caliente, tanto en los animales donantes en la fase IC, como en los animales receptores en el quinto día del estudio 5D.

**Figura 26** - perfil del comportamiento de la expresión del NO en las primeras dos fases según los grupos de isquemia caliente progresiva



**Figura 27** - perfil del comportamiento de la expresión del NO en las últimas tres fases del estudio según los grupos de isquemia caliente progresiva



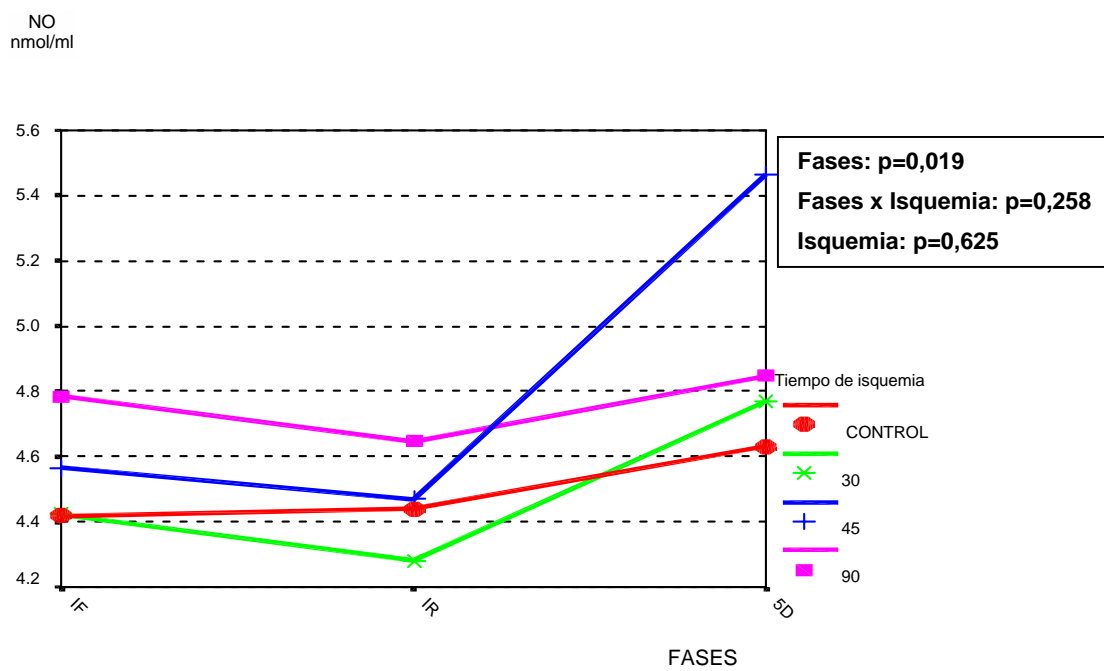
### **Expresión del NO en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

La determinación del NO durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **fue analizada separadamente para los animales donantes (fases B y IC) y los animales receptores (fases IF, IR y 5D)**. Resultó significativa en el análisis intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p < 0,019$ ), tanto para los animales donantes (fases B y IC), como para los animales receptores (fases IF, IR y 5D). Entretanto no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,625$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,258$ ). En la figura 28 se puede observar la evolución de la expresión del NO a lo largo de las últimas tres fases del estudio, en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva.

Así se demostró que las variaciones en la determinación del óxido nítrico, tanto en los animales donantes como en los receptores, estaban relacionadas con la fase del estudio. En el grupo donante, se atribuyó a la isquemia caliente (IC) la responsabilidad por la disminución de la expresión de la sustancia vasoactiva (NO). También en los animales receptores el incremento del NO se demostró estadísticamente significativo al quinto día (5D), tanto en el grupo control, como en los grupos de isquemia caliente progresiva (figura 28).



**Figura 28** - perfil del comportamiento de la expresión del NO en las últimas tres fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva



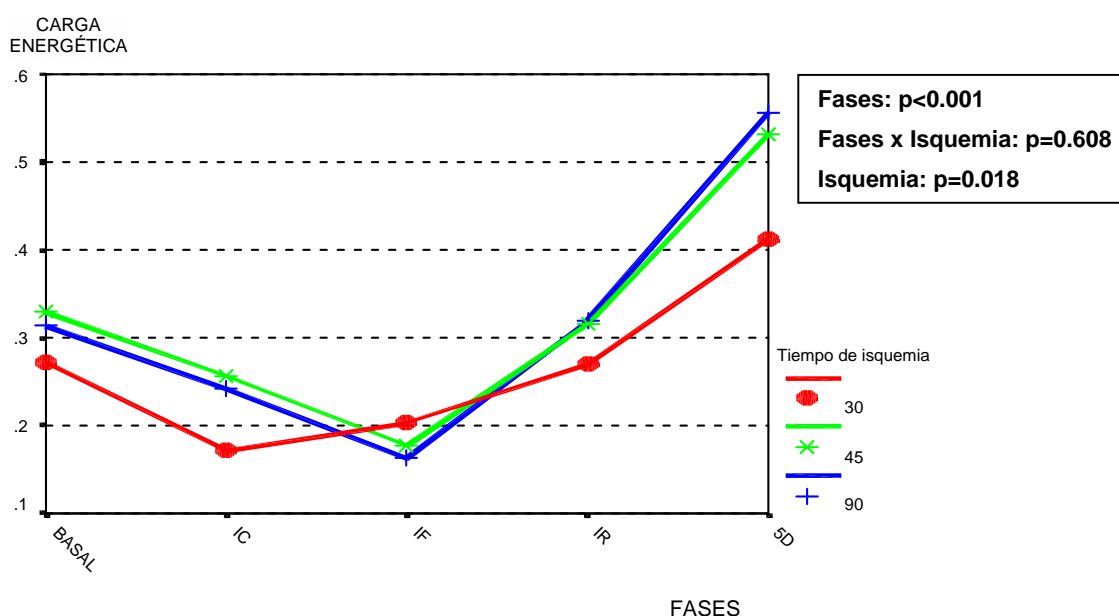
### 1.1.8. CARGA ENERGÉTICA

#### Determinación de la carga energética exclusivamente en los grupos de isquemia caliente

La carga energética aumentó exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 1D, 3D, 5D) de manera significativa ( $p < 0,001$ ), como en función del grupo ( $p = 0,018$ ), para los órganos viables. No obstante, no resultó significativa la interacción fase-isquemia ( $p = 0,608$ ).

En la figura 29 se puede observar la evolución de la expresión de la CE a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Así, se demostró que las variaciones en la carga energética se produjeron de manera homogénea en los riñones con isquemia. Hubo una caída general seguida de una recuperación de los niveles de la CE a partir del punto más bajo (IF), recuperación que se inició con la reperfusión (IR) y alcanzó el nivel máximo al quinto día (5D).

**Figura 29** - perfil del comportamiento de la determinación de la carga energética en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

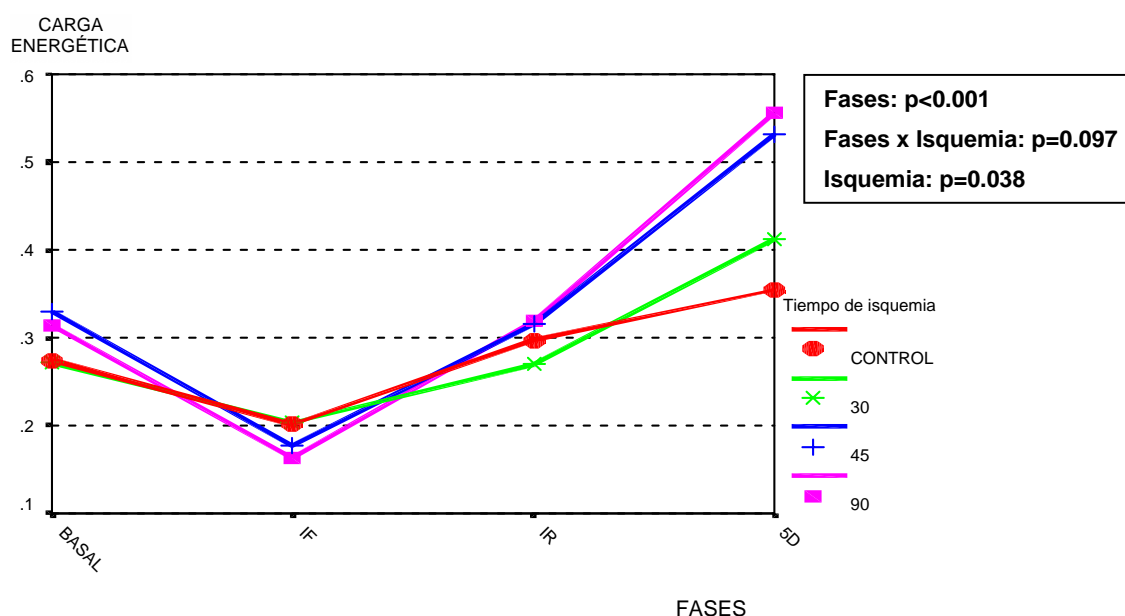


### Determinación de la carga energética en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva

La carga energética aumentó en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 1D, 3D, 5D) de manera significativa ( $p < 0,001$ ), como en función del grupo ( $p = 0,038$ ), para los órganos viables. No obstante, no fue significativa la interacción fase-isquemia ( $p = 0,097$ ).

En la figura 30 se puede observar la evolución de la expresión de la CE a lo largo de las fases del estudio, en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se produjeron también disminuciones de manera homogénea en la CE de los riñones con y sin isquemia, seguida de una recuperación de los niveles de la CE a partir del punto más bajo (IF), recuperación que se inició con la reperfusión (IR) y alcanzó una expresión máxima al quinto día (5D). También hubo una variación estadísticamente significativa entre los grupos de isquemia y el grupo control.

**Figura 30** - perfil del comportamiento de la determinación de la carga energética en las fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva

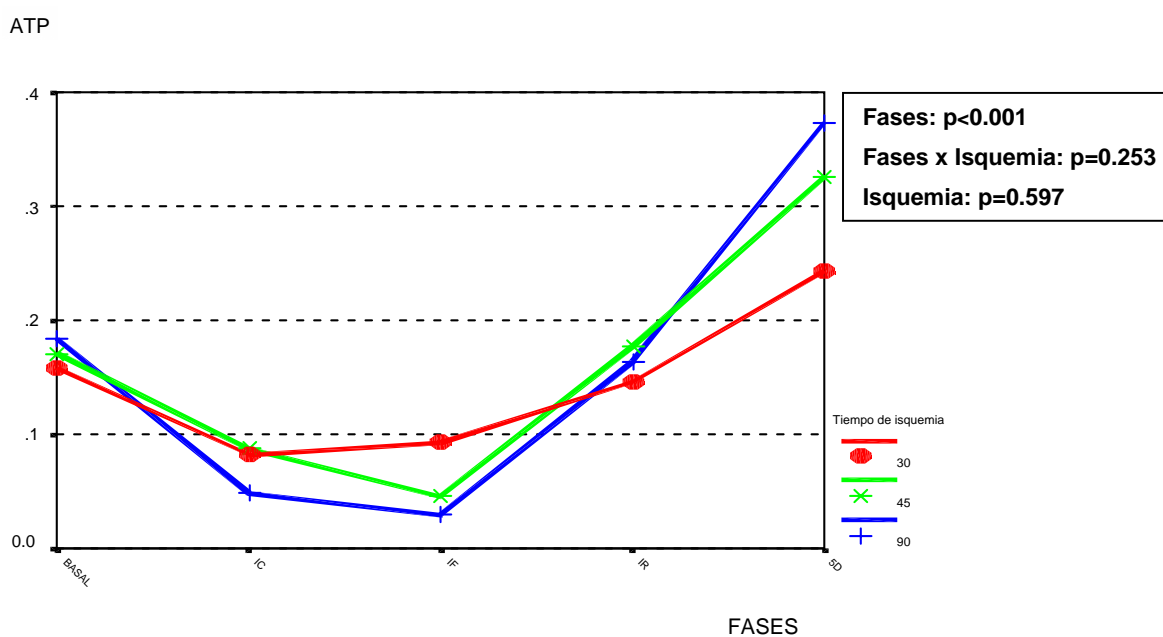


### Determinación del ATP exclusivamente en los grupos de isquemia caliente

**La determinación del ATP** durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **sólo resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio** ( $p < 0,001$ ); pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,597$ ); tampoco tuvo lugar la interacción fase-isquemia ( $p = 0,253$ ).

En la figura 31 se puede observar la evolución del ATP a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que las variaciones en la expresión del ATP se produjeron de un modo homogéneo en los riñones con isquemia, con niveles del ATP más bajos en las fases IC e IF, seguido de una recuperación que se inició con la reperfusión (IR) y alcanzó una expresión de niveles máximos en el quinto día (5D).

**Figura 31** - perfil del comportamiento de la determinación del ATP en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

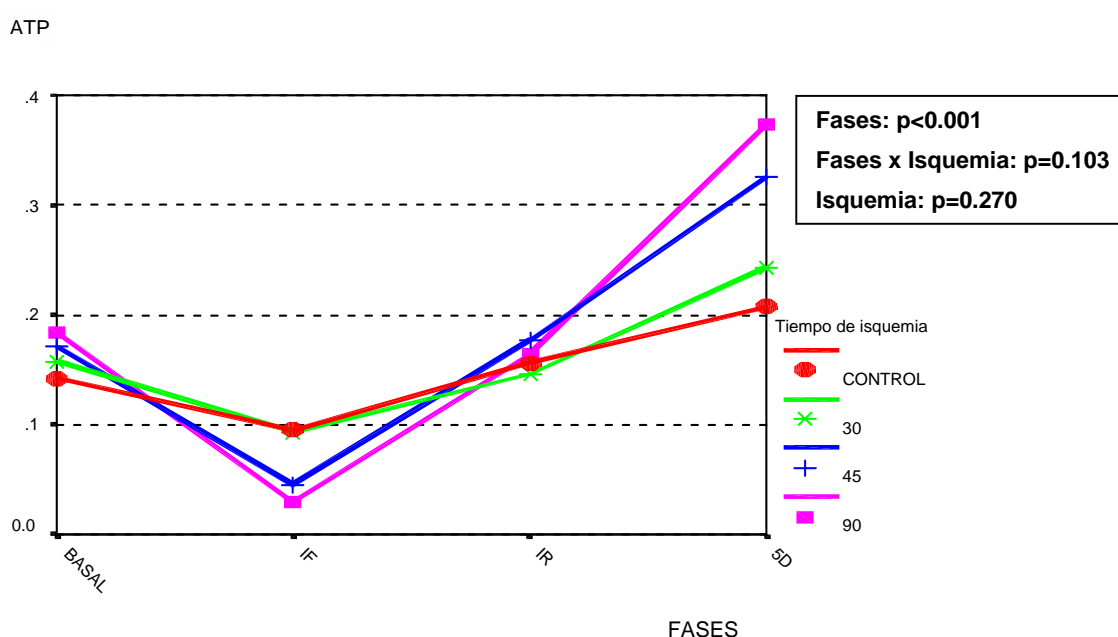


### Determinación del ATP en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva

La determinación del ATP durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **sólo** resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio ( $p < 0,001$ ); pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,270$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,103$ ).

En la figura 32 se puede observar la evolución de la determinación del ATP a lo largo de las fases del estudio, en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que las variaciones del ATP se produjeron de manera homogénea en los riñones con y sin isquemia, con una recuperación de los niveles del ATP a partir del punto más bajo (IF), recuperación que se inició con la reperfusión (IR) y alcanzó su nivel máximo en el quinto día (5D). No hubo ninguna variación estadísticamente significativa entre el grupo de control y los de isquemia caliente progresiva

**Figura 32** - perfil del comportamiento de la determinación del ATP en las fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva.

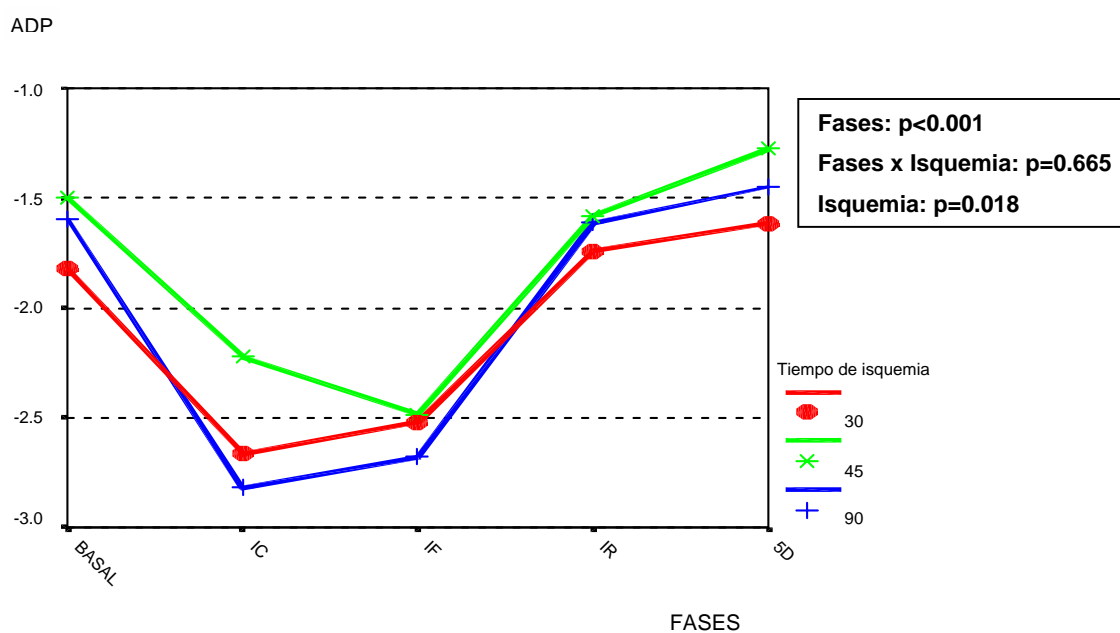


### Determinación del ADP exclusivamente en los grupos de isquemia caliente

La valoración del ADP aumentó exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 5D) de manera significativa ( $p < 0,001$ ), como en función del grupo ( $p = 0,018$ ), para los órganos viables. No obstante, no fue significativa la interacción fase-isquemia ( $p = 0,665$ ).

En la figura 33 se puede observar la evolución del ADP a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que las variaciones del ADP se produjeron de manera homogénea en los riñones con isquemia, con una recuperación de los niveles de la CE a partir de los puntos más bajos (IC e IF), que se inició con la reperfusión (IR) y ahí alcanzó su nivel casi máximo, presentando posteriormente una discreta elevación con tendencia a la estabilización en el quinto día (5D).

**Figura 33** - perfil del comportamiento de la determinación del ADP en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva

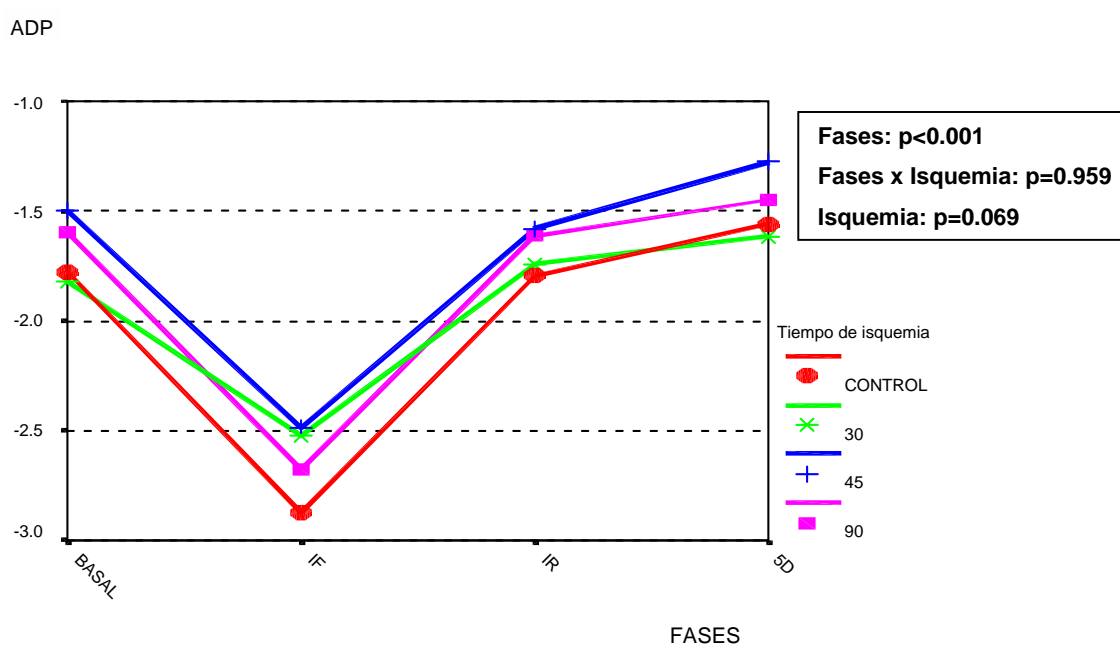


### Determinación del ADP en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva

La determinación del ADP durante las fases del estudio (B, IC, IF, IR, 5D), en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva, para los órganos viables, **sólo resultó significativa intrasujetos, o sea, a lo largo de las fases del estudio** ( $p < 0,001$ ), pero no como intersujetos, es decir, según los grupos de isquemia caliente progresiva ( $p = 0,069$ ); tampoco se dio la interacción fase-isquemia ( $p = 0,959$ ).

En la figura 34 se puede observar la evolución de la expresión del ADP a lo largo de las fases del estudio en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostraron las variaciones de los niveles de ADP en los riñones con y sin isquemia con una recuperación de los niveles del ADP a partir de su punto más bajo (IF), que se inició con la reperfusión (IR) y alcanzó su nivel máximo en el quinto día (5D). No hubo ninguna variación estadísticamente significativa entre el grupo de control y los de isquemia caliente progresiva.

**Figura 34** - perfil del comportamiento de la determinación del ADP en las fases del estudio según el grupo control y los grupos de isquemia caliente progresiva

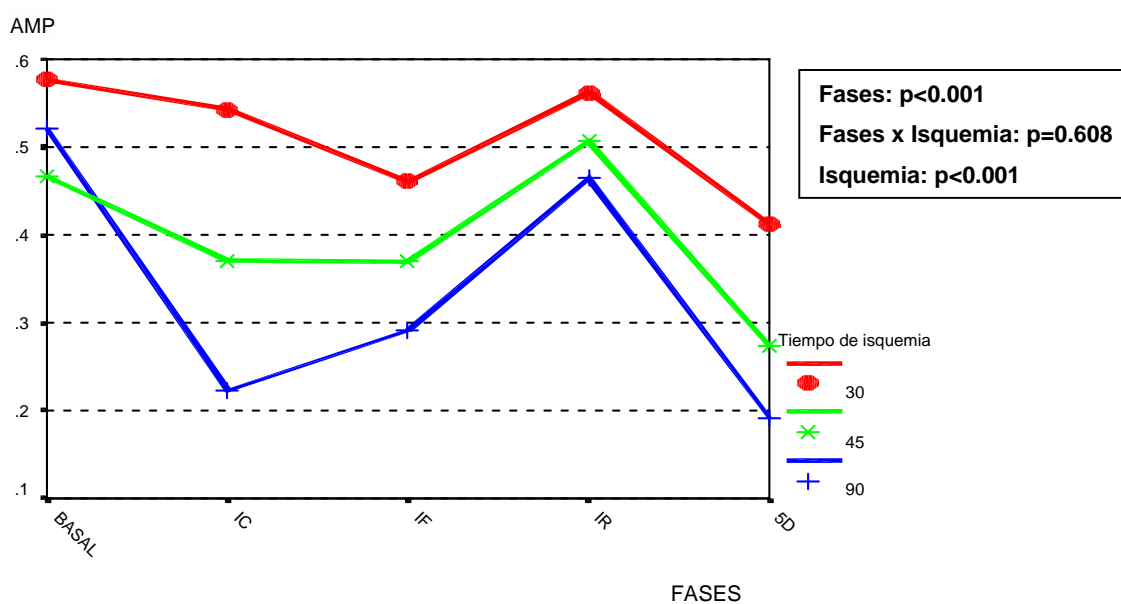


### Determinación del AMP exclusivamente en los grupos de isquemia caliente

La valoración del AMP aumentó exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva, tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 1D, 3D, 5D) de manera significativa ( $p < 0,001$ ), como en función del grupo ( $p < 0,001$ ), para los órganos viables. No obstante, no fue significativa la interacción fase-isquemia ( $p = 0,608$ ).

En la figura 35 se puede observar la evolución de la determinación del AMP a lo largo de las fases del estudio, exclusivamente en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que en los riñones con isquemia se produjo una discreta caída en los niveles de AMP en las fases de IC e IF, seguida de una tendencia a la recuperación después de la reperfusión (IR), culminando al quinto día con una caída en los niveles de AMP con respecto a los valores basales. Además, se demostró que cada grupo de isquemia varió según el mismo patrón de comportamiento, pero de modo independiente.

**Figura 35** - perfil del comportamiento de la determinación del AMP en las fases según los grupos de isquemia caliente progresiva



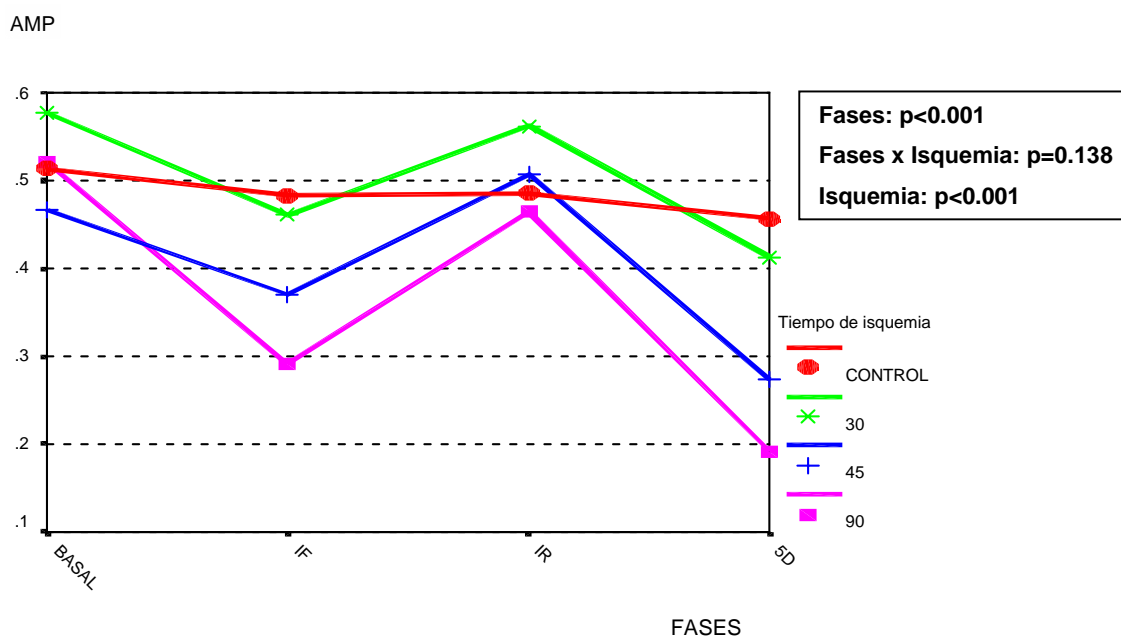


### **Determinación del AMP en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**La determinación del AMP** en el grupo de control y en los grupos de isquemia caliente progresiva aumentó, **tanto durante las fases del estudio (B, IF, IR, 1D, 3D, 5D) de manera significativa ( $p < 0,001$ ), como en función del grupo ( $p < 0,001$ )**, para los órganos viables. **No obstante, no fue significativa la interacción fase-isquemia ( $p = 0,138$ ).**

En la figura 36, se puede observar la evolución de la expresión del AMP a lo largo de las fases del estudio, en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva. Se demostró que en los riñones con y sin isquemia, también se produjo una caída en sus niveles al en las fases de IC e IF, seguida de una tendencia a la recuperación después de la reperfusión (IR), culminando al quinto día con una caída en los niveles de AMP con respecto a los valores basales. Además, se demostró que cada grupo de isquemia varió según el mismo patrón de comportamiento, pero de modo independientes. Las diferencias se atribuyeron exclusivamente a la isquemia total (IC + IF), ya que el grupo control se comportó de una manera muy uniforme (figura 36).

**Figura 36** - perfil del comportamiento de la determinación del AMP en las fases del estudio según el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva



## 2. CORRELACIONES

Se estudiaron las correlaciones entre todas las variables cuantitativas entre si, para determinar qué marcadores estaban correlacionados y qué significación estadística tenían de manera general, por fases y por grupos de estudio.

Se reprodujeron en la tabla 20 todas las correlaciones obtenidas por el cruce de las variables estudiadas. Se encontraron estadísticamente significativa las correlaciones esperadas entre CE y ATP, CE y AMP, CE y ADP, ATP y AMP, ATP y ADP, y también la correlación entre TBX y NO (ver tabla 21).

Se encontraron asimismo nuevas correlaciones significativas entre el TGF-beta1 y el ADP (figura 37 ( $r=0,172$ ,  $p<0,05$ )), además de otras correlaciones entre el NO con el ADP (figura 38 ( $r=0,206$ ,  $p<0,05$ )), el NO con la CE (figura 39 ( $r=0,184$ ,  $p<0,05$ )) y el NO con el ATP (figura 40 ( $r=0,194$ ,  $p<0,05$ )).

**Tabla 20 – Coeficientes de Correlación (r) entre todas las variables estudiadas**

	CARGA	ATPRAT	AMPRAT	ET	TBX	MOLTGF	MOL18S	LNNO	LNADP
CARGA	1.000								
ATPRAT	.939**	1.000							
AMPRAT	-.434**	-.257**	1.000						
ET	-.071	-.109	-.135	1.000					
TBX	-.088	-.032	.037	-.008	1.000				
MOLTGF	.114	.105	-.013	-.025	-.034	1.000			
MOL18S	-.038	.028	.131	.024	-.006	-.049	1.000		
LNNO	<b>.184*</b>	<b>.194*</b>	-.077	-.103	-.070	-.053	-.125	1.000	
LNADP	.544**	.527**	.140	-.129	-.140	<b>.206*</b>	-.035	<b>.172*</b>	1.000
LNPCI	-.071	-.018	.120	.088	.455**	.099	-.001	-.070	-.149

\* Significación  $p<0.05$

\*\* Significación  $p<0.01$

## Representación gráfica de las correlaciones encontradas

Se presentan a continuación los cuatro diagramas de dispersión representando las respectivas correlaciones. En la figura 37 se observan el TGF-beta1 versus ADP, en la 38 el NO versus ADP, en la figura 39 el NO versus CE y en la 40 el NO versus ATP.

No hay representación gráfica más didáctica que un diagrama de dispersión para representar las correlaciones. El coeficiente de correlación 'r', es un número que representa la relación lineal existente entre dos variables cuantitativas.  $-1 < r < 1$ . Cuanto más próximo a 0 menos correlación existe y cuanto más próximo a sus extremos 1 o -1 más correlacionados están estas variables. La única manera de ver esto gráficamente es un diagrama de dispersión.

Una vez calculado el coeficiente, ya sea uno u otro, grande o pequeño, significativo o no, no debemos olvidar que estamos trabajando con muestras (un número de casos reducido), no con toda la población. Debe observarse si esta correlación que tenemos es suficientemente grande (con el número de casos) para poder decir que es diferente de 0, es decir, que hay una correlación estadísticamente significativa. Y que por lo tanto, que esta relación no se debe al azar.

Como ejemplo estos dos gráficos que representan la correlación existente entre ATP *versus* Carga energética 'r=0.95', y 18S *versus* Carga energética 'r=0.05'.

Gráfico izquierda: ATP *versus* CE

Evidentemente la Carga energética está correlacionada con la ATP (depende de ATP). Por definición, CE es función de ATP. No tiene sentido calcular el coeficiente porque una es función de la otra, pero si tuviera sentido, veríamos primero que el coeficiente de correlación es muy elevado, próximo a 1  $r=0.96$  y es significativo y al ver representado el gráfico se observa claramente esta correlación. A valores más altos de ATP, valores más altos de CE. Por lo tanto

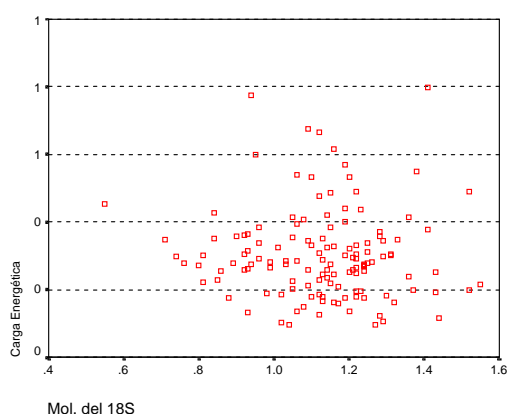
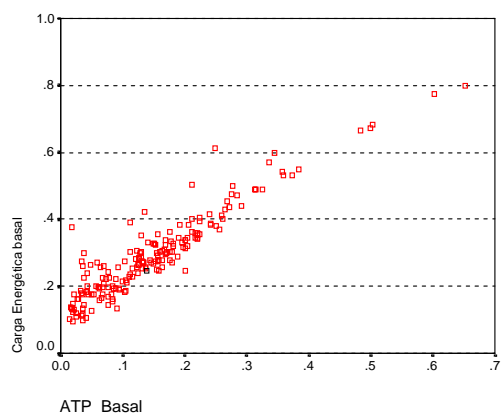
CE depende de los valores de ATP. En cierta manera podríamos adivinar el valor de CE conociendo los valores de ATP.

Gráfico derecha: 18S *versus* CE

El coeficiente de correlación es muy cercano a 0. Tal valor no es significativo, y por lo tanto no se puede concluir que la CE esté correlacionada con el 18S. Así que la CE no depende de los valores de 18S. Son dos variables independientes entre sí. Si nos fijamos en el gráfico no observamos tendencia alguna de agrupación.

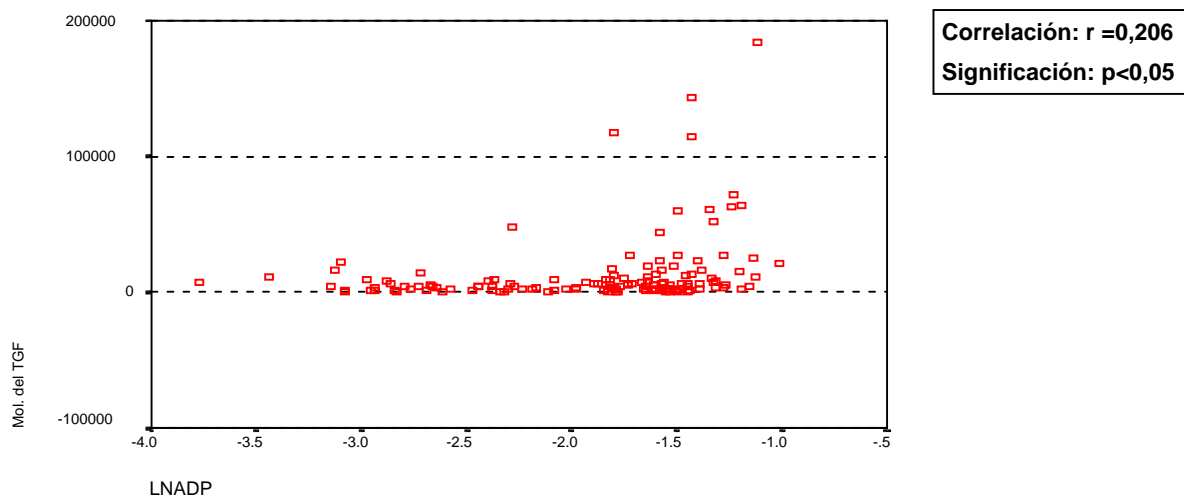
Gráfico izquierda: ATP *versus* CE;

Gráfico derecha: 18S *versus* CE.



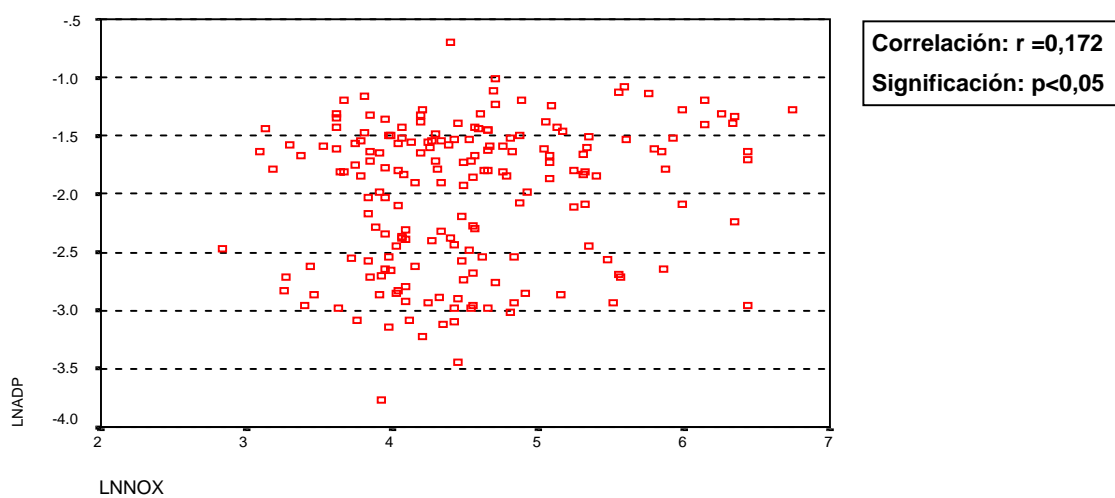
### 3.1. TGF-beta1 versus ADP

Figura 37 – Diagrama de dispersión de la correlación TGF-beta1 versus ADP.



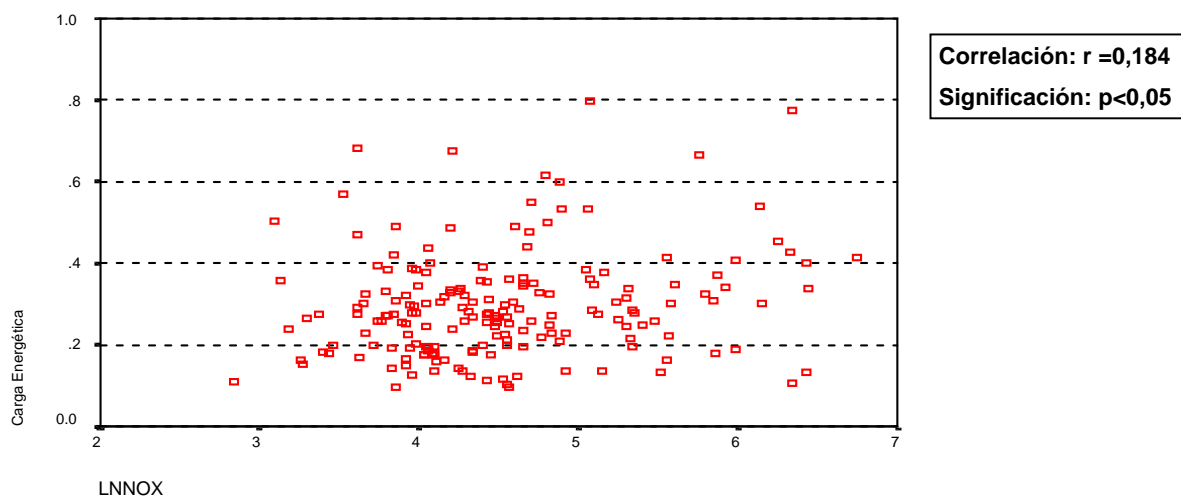
### 3.2. NO versus ADP

Figura 38 – Diagrama de dispersión de la correlación NO versus ADP



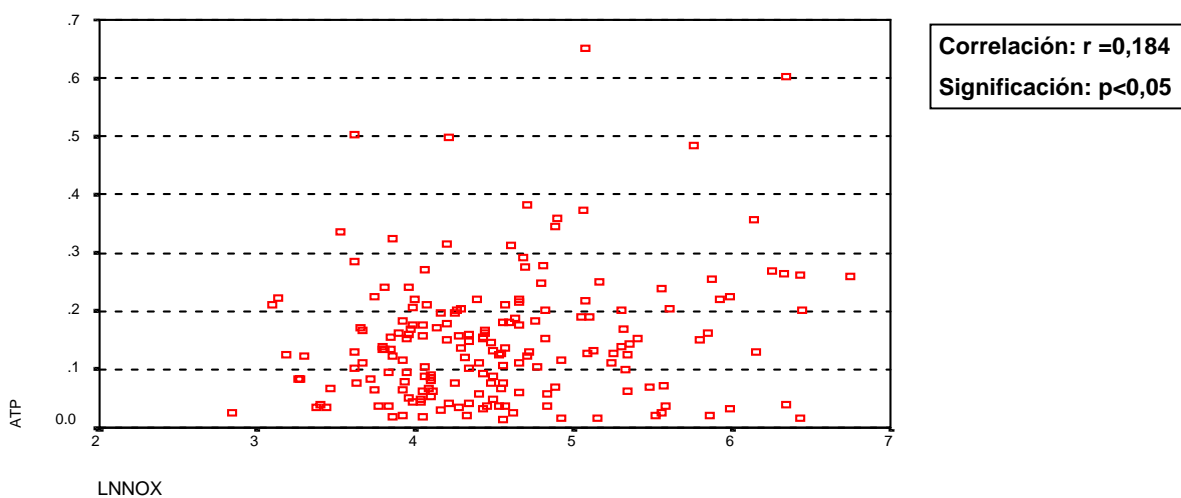
### 3.3. NO versus CE

Figura 39 – Diagrama de dispersión de la correlación NO versus CE



### 3.4. NO versus ATP

Figura 40 – Diagrama de dispersión de la correlación NO versus ATP



### 3.5. CORRELACIONES IF e IR

Fueron testados diferentes modelos de regresión para explicar el comportamiento del TGF-beta1 en el 5º día, en función de NO y ATP /ADP en los tiempos IF e IR. Ningún modelo se ajustó a los datos de que se dispone.

Pero sí ha sido factible corroborar lo que se observó en el Análisis del GLM mediante correlaciones. Cuando se demostró que el NO sube al quinto día, y que el ADP, el ATP y el TGF-beta1 también suben, se buscó una asociación lógica que explicara estos fenómenos. Así pues, se han calculado los coeficientes de correlación y la significación estadística en la subida de estos marcadores respecto a los momentos IF e IR (son las diferencias al quinto día del TGF-beta1, ADP, ATP y NO, respecto a los momentos IF e IR (ver figuras 41 y 42)).

Se pudo señalar que al quinto día, la subida del ATP respecto a IF estaba correlacionada (ver figura 41 ( $r=-0.447$ )) con el TGF-beta1. Así que a más subida de ATP menos aumentaba el TGF-beta1.

Al quinto día, la subida del ATP respecto a IR estaba correlacionada (ver figura 42 ( $r=0.331$ )) con el aumento del NO. Así que a más subida del ATP más aumentaba el NO.



**Tabla 21** - Coeficientes de correlación y la significación estadística del aumento de las variables TGF-beta1, ADP, ATP y NO, con respecto al momento IF.

		TGF_DIF	NOX_DIF	ADP_DIF	ATP_DIF
TGF_DIF	Correlación de Pearson	1.000	-.102	.322	-.447*
	Sig. (unilateral)	.	.314	.058	.012
	N	25	25	25	25
NOX_DIF	Correlación de Pearson	-.102	1.000	.074	.202
	Sig. (unilateral)	.314	.	.336	.123
	N	25	35	35	35
ADP_DIF	Correlación de Pearson	.322	.074	1.000	.153
	Sig. (unilateral)	.058	.336	.	.190
	N	25	35	35	35
ATP_DIF	Correlación de Pearson	-.447*	.202	.153	1.000
	Sig. (unilateral)	.012	.123	.190	.
	N	25	35	35	35

\*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

**Tabla 22** – Coeficientes de correlación y la significación estadística del aumento de las variables TGF-beta1, ADP, ATP y NO, con respecto al momento IR.

		TGF_DIR	NOX_DIR	ADP_DIR	ATP_DIR
TGF_DIR	Correlación de Pearson	1.000	-.116	.267	-.318
	Sig. (unilateral)	.	.290	.098	.061
	N	25	25	25	25
NOX_DIR	Correlación de Pearson	-.116	1.000	.221	.331*
	Sig. (unilateral)	.290	.	.101	.026
	N	25	35	35	35
ADP_DIR	Correlación de Pearson	.267	.221	1.000	.238
	Sig. (unilateral)	.098	.101	.	.084
	N	25	35	35	35
ATP_DIR	Correlación de Pearson	-.318	.331*	.238	1.000
	Sig. (unilateral)	.061	.026	.084	.
	N	25	35	35	35

\*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

#### 4. MODELO PRONÓSTICO DE VIABILIDAD

##### Modelo pronóstico de la viabilidad del órgano con las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial medio

Se construyó un modelo mediante la regresión logística que se ajustó a las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial medio (figura 41) estudiadas en la fase IR, de modo que se pudo producir un modelo pronóstico con perfil de fiabilidad de un 95% (tablas 23 y 24).

**Tabla 23.** Modelo pronóstico sobre la viabilidad con las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial

Resumen de los pasos <sup>a,b</sup>								
	Mejora			Modelo			% de clas. correcta	Variable
	Chi-cu adrado	gl	Sig.	Chi-cu adrado	gl	Sig.		
Paso 1	12.224	1	.000	12.224	1	.000	82.5%	IN: ET11R
2	7.324	1	.007	19.548	2	.000	92.5%	IN: FLUJART
3	3.217	1	.073	22.764	3	.000	95.0%	IN: ADPRAT2

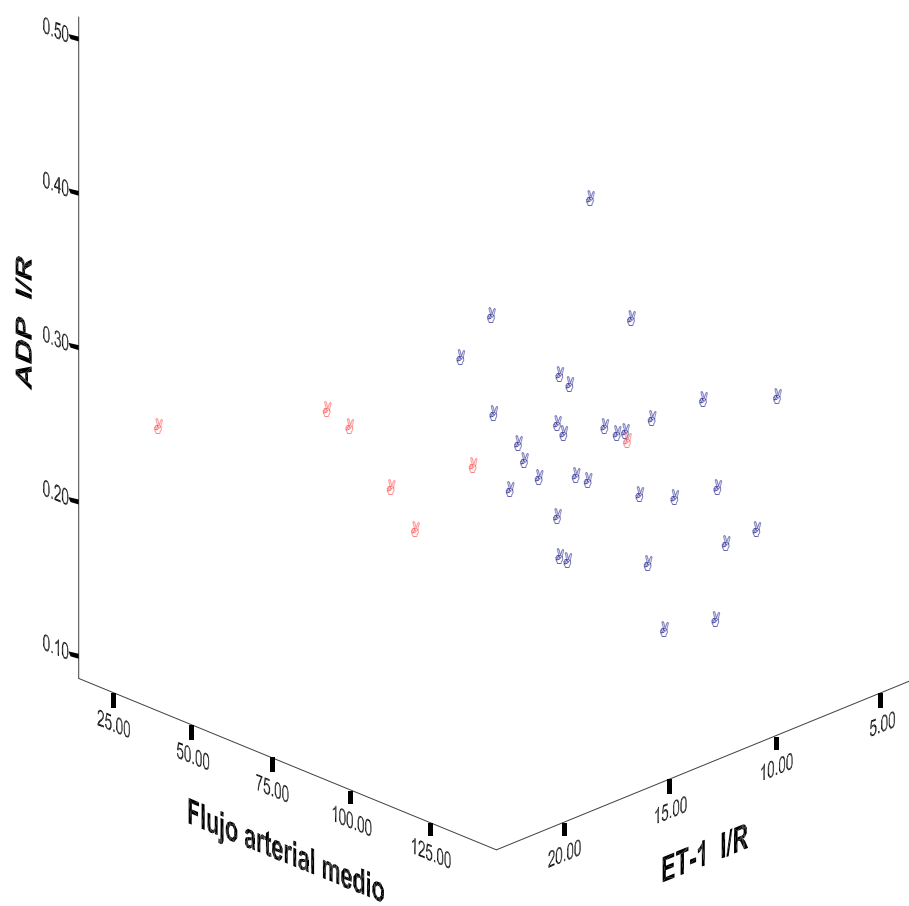
<sup>a</sup>. No se pueden eliminar ni añadir más variables al modelo actual.

<sup>b</sup>. Bloque final: 1

**Tabla 24.** Modelo pronóstico sobre la viabilidad con las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial

				Pronosticado		
				Viabilidad		Porcentaje correcto
			Sí	No		
Paso 3	Observado	Viabilidad	Sí	31	1	96.9
			No	1	7	87.5
Porcentaje global						95.0

<sup>a</sup>. El valor de corte es .500

**Figura 41.** Regresión logística entre las variables ADP, ET-1 y Flujo arterial

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

La falta persistente de órganos aptos para trasplante obliga a la utilización de todos los medios humanos y técnicos posibles en la investigación de soluciones alternativas. La búsqueda de estas alternativas ha llevado a proponer la obtención de órganos para trasplante a partir de donantes en los que la parada cardíaca ya ha tenido lugar<sup>139,367</sup>. Se calcula que el número de donantes potenciales podría aumentar así en un 20%<sup>47</sup>. Los trabajos publicados coinciden en que los riñones obtenidos de esta forma son útiles para trasplante. A pesar de tener una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo es similar a los obtenidos de corazón latiente.

Sin embargo, los criterios de selección del riñón viable no están bien definidos. A pesar de que el número de riñones desechados tras la extracción por dudarse de su viabilidad es mayor en el grupo de donantes a corazón parado que en los de a corazón latiente, todavía es mucho mayor el número de injertos que no llegarán a funcionar nunca en comparación con los obtenidos a corazón latiente. El mayor inconveniente que existe radica en la imposibilidad de predecir qué órganos serán viables antes de decidir su colocación en el receptor.

Un riñón sometido a trasplante sufre el daño por isquemia/reperfusión. Si el riñón se obtuvo a partir de un donante a corazón parado, el tiempo de isquemia caliente es mayor, ya que el órgano se ha visto afectado con mayor intensidad.

El interés práctico del presente estudio reside en la posibilidad de aumentar el número de órganos aptos para trasplante renal mediante la obtención de injertos procedentes de donantes tras parada cardíaca. Por lo tanto, es importante conocer con detalle qué ocurre en un riñón después de un período de isquemia caliente durante la parada cardíaca y su posterior reperfusión para llegar a determinar factores predictivos y pronósticos de la viabilidad del órgano y poder actuar sobre el potencial injerto. Dentro de los diferentes mecanismos de lesión y reparación, se optó por estudiar la expresión del TGF-beta1. El estudio de la misma así como

su relación con otras sustancias vasoactivas y alteraciones celulares que se producen durante la lesión isquemia-reperfusión pueda ayudar a entender y posteriormente prevenir el daño tisular.

Ante una situación de isquemia se puede producir una situación de necrosis tubular aguda que afectará en mayor o menor grado a la función renal y a las células tubulares. Y si la isquemia produjo un daño irreversible se producirá en nivel histológico una lesión de necrosis cortical que vendrá dada por la proporción de glomérulos inviábiles de las muestras. Esta lesión hará que el órgano no sea viable para el trasplante. En cuanto al criterio de viabilidad, a parte de las múltiples evidencias clínicas en las que la presencia de necrosis cortical (NC) se asocia a no viabilidad, la ausencia de expresión de TGF-beta1 mRNA y 18S mRNA únicamente en los riñones con NC, valida el criterio de no viabilidad que se admite para los riñones con NC.

Para llevar a cabo el presente estudio se eligió un modelo experimental y no clínico, ya que de este modo se obtiene un control adecuado de todas las variables que intervienen en el proceso. Además, se escogió un animal de experimentación grande, como es el cerdo, en un modelo de trasplante renal que guarda la máxima similitud con el humano. Se ha reproducido el síndrome de isquemia/reperfusión realizando un trasplante renal heterotópico, con donante a corazón parado, con diferentes tiempos de isquemia caliente predeterminados. Todo ello difiere de la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento, en los que se suelen emplear animales pequeños como la rata, en los cuales se provocó daño por isquemia/reperfusión simplemente pinzando y despinzando el pedículo vascular. En definitiva, se ha intentado reproducir con la máxima similitud posible y reduciendo al máximo el número de variables aquella situación clínica que se daría en el humano.

Es conocido que durante la lesión por isquemia-reperfusión actúan factores de crecimiento que son imprescindibles en los momentos de intensa reparación tisular. Se ha intentado definir mejor cuál es el papel de TGF-beta1, de gran potencial en el desarrollo de fibrosis y de la que es la nefropatía crónica del injerto en los momentos iniciales del síndrome

de isquemia-reperfusión. Para ello, en el presente estudio se evaluó la expresión del TGF-beta1 y del 18s en tres situaciones diferentes: presencia o ausencia de la CsA, presencia o ausencia de isquemia caliente, isquemias calientes progresivas.

Junto con el TGF-beta1 se evaluó el estado energético celular analizando los nucleótidos fosforilados y sus metabolitos, en las que están implicadas la mitocondria y la cadena fosforilativa, que es el primer punto de ataque de la hipoxia, circunstancia que conlleva a una disminución de la síntesis de ATP. Asimismo, se evaluaron la acción de los RLO, por medio de las determinaciones de las sustancias vasoactivas sintetizadas por acción de los RLOs al actuar sobre las membranas celulares (tromboxano y prostaciclina). Por último, también se evaluaron los mecanismos implicados en este proceso, como la producción por parte del endotelio de sustancias vasoactivas: endotelina y óxido nítrico. En un intento de valorar la acción conjunta de todas estas sustancias vasoactivas se determinó el flujo de la arteria renal.

El diagnóstico actual de las enfermedades renales y la elección del mejor tratamiento se basan en una combinación de determinaciones clínicas y patológicas. Con los avances de las técnicas de bioquímica y la biología molecular, ya es posible identificar los cambios genéticos y bioquímicos fundamentales que pueden haber iniciado la enfermedad o haber contribuido a su desarrollo. Esta tesis describe parte de la tecnología que puede conducir a cambios significativos en el diagnóstico precoz de las enfermedades del trasplante renal, su caracterización y tratamiento, además de una potencial prevención. Por ejemplo, las técnicas diferenciales que identifican alteraciones génicas pueden mostrar los cambios en los modelos de expresión del mRNA, además de identificar previamente genes desconocidos y reevaluar nuevos comportamientos de genes ya involucrados en las enfermedades del trasplante renal. La generación de mapas con los polimorfismos genómicos facilitará selecciones genéticas que identifiquen genes o combinaciones de genes que producirían una mayor susceptibilidad a las enfermedades. Combinando análisis genómicos con estudios epidemiológicos, será posible identificar factores ambientales que puedan contribuir al desarrollo de la enfermedad renal,

principalmente en individuos genéticamente susceptibles. Ya existe un importante número de nuevas terapias, entre las cuales se incluyen reactivos que mimetizan la función de citoquinas específicas, chemoquinas y efectores celulares. Con el listado en mano de los genes de las enfermedades renales, toda fisiología y patofisiología renal se podrá determinar, lo que conduciría al descubrimiento de intervenciones farmacológicas orientadas hacia estos genes, y sus subproductos podrían jugar un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad renal pretrasplante y postrasplante <sup>368</sup>.

A pesar de no ser directamente aplicable a las situaciones humanas del trasplante renal, este modelo experimental evidencia muchas aplicaciones clínicas potenciales. Por ejemplo, existen indicios de que algunos nuevos fármacos inmunosupresores para uso en trasplante renal son efectivos en la prevención o en el tratamiento de la fibrosis renal. Existen también numerosos métodos potenciales de manipulación de la lesión de isquemia-reperfusión que se mostraron capaces de reducir tales efectos adversos iniciales <sup>369</sup>. Con este modelo experimental se podrían evaluar los posibles beneficios a largo plazo de estas estrategias farmacológicas <sup>370</sup>.

“La conversación célula a célula” es una expresión utilizada por lo general para designar los procesos interactivos entre las células. Esta idea es particularmente relevante en el caso del riñón, en el que se da una importante heterogeneidad de población celular, que presenta diferentes estructuras y funciones. Comprobar que dicho concepto ocurre por medio de un modelo experimental *in vitro* es una tarea muy compleja, ya que ningún modelo es perfecto; además, las células no dispondrían de la multitud de citoquinas, factores de crecimiento u otras proteínas esenciales que serían necesarios para la interacción de los genes que regulan la función renal. A pesar de que el TGF- $\beta$  está muy bien identificado por su actuación en la fibrosis renal, su expresión precoz también se supone pensada para que ayude en la regeneración renal <sup>371</sup>.



La biología molecular aplicada al estudio de las citoquinas nos ayuda a entender la compleja señalización y vehiculización de mensajes entre células. En el caso del riñón, esta señalización es más compleja y apasionante dadas las diferentes estirpes celulares que componen el tejido renal. La importante capacidad regeneradora y la sensibilidad a la lesión que tienen algunas células del tejido renal (por ejemplo, las células tubulares) hacen que en este órgano las citoquinas y factores de crecimiento implicados en estos procesos tengan un papel clave en el estudio de los mecanismos de reparación. Entre estos factores, el TGF- $\beta$  juega un papel crucial, también en regeneración aguda del órgano.

El principal problema cuando se compara un estudio llevado a cabo en humanos con un modelo experimental es la fidelidad con que se reproducirá el modelo en estudio, ya que muchos factores pueden influir en la expresión de los genes en un estudio llevado a cabo en pacientes. No obstante, el modelo utilizado en este estudio reproduce con completa fiabilidad todos los hechos de un trasplante renal en humanos, incluyendo la inmunosupresión. La fiabilidad de los datos obtenidos en este estudio está comprobada, ya que se transcribió un modelo en el que el escenario del trasplante renal se reprodujo íntegramente y completamente.

Puesto que todavía es relativamente limitado el conocimiento detallado sobre los cambios celulares y moleculares tardíos que ocurren en el riñón después de la lesión por isquemia-reperfusión<sup>372</sup>, se optó por estudiar este modelo experimental con tiempos bien definidos en lo concerniente a la isquemia provocada. Los eventos iniciales involucrados en la lesión por isquemia-reperfusión fueron descritos detalladamente por *Takada et al*<sup>373</sup>.

Es fácil prever que después del trasplante el influjo de los mediadores inflamatorios, junto con la degradación de las células en necrosis, requiere una matriz extracelular mucho más fluida, y los enzimas degradantes, por lo tanto, se tienen que regular en el intersticio renal. En el compartimento vascular después de la lesión por isquemia-reperfusión, el daño al endotelio celular asociado con la migración de células musculares lisas de la capa media hacia la íntima requiere la destrucción de la capa interna elástica de los vasos<sup>374</sup>.

La valoración de los efectos de la lesión por isquemia-reperfusión en humanos es una tarea ardua y difícil, debido a la inmensa cantidad de variables de confusión. Quizá la situación más cercana sea el trasplante renal, en cuyo caso se comparan donantes cadáveres convencionales (DC) con aquellos procedentes de los donantes a corazón parado (NHBD), que sufrieran, por supuesto, isquemia caliente<sup>370</sup>. En un experimento realizado anteriormente<sup>375</sup>, no se encontró ninguna diferencia en la expresión del TGF- $\beta$ , MMP-2 o colágeno III en los primeros seis meses después del trasplante, incluyendo una valoración realizada al cabo de siete días de la cirugía, cuando se compararon los dos tipos de donantes: DC y NHBD<sup>375</sup>.

El aumento de la síntesis de mRNA del TGF- $\beta$  observado en este modelo durante la primera semana postrasplante no debería relacionarse con la generación de fibrosis y posterior desarrollo de nefropatía crónica del injerto (CAN), como sí ocurre en fases más tardías. La explicación de esta sobrerregulación debería encontrarse en el incremento de la capacidad regenerativa celular para reparar y subsanar el daño celular producido por la isquemia-reperfusión. De hecho, en la mayor parte de los pacientes que sufren NTA, tras la recuperación de ésta, la función del órgano puede llegar a ser incluso enteramente normal, lo que da una idea de la restitución de los mecanismos fisiológicos que se producen en las células renales dañadas incapaces de llevar a cabo sus tareas habituales.

Cada vez más, los donantes a corazón parado (NHBD) y otras categorías de donantes marginales (*extended donors criteria*) son considerados fuentes potenciales de órganos para el trasplante renal clínico. La condición de este órgano, los riesgos del procedimiento y el resultado final del trasplante están condicionados por una variedad de circunstancias, incluyendo el estado del donante, los efectos de la isquemia, almacenamiento (isquemia fría) y reperfundión. El proceso inicial de isquemia/reperfundión (I/R) parece desencadenar una mayor actividad de los antígenos de grandes complejos de histocompatibilidad (MHC); el aumento potencial de la inmunogenicidad del órgano trasplantado puede promocionar una respuesta inflamatoria no específica que, a su vez, puede tener una interacción amplificando la cascada

molecular de adhesión a las citoquinas, interacción que caracteriza la lesión inmunológica<sup>362</sup>. Tales observaciones explicarían muy bien la aparente sinergia entre el retardo del inicio funcional del aloinjerto renal y el rechazo agudo del aloinjerto renal, que juntos producen los peores resultados, tanto a corto como a largo plazo, si se considera una de las patologías individualmente<sup>363</sup>. Los primeros cambios observados en la dinámica renal inmediatamente subsiguientes a la lesión por isquemia-reperfusión parecen contribuir a los subsiguientes cambios que van a ocurrir en el injerto. La primera lesión es el aumento en la circulación de las moléculas P-selectin, que se mueven por la superficie endotelial de los vasos en menos de cinco minutos de la reperfusión del órgano, de modo que empieza el escalón de dificultades iniciales para conducir los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) por la íntima de los vasos, que por ellos mismos estimulan las actividades de otras poblaciones leucocitarias, y la consiguiente expresión de sus productos<sup>359</sup>.

En el análisis y la discusión de las variables descriptivas, se observó sobre **la viabilidad** que los cuarenta casos estudiados fueron válidos para el análisis estadístico y no hubo casos perdidos. Así, el grupo de 90 minutos de isquemia tuvo un 60% de órganos viables; el de 30 y 45, un 80%, y el grupo control alcanzó un 100% de viabilidad. **Por lo tanto, a mayor tiempo de isquemia, menor viabilidad (p=0,011).**

**Con respecto a la histología**, se observó que a medida que aumentó el tiempo de isquemia caliente se intensificaron los cambios histológicos, aumentó el porcentaje de necrosis cortical y la intensidad de la necrosis tubular aguda. El grupo control no presentó ningún caso de necrosis cortical; el de 30 minutos de isquemia, un caso de necrosis cortical 100% y otro 10%; el de 45 minutos, dos casos de necrosis cortical, y el de 90 minutos, cuatro casos divididos en dos casos de necrosis cortical 100% y dos 10%. En el grupo control, 30, 45 y 90 minutos de isquemia caliente hubo, respectivamente 5, 3, 2 y 1 casos sin ningún tipo de necrosis.

El hallazgo que más nos sorprendió fue observar un 60% de los riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente serían viables funcionalmente. La previsión inicial sería que todos deberían ser inviábiles. **El tiempo de isquemia caliente afecta a la histología del órgano, aunque no de la manera en que se podría esperar.**

Se llegó a la conclusión de que **los cambios histológicos relacionados con el rechazo** como tubulitis, afectación de intersticio, glomérulos y vasos **no guardaban relación con el tiempo de isquemia**, pues fueron observados en todos los grupos y con distinta intensidad, en un principio no relacionada con el tiempo de isquemia de los mismos.

**En cuanto a la anatomía patológica y el TGF- $\beta$**  se sabe que la tubulitis renal es un suceso que caracteriza el diagnóstico y el tratamiento del rechazo agudo del aloinjerto renal. Además de la vasculitis, la extensión de la tubulitis es utilizada en el score cuantitativo de Banff, con lo que se define la severidad de las lesiones asociadas con el rechazo. En los cortes histológicos, en todas las secciones que mostraban rechazo celular agudo, hubo una localización predominantemente tubular de la expresión del TGF- $\beta$ 1 que contrastaba con la distribución más extendida de la misma expresión del TGF- $\beta$ 1 en el rechazo crónico<sup>378</sup>. Se demostró que el tejido renal normal no contiene linfocitos o células CD103+ intratubulares. Además, las células CD103+ se encuentran exclusivamente en el epitelio tubular. La activación local de este proceso ocurre por la acción de células T activadas por el TGF- $\beta$ <sup>379</sup>. La presencia de células epiteliales tubulares (TEC) apoptóticas es una característica comúnmente observada en el rechazo agudo del riñón trasplantado<sup>380</sup>.

Se dio una distribución equitativa de lesiones histológicas identificadas en el quinto día (ver tabla 12). Permanecían en estado normal (No) el 27,5% de los órganos; 12,5% presentaron necrosis cortical total (NC); el 60% restante de los órganos presentó necrosis tubular aguda (NTA). Tres órganos presentaron concomitantemente NC de un 10% y NTA +++ (ver tabla 14). Se comprobó que el hallazgo histológico no tuvo ninguna relación con la expresión del TGF-

beta1 al quinto día en los riñones viables. De esta forma se pudo afirmar que dichas expresiones no son distintas para grados progresivos de lesión histológica.

Fue muy importante el hallazgo, de que los riñones no viables (con necrosis cortical) no tuvieron expresión de mRNA TGF-beta1, lo cual, por otra parte validó la histología con necrosis cortical, como un criterio adecuado de no viabilidad.

**Tampoco se demostró que las variaciones en la expresión media al quinto día del TGF-beta1 en el grupo control y en los grupos de isquemia caliente progresiva fuera diferentes. En todos los grupos se demostró un aumento de expresión del TGF-beta1 al quinto día.**

**El nivel de la creatinina sérica** fue utilizado para evaluar la función renal. Se observó que los grupos control y de 30 minutos de isquemia presentaron niveles similares a lo largo de las fases del estudio. A partir del primer día, se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y los de mayor tiempo de isquemia (45 y 90 minutos). El grupo de mayor tiempo de isquemia (90 minutos) fue el que tuvo niveles de creatinina más elevados de forma significativa.

La creatinina presentó una elevación durante el primer y tercer día y posteriormente una tendencia a la estabilización en el quinto día. Las diferencias entre los grupos de isquemia caliente y el grupo control fueron evidentes en cuanto a los valores séricos alcanzados. Además presentó una pendiente de crecimiento menor en el grupo control, cuando se compara con los grupos de isquemia caliente.

En cuanto a **la influencia del tratamiento con CsA y la expresión del TGF-beta**, se sabe que este inmunosupresor, no es capaz de controlar la proliferación de células T activadas y el conocido incremento de la producción en humanos del TGF- $\beta$  por las TEC<sup>381</sup>. Recientemente, el grupo Banff de estudio propuso que la identificación de los linfocitos T

citotóxicos podría aumentar el diagnóstico del rechazo y/o predecir disfunción tardía del injerto<sup>382</sup>. Se considera que la CsA es capaz de elevar la producción del TGF- $\beta$ 1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta característica del fármaco podría conducir a un efecto negativo sobre la supervivencia de los injertos tanto a corto como a largo plazo.

En el presente estudio, se comprobó que **la utilización de la CsA no determinó diferencias en el grupo de control con diez animales**. Así, se pudo afirmar que las dos ramas del grupo control no son distintas; no se detectaron diferencias significativas atribuibles al uso de la ciclosporina. Hay que señalar que dicha conclusión debe limitarse al corto periodo de cinco días que duró el experimento y a la lesión por isquemia-reperfusión. **En consecuencia no se pudo atribuir a la utilización de CsA la sobreexpresión del TGF-beta al quinto día del trasplante renal**. De hecho, la expresión de TGF- $\beta$ 1 al quinto día en el grupo tratado con Aza apuntaba para una tendencia de mayor expresión de TGF-beta1, a pesar de ser la CsA teóricamente más estimulante del TGF- $\beta$ 1 que la Aza. La explicación a este resultado podría derivarse de la menor dinámica del estado celular del grupo tratado con Aza (o peor, con CsA), pues en este estado, la sensibilidad del tejido renal al efecto nefrotóxico de la CsA es mayor. Esto explicaría una mayor capacidad regenerativa en el grupo tratado con Aza. A pesar de todo, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos control, por lo que se consideró adecuado unificar ambos grupos de tratamiento como un grupo control único.

**La influencia de la isquemia en la expresión del TGF-beta**, se observó que el TGF- $\beta$  está presente en todos los tejidos, pero es particularmente abundante en los huesos, los pulmones, los riñones y en los tejidos placentarios. Muchos tipos de células parenquimatosas producen el TGF- $\beta$ , pero no todos. También es producido o liberado por células que infiltran los tejidos como los linfocitos, los monocitos/macrófagos y las plaquetas. Acompañando la cicatrización o la inflamación, todas estas células son fuentes potenciales de síntesis del TGF- $\beta$ . En general, la liberación o activación del TGF- $\beta$  estimula la producción de múltiples proteínas de matriz extracelular e inhibe la degradación de estas proteínas matriz, salvo pocas excepciones. Las acciones del TGF- $\beta$  contribuyen a la reparación tisular, que bajo

circunstancias ideales conduce a la restauración de la arquitectura tisular normal, y también puede involucrar componentes de la fibrosis tisular. En muchas enfermedades, una cantidad excesiva del TGF- $\beta$  contribuye a la formación de una excesiva cantidad de fibrosis tisular que compromete la función normal del órgano, tópico que ya fue sujeto de numerosas revisiones<sup>383</sup>. Se desea, ahora, discutir el papel del TGF- $\beta$ , con particular énfasis en su participación en los primeros momentos del síndrome de isquemia-reperfusión.

El TGF- $\beta$ 1 es un factor de crecimiento multifuncional que influye en varios procesos celulares fisiológicos y de desarrollo. En muchos casos, el TGF- $\beta$ 1 puede conducir a un incremento de la respuesta regenerativa celular, pero existen situaciones en las que una persistente sobreexpresión o una activación no reglada del TGF- $\beta$ 1 conducen a una sobrerrespuesta que podría provocar una fibrosis importante o una enfermedad proliferativa<sup>384</sup>,<sup>385</sup>. Sin embargo, el significado del incremento del TGF- $\beta$ 1 después de la lesión isquémica no se puede comprender perfectamente hasta que otros experimentos establezcan sus efectos deletéreos. Es importante destacar el hecho de que la expresión aumentada del TGF- $\beta$ 1 mRNA puede jugar un papel relevante en la recuperación y restructuración renal sin conducir, con esto, a cicatrices detectables o a la cronicidad<sup>372</sup>.

**Citoquinas y factores de crecimiento**, entre otros factores solubles, coordinan la respuesta inflamatoria mediante el control de la naturaleza del infiltrado inflamatorio y sus funciones, y de las células inmunoefectoras en el sitio de lesión. Sin embargo, la cuestión relevante y crítica aquí es determinar la verdadera interdependencia entre los eventos epiteliales, endoteliales e intersticiales que conducen a la inflamación. La elucidación del camino entre lesión epitelial e inflamación tisular, ambas en el ámbito celular y molecular, determinará una mejor comprensión de las relaciones entre la lesión inespecífica, que sirve de punto de partida para la inflamación, los mecanismos específicos de las células T, y la respuesta inmunespecífica<sup>372</sup>. Es importante reconocer que ni el infiltrado inflamatorio ni la expresión de cualquier citoquina es, *a priori*, evidencia de una respuesta inmune antígeno específica. Del mismo modo, en una enfermedad inmunológica, la herida puede ser la causa

de la expresión de las citoquinas, mucho más que el efecto, siempre involucrado como la explicación de tal asociación <sup>386</sup>. Así, el desarrollo de una lesión o herida puede propiciar la respuesta de citoquinas inflamatorias, que a su vez pueden alterar profundamente la interpretación de su probable causa, sea inmunológica o no. Es más, la lesión que conduce a la inflamación puede promocionar en ciertos casos ciertas respuestas específicas, hasta culminar con el ciclo de lesión → inflamación → lesión. No obstante, una simple citoquina no “causa” la lesión, la cronicidad o da una explicación a ambas. Mejor dicho, la persistencia de la citoquina nos debería estimular a estudiar persistentemente el hecho de que se la está induciendo a elevarse, y eso nos llevaría a la causa <sup>372</sup>.

La comprensión de la supervivencia o muerte celular se relaciona con la regulación molecular que ejerce una familia multigénica, cuyos miembros incluyen inhibidores de la apoptosis o aceleradores de la apoptosis <sup>372</sup>. Si el proceso de reparación no se ha producido o bien se ha cumplido, el proceso de muerte celular podría comenzar. Un ejemplo de ello es la hipoxia, donde, por un lado, la presencia de radicales libres derivados del oxígeno y, por otro lado, la modulación de factores de crecimiento, vasodilatadores y otras citoquinas regularían el equilibrio entre factores apoptóticos frente a antiapoptóticos, con los que finalmente se produciría el fracaso o el mantenimiento de la vida celular <sup>387</sup>.

Muchos factores claves del crecimiento celular epitelial renal son conocidos por su papel en la regeneración renal después de la lesión por IR. Además, se ha demostrado que existe una relación entre la supervivencia celular promocionada por tales genes y la regeneración del epitelio tubular dañado por medio de la actuación de factores de crecimiento renal específicos, cuya expresión puede haber sido facilitada por poblaciones celulares protegidas por estos genes antiapoptóticos <sup>371</sup>. En estos casos, el TGF- $\beta$ 1 se expresó con intensidad baja o moderada en la nefrona distal, así como con bajos niveles en el túbulo contorneado proximal. La expresión del TGF- $\beta$ 1 no estaba correlacionada con la expresión del gen Bcl-2 (gen antiapoptótico), pero sí estaba sobrecontrolada (*up-regulated*) por el epitelio



tubular contornado proximal (PCT) en regeneración y por el epitelio de la parte descendente de henle (PST) durante la reparación después de la lesión isquémica<sup>371</sup>.

En la presente tesis se demostró que las variaciones en la expresión del TGF-beta1 están relacionadas con las fases del estudio (intra-sujetos), y no se relacionan con los grupos de isquemia caliente progresiva, analizados por separado o con el grupo de control (inter-sujetos). Se dio una mayor expresión del TGF-beta1 al quinto día, en los cuatro grupos en general. Este hecho demostró que la sobreexpresión del TGF-beta está asociada con las fases del estudio (B, IF, IR, 5D), y que la isquemia caliente progresiva no redundó en una expresión distinta de la citoquina. **No se pudo atribuir a la isquemia caliente la mayor expresión del TGF-beta. Así, la producción de la citoquina se debe a un mecanismo de “todo o nada”, en respuesta a lesión isquémica** en la que se produjo la citoquina independientemente de la intensidad de la agresión isquémica. Lo que se observó representaría una respuesta fisiológica uniforme a todo suceso isquémico. Aunque no se pueda descartar que el aparato celular responsable de la respuesta se hubiera dañado con la isquemia caliente, debido a que el grado de lesión sea tan importante que la respuesta que se observó fuera debida a la producción de TGF-beta1 tan poco por parte de las poblaciones celulares que sobrevivieron al suceso isquémico.

Es evidente que la explicación debe buscarse en los mecanismos de conservación/depredación del DNA y RNA celular. En presencia de isquemia caliente, la degradación celular y, por tanto, la muerte celular puede ser mayor, de modo que disminuiría el número de células capaces de regenerarse correctamente, o disminuiría la respuesta de las existentes. En la isquemia fría, estos procesos están preservados.

Sin embargo, el hecho de que la expresión del gen empleado como *housekeeping*, el 18S, fue constante durante todo el estudio en cada sujeto, entre grupos y en la evolución del estudio iría en contra de esta hipótesis. En conclusión el análisis estadístico de los diferentes grupos según el tiempo de isquemia caliente concluyó en la **no** significación de esta variable en la

expresión del TGF-beta1, muy probablemente debido a un mecanismo de producción de TGF-beta1 con respuesta do tipo “todo o nada”.

**En las variaciones del flujo arterial**, se sabe que la habilidad de los vasos sanguíneos para responder a los cambios en el flujo y presión sanguínea por modificaciones del tono del músculo liso vascular fue apreciado por primera vez por *Bayliss* hace casi cien años <sup>270</sup>.

Nuestro grupo de investigación, en un estudio previo, demostró que las variaciones de los niveles de las sustancias vasoactivas, observadas entre las fases Basal e IR, influyen en las modificaciones que experimenta el flujo de la arteria renal en las mismas fases <sup>139</sup>. En este estudio se pudo comprobar que la isquemia caliente produjo un descenso del flujo renal arterial y venoso, así como que los órganos viables tuvieron valores de flujo significativamente mayores que los no viables <sup>139</sup>.

Antes de analizar las sustancias vasoactivas se procedió al estudio del flujo renal arterial y venoso. Después se averiguó si existía relación entre éste y el resto de las variables analizadas, en especial con la expresión del TGF-beta1.

Las diferencias observadas en el comportamiento **del flujo arterial** se atribuyeron a las fases estudiadas, ya que no se demostraron cambios según los grupos de isquemia progresiva estudiados, así como tampoco interacción fase-isquemia. A pesar de que esperábamos que existiera lugar un flujo menor a medida que se incrementara la isquemia caliente, la variable se comportó con mucha dispersión estadística en relación con los valores encontrados (el valor mínimo del flujo arterial para un órgano viable fue de 24,07ml/seg, valor que estuvo muy cerca del valor mínimo para un no viable: 19,78ml/seg), con lo que se determinó una desviación estándar demasiado grande para que fuera posible una solidez estadística en afirmarse algo tan contundente. No obstante, se observó que era posible establecer un modelo pronóstico de

viabilidad con un valor predictivo positivo de un 95%, que involucró a la vez la ET-1, el ADP y el flujo arterial, tomados en la fase de IR <sup>139</sup>.

**En cuanto a las sustancias vasoactivas**, se sabe desde hace veinte años que el endotelio vascular, mediante la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas, juega un papel crítico en la regulación de la hemodinámica circulatoria. Este concepto fue planteado por primera vez por *Bunting y Moncada en 1976*.

El endotelio vascular produce numerosas sustancias, de entre las cuales nos detendremos en: ET-1 y NO; así como a consecuencia de la producción de RLO se liberan otras sustancias vasoactivas como: TXB<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Es conocido que de estas sustancias no actúan de forma individual, en las variaciones del flujo renal, que ocurre en el síndrome de isquemia-reperusión, sino que es el conjunto de todas ellas y las interacciones entre sí <sup>139</sup>. Estas sustancias tienen propiedades vasoactivas y pueden influir sobre el endotelio. La ET-1 y TXB<sub>2</sub> son vasoconstrictores, mientras que NO y PGI<sub>2</sub> son vasodilatadores. Por tanto, es muy probable que las variaciones en los niveles de estas sustancias afecten decisivamente al flujo renal (sus resistencias vasculares) y, por consiguiente, a la viabilidad del órgano. Se analizó tanto por separado como en conjunto el efecto de las sustancias vasoactivas.

Sobre la relación entre las sustancias vasoactivas y el TGF- $\beta$  hay estudios recientes que demuestran que el TGF- $\beta$ 1 aumenta la producción de endotelina-1 (ET-1) <sup>388</sup> e inhibe la producción del óxido nítrico (NO) por la célula endotelial <sup>389</sup>. El TGF- $\beta$ 1 juega un papel importante en el desarrollo y en la progresión de la lesión renal crónica. Este efecto deletéreo es producido por el TGF- $\beta$ 1 y por la ET-1 actuando de forma conjunta, con un mecanismo sinérgico de acción que, a su vez, acelera la fibrosis y el fallo renal <sup>245,390</sup>. Todavía no está aclarado de forma satisfactoria el papel que juegan el TGF- $\beta$ 1 y las sustancias vasoactivas en los momentos inmediatamente anteriores y posteriores a la lesión por isquemia-reperusión.

Productos celulares, que aparecen a lo largo del tiempo después de la isquemia inicial y que estaban asociados a los cambios debidos a la insuficiencia renal crónica anterior, también son reducidos. La endotelina, por ejemplo, disminuye el flujo sanguíneo renal por medio del incremento de la resistencia vascular renal <sup>391</sup>. Demostrado en los monocitos humanos por técnicas de inmunohistoquímica y análisis *Northern* <sup>392</sup>, la endotelina-1, un producto inductor de la fibrosis, estimula la producción de IL-6 por parte de los monocitos humanos <sup>393</sup>. El TGF- $\beta$ , también asociado con la fibrosis, experimenta gradualmente un aumento de expresión después de la isquemia fría inicial. Y también se logró conseguir una menor expresión del TGF- $\beta$  después de la misma isquemia fría inicial, cuando el órgano era tratado previamente a la extracción con la forma soluble de la glicoproteína P-selectiva ligante-1 (sPSGL) <sup>373</sup>.

Así, **para el caso de la endotelina-1**, en nuestro estudio se confirmaron los datos ya descritos en la literatura, que reflejan su comportamiento fisiológico. Por lo tanto, se confirmó la relación según la cual **a mayor isquemia caliente, mayor liberación de endotelina-1**. Se observó que era posible establecer un modelo pronóstico de viabilidad con un valor predictivo positivo de un 95%, que incluyó a la vez la ET-1, el ADP y el flujo arterial tomados en la fase IR. Además, y a pesar de lo que se ha publicado sobre la ET-1, no se pudo demostrar ninguna otra correlación efectiva y eficaz entre ella y cualquiera de las otras variables estudiadas.

Se sabe que periodos severos de isquemia tales como 30-90 minutos, seguidos de la reperusión llevan a distintos grados de lesión de los tejidos. La lesión de isquemia-reperusión ya está bien descrita en el caso del riñón. Generalmente, después del inicio de la reperusión, tiene lugar una disfunción endotelial del lecho vascular isquémico <sup>394</sup>, seguida por una importante adherencia de neutrófilos al endotelio y su eventual migración hacia los tejidos del entorno vascular. La disfunción endotelial inicial parece ser debida a la formación de radicales libres por parte del endotelio <sup>395</sup>. El incremento de los radicales superóxidos se opone a los factores relajantes endoteliales NO y Prostaciclina. Este bloqueo presupone un importante suceso patológico que sensibiliza el endotelio para una subsiguiente invasión neutrofílica <sup>395</sup>.

A pesar de que el TAX<sub>2</sub> se haya correlacionado con otras sustancias vasoactivas, este hecho se atribuye apenas a sus características fisiológicas, y no a una interrelación atribuible al TGF-beta. Esta hipótesis ya fue descartada, porque las variaciones en la expresión del TAX<sub>2</sub> no están relacionadas con las fases del estudio ni con el grupo de control y los grupos de isquemia caliente progresiva analizados conjuntamente. **El TAX<sub>2</sub> no presentó ningún cambio en el estudio.**

Así, para el caso de la **prostaciclina** se confirmaron los datos también ya descritos en la literatura, que reflejó su comportamiento fisiológico. Por lo tanto, se confirmó también la misma relación descrita arriba: a mayor isquemia caliente, mayor liberación de prostaciclina. Este suceso se debió a un proceso de *biofeedback* positivo con respecto a la liberación de la ET-1 por el endotelio vascular. También se constató que en la ausencia de isquemia caliente, la prostaciclina mantiene un comportamiento plano y constante.

El efecto de la modulación del **óxido nítrico** (NO) y la expresión del TGF-β1 y de las proteínas de la matriz en la nefrotoxicidad crónica por CsA se pueden ver agravados por el bloqueo del NO y mejorados por el aumento del mismo, lo que sugiere que el NO mantiene una función protectora. Así, la modulación del NO está asociada con un cambio en la expresión del TGF-β1, que, a su vez, está asociado con las alteraciones de depósito y degradación de la matriz<sup>383</sup>.

En este estudio se demostró que las variaciones en la determinación del NO estaban apenas relacionadas con las fases del estudio y sólo con ellas. No hubo ninguna variación estadísticamente significativa en relación con los grupos de estudio (control y los de isquemia caliente progresiva). **De este modo, el cambio sufrido por la variable NO se atribuyó a las sucesivas fases del experimento. Se presentaron dos picos de expresión del NO, uno en la fase de IC y otro al quinto día (5D), tanto para el grupo control como en los grupos de isquemia caliente progresiva**

**Este estudio demostró que hubo una relación inversa entre las sustancias vasoactivas y el TGF- $\beta$ , o sea, tras la fase de isquemia-caliente (IC) subieron la ET-1, el TAX<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub>, bajó el NO y no se alteró la expresión de la citoquina. Mientras que al quinto día no se alteraron la ET-1, el TAX<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub>, pero subieron el NO y el TGF-beta1.**

El óxido nítrico es un potente vasodilatador que inhibe la adherencia leucocitaria y la agregación plaquetar. Durante la lesión por isquemia-reperfusión juega un papel importante manteniendo el flujo sanguíneo renal durante la recuperación del daño isquémico. Así, se comprobó lo que se esperaba que ocurriera en la fase de IC y también al quinto día (5D) del estudio, los dos picos de expresión observados. La isquemia caliente daña la producción basal de NO. Con la perfusión se recupera la capacidad de síntesis de NO. El NO tiene un efecto beneficioso sobre la viabilidad del órgano; tiene un papel citoprotector durante la isquemia-reperfusión. Para finalizar, se logró encontrar fuertes e interesantes correlaciones entre el NO y el ADP, el NO y la CE, y el NO y el ATP. Significó que la expresión del NO está relacionada con la integridad del aparato energético celular o viceversa.

**En resumen, también se podría afirmar que son las variaciones que experimentan los niveles de ET-1, TXB<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y NO provocadas por el daño de isquemia-reperfusión las que explican el grado de disminución del flujo arterial tras perfusión.**

**En el estado energético**, se ha realizado un análisis del metabolismo de los nucleótidos de alta energía, calculando los niveles de adeninucleótidos y sus productos de degradación mediante HPLC. Al igual que en otros estudios experimentales <sup>266-268,271,273,397-399</sup>, en este trabajo se comprobó que el estado energético renal es uno de los parámetros afectados como consecuencia del daño por isquemia-reperfusión en el trasplante. La carga energética representa el balance entre energía consumida y generada. Sin embargo, el total de adeninnucleótidos (ADN) representa la capacidad potencial del órgano para generar ATP

Todos los riñones no viables presentaron niveles menores de CE, ATP, ADP y AMP a lo largo del estudio en todas las fases analizadas; estas diferencias resultan significativas estadísticamente. **Por lo tanto, se deduce que, en lo que a la carga energética se refiere, no es la isquemia caliente en sí ni su duración lo que influye, ya que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de isquemia caliente. Se puede imputar a la isquemia fría esta responsabilidad o a otros factores todavía no aclarados por este estudio.**

Así, se demostró que las variaciones en la **carga energética** estaban relacionadas con las fases del estudio, y que también se relacionaban con todos los grupos de isquemia a la vez (control e isquemias progresivas). Hubo una mayor expresión de la carga energética al quinto día en general. Las diferencias de expresión también se pudieron atribuir a todos los grupos de isquemia caliente, ya que los grupos se comportaron de manera muy uniforme.

Se demostró que las variaciones en la determinación del **ATP** estaban relacionadas con las fases del estudio. No hubo ninguna variación estadísticamente significativa en relación con los grupos de control y los de isquemia caliente progresiva. De este modo, el cambio sufrido por la variable ATP se atribuyó a las fases del experimento.

También se demostró que las variaciones en la determinación del **ADP** estaban relacionadas con las fases del estudio. No hubo ninguna variación estadísticamente significativa en relación con los grupos control y los de isquemia caliente progresiva. Así, el cambio experimentado por la variable ADP apenas se atribuyó a las fases del experimento, ya que cuando se añadió la totalidad de los grupos estudiados no se demostraron cambios significativos.

Con esto se demostró que las variaciones del **AMP** guardaban relación con las fases del estudio, y que también se relacionaban con todos los grupos de isquemia a la vez (control e

isquemias calientes progresivas). Las diferencias en la determinación del AMP, además de las fases, también se pudieron atribuir a todos los grupos de isquemia caliente, ya que los grupos se comportaron de manera muy uniforme.

La valoración de la reserva energética renal consiste en cuantificar la energía acumulada en la célula renal. Varios parámetros reflejan el estado energético del tejido: el nivel de ATP tisular, el nivel del total de nucleótidos de la adenina y la carga energética tisular (CE). El nivel de ATP celular indica el nivel de energía del que dispone el tejido. La CE representa la habilidad de los mecanismos tisulares para producir energía, y esto se relaciona con la función mitocondrial.

**Según todas las vías observadas, se puede afirmar que la carga energética y sus derivados (ATP, ADP y AMP) son variables muy importantes, concomitantes a las variables TGF-beta1 y NO en el análisis de lo que ocurrió y lo que podrá ocurrir con las células renales dañadas por la isquemia/reperfusión. Actualmente no se pueden determinar y comprender exactamente todos los puntos claves de la participación de estas variables, así como el verdadero papel que juegan en este intrincado límite entre la vida y la muerte de la célula dañada por la isquemia. Lo que sin duda quedó claro fue su papel clave en estos eventos, además de la necesidad de estudiar más para aprovechar mejor su importante potencial en los desenlaces fisiológicos del tejido renal en trasplante renal**

#### **Uso potencial de la medición del TGF- $\beta$ 1 en la práctica clínica**

Debido a las reservas sobre medición anteriormente expresadas, en este momento la medición del TGF- $\beta$  tiene una utilidad limitada en la práctica clínica. Resulta prometedor como marcador sustitutivo de CAN, ya que presenta la evidencia preliminar de que correlaciona con los niveles proteínicos de colágeno III seis meses después del trasplante <sup>397</sup> un supuesto



indicador de posteriores disfunciones del injerto <sup>401</sup>. Así pues, es posible que el efecto de los fármacos en el TGF- $\beta$  sea susceptible de predecir el éxito potencial para tratar el CAN.

Recientemente, el grupo de Hutchinson <sup>402</sup> ha demostrado que los polimorfismos en el promotor del gen TGF- $\beta$  inciden sobre la expresión de la citoquina activa y, por consiguiente, pacientes con diferentes genotipos de TGF- $\beta$  tienen diferentes niveles de base de TGF- $\beta$ , así como propensiones muy distintas a desarrollar fibrosis. Con avances en la inmunosupresión, esto puede significar que en el futuro los regímenes se diseñen en función de las características individuales de cada paciente.

Aún existe poca información sobre los efectos de los fármacos en la expresión del TGF- $\beta$ . Ciertos trabajos *in vitro* ya antiguos sugieren que acaso el tacrólimo tenga menos poder como estimulador del TGF- $\beta$  que la ciclosporina <sup>403</sup>, y se están llevando a cabo estudios clínicos para comprobar si este hecho se traduce en un descenso de la fibrosis. El *mofetil microfenolato* es un inmunosupresor que, según ha mostrado el modelo *F344 a Lew* de trasplante renal en ratas, previene tanto el aumento en niveles de TGF- $\beta$  como los cambios morfológicos que suelen darse <sup>404</sup>. Grandes ensayos de su uso han mostrado una prometedora reducción en los índices de rechazo agudo <sup>405</sup>, pero es demasiado pronto para hacer ningún comentario sobre el posterior funcionamiento del implante <sup>405</sup>. Pruebas iniciales que introducen *mofetil microfenolato* en pacientes con CAN establecido han mostrado cierta mejora en la función renal <sup>406,407</sup>, y en una de dichas pruebas se llegó a demostrar un descenso en los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$  <sup>408</sup>. Es posible que los inhibidores de enzima convertidores en angiotensina tengan un efecto para reducir el CAN. Aunque han sido estudiados extensivamente en gran número de enfermedades renales crónicas, existe una sorprendente carencia de datos sobre sus efectos sobre el trasplante renal, de modo que sólo se ha informado de dos pequeñas pruebas incontroladas <sup>409,410</sup>. Un estudio reciente usó el *losartan* antagonista del receptor de angiotensina II en catorce pacientes con CAN, con cuyo uso se dio una reducción en los niveles plasmáticos del TGF- $\beta$  <sup>411</sup>, pero no se midieron los niveles tisulares, y no se produjo correlación alguna con el resultado funcional.

### **Manipulación directa de la señalización del TGF- $\beta$ 1: posibles terapias experimentales**

Durante los últimos años, los mecanismos de activación y señalización del TGF- $\beta$  en la célula han sido definidos con gran detalle, razón por la cual se han propuesto varias terapias potenciales novedosas anti-TGF- $\beta$  que interrumpen esta vía en algún momento. Los estudios iniciales se centraron en antagonizar su acción con anticuerpos<sup>412,413</sup>, o con LAP soluble<sup>414</sup>. Estas estrategias son efectivas para prevenir la fibrosis, pero el problema es que el TGF- $\beta$  es una molécula multifuncional, y los efectos que causan su inhibición en otros tejidos aún no son plenamente conocidos. Dado que el TGF- $\beta$  juega un papel en muchos procesos fisiológicos, probablemente sea preciso un enfoque más específico. Se ha sugerido, por ejemplo, que los dos grupos receptores de TGF- $\beta$  implicados en la transducción de señales pueden tener funciones diferentes y que el receptor de tipo I es el más importante en la deposición de MEC<sup>415</sup>, lo cual significa que los antagonistas selectivos se desarrollarán terapéuticamente en el futuro. En fechas recientes se ha afirmado que el factor de crecimiento tisular conectivo (CTGF) es mediador de las acciones del TGF- $\beta$  en la fibrosis<sup>416</sup>. Se ha dicho que éste sólo actúa sobre células tisulares conectivas, y no sobre células epiteliales o inmunes. Si esta teoría se confirmara en futuros estudios, el desarrollo de los agentes inhibidores de la producción o acción de CTGF podría llegar a ser una terapia novedosa y fascinante. Otra posible meta de intervención terapéutica son las glicoproteínas locales de la matriz. Se ha comprobado que una de ellas, en concreto la trombospondina 1, se encuentra aumentada en trasplantes de riñón en humanos que experimentan rechazo crónico<sup>417</sup>, y ello parece ser importante en la liberación del TGF- $\beta$  fuera del LAP. En un estudio de fibrosis túbulo-intersticial en ratas, la expresión de la trombospondina 1 se asoció con un aumento del TGF- $\beta$  libre y un descenso del TGF- $\beta$  vinculado al LAP, así como a una creciente fibrosis<sup>210</sup>. En células mesangiales cultivadas, la trombospondina aumenta los niveles de TGF- $\beta$  y los de fibronectina<sup>418</sup>. Como ya dijimos, otra glicoproteína, la decorina, es un inhibidor natural de la actividad del TGF- $\beta$  sobre el tejido conectivo, y un modelo en ratas ha demostrado que previene la fibrosis

renal<sup>419</sup>. Se demostró que la expresión del TGF- $\beta$ 1 ocurre también en función del tiempo transcurrido después de una lesión aguda isquémica y, además, se comprobó que dicha elevación de la expresión del TGF- $\beta$ 1 ya existe a partir de las 12 postisquemia, y que persiste durante más de catorce días<sup>420</sup>. El aumento de la expresión del factor de crecimiento ocurre de forma predominante en el epitelio tubular en regeneración o en la médula exterior. Además, el TGF- $\beta$ 1 endógeno puede actuar como un factor en la restauración de estructura tubular renal proximal después de una lesión isquémica<sup>420</sup>.

No cabe duda de que el TGF- $\beta$  desempeña un importante papel en el desarrollo de CAN. Sin embargo, como sucede con tantos marcadores putativos de enfermedad, aún se está muy lejos de comprender plenamente su función, pues ésta se ve afectada por una gran cantidad de factores, y tiene una gama muy amplia de acciones. A medida que se defina con mayor precisión el papel que juega en la fibrosis, y acaso con el descubrimiento de diferencias específicas desde el punto de vista isoformico o de nuevos mediadores en sus acciones, es posible que el TGF- $\beta$  acabe siendo un útil marcador de diagnóstico y, quizá en última instancia, una potencial meta farmacológica. **Aunque existan aplastantes evidencias que sugieran que el TGF- $\beta$ 1 juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad renal, el papel fisiológico que juega el TGF- $\beta$ 1 en el riñón no está todavía adecuadamente elucidado. El TGF- $\beta$ 1 también tiene una importante participación en la regeneración del tejido renal dañado, además de que contribuye a la reparación y el mantenimiento de la estructura y función tubular.**

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. La expresión del TGF-beta1 no varió de forma significativa en las fases iniciales de la extracción y trasplante renal. No aumentó ni después de la isquemia caliente, ni tras la reperfusión inmediata.
2. Los niveles del TGF-beta1 mRNA aumentan significativamente en el postoperatorio inmediato del trasplante renal (5D) en todos los grupos estudiados. Estos resultados sugieren que la isquemia fría “per se” aumenta la expresión del TGF-beta1.
3. La terapia inmunosupresora con CsA o Aza no condicionó variaciones en los niveles de expresión del TGF-beta1, durante la lesión por isquemia-reperfusión.
4. Tiempos progresivos de isquemia caliente no indujeron mayores niveles del TGF-beta1 mRNA. Sin embargo, la presencia de isquemia caliente determinó un mayor nivel de expresión de TGF-beta1 mRNA respecto a los riñones con tan solo isquemia fría.
5. Los niveles del TGF-beta1 mRNA no se correlacionaron con el grado de lesión histológica al quinto día.
6. En los riñones con necrosis cortical NC no se detectó TGF-beta1 mRNA ni 18S mRNA. Estos datos validan el criterio histológico de *no viabilidad* utilizado en la tesis: presencia de necrosis cortical.

7. Durante la lesión por Isquemia-reperfusión se produce una disminución del flujo arterial. Analizado como factor pronóstico de viabilidad asociado a la variable TGF-beta1 mRNA no aportó ningún valor predictivo.
8. La isquemia caliente disminuye la producción de NO, que se mantiene en niveles bajos durante la reperfusión, para posteriormente aumentar durante el postoperatorio del trasplante. Existe una correlación directa entre viabilidad y producción de NO en el postoperatorio El NO tiene un efecto beneficioso sobre la viabilidad del órgano durante la isquemia-reperfusión.
9. El resto de sustancias vasoactivas estudiadas: ET-1, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> aumentaron tras la isquemia caliente, para permanecer estables tras la reperfusión en el postoperatorio inmediato del trasplante. Analizados de forma aislada no mostraron utilidad pronostica para determinar viabilidad.
10. La carga energética (CE) disminuye durante la isquemia para recuperarse durante la reperfusión y seguir aumentando en el postoperatorio inmediato. ¿Este aumento de la CE durante la reperfusión fue mayor en los riñones viables respecto a los no viables?
11. Se encontró una correlación entre los niveles de expresión del TGF-beta1 mRNA y los niveles séricos de NO y tisulares de ATP al quinto día (5D). Dicha correlación es directa entre TGF-beta1 y NO e inversa entre TGF-beta1 y ATP.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Cecka JM, Cho YW, Terazaki PI. Analysis of the UNOS Scientific Renal Transplant registry at three years – Early events affecting transplant success. *Transplantation* 1992; 53: 59-64.
2. Nahas WC. Transplante renal com doador cadáver: relação de aspectos do doador, do receptor e do ato cirúrgico com a evolução do doente. São Paulo, 1993 (*Tese doutorado – FMUSP*).
3. Suthanthiran M, Storm TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 365-374.
4. Küss R, Bourget P. Una historia ilustrada del trasplante de órganos. *La gran aventura del siglo*. 1992. Laboratoires Sandoz.
5. Talbot-Wright, Carretero P. *Manual de cirugía del trasplante renal*. 1995. Pag: 1-17. Editorial médica Panamericana.
6. Montañés P, Sánchez E, Torrubia FJ. Historia del trasplante renal. Tema monográfico del LVII Congreso Nacional de Urología: *Complicaciones quirúrgicas del trasplante renal*. Capítulo 1, pag 25- 27.
7. Kahan BD. Ganesha. The primeval Hindu xenograft. *Transplant Proc* 1989; 21(suppl 1):1.
8. Kahan BD. Cosmas and Damian revisited. *Transplant Proc* 1983; 15 (suppl 1):2211.
9. Da Voragina J. *Leggenda aurea* (Italian edition, Cecilia Lisi, translator). Florence: 1952 Ed. Fiorentina. 648.
10. Shackman R. The story of kidney transplantation. *Br Med J* 1966; 38: 1379..



11. Ullman E. Experimentelle Nierentransplantation. *Wien Klin Wochenschr* 1902; 15:281.
12. Ullman E. Tissue and organ transplantation. *Ann Surg* 1914; 60:195.
13. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et transplantation des viscères. *Lyon Med* 1902; 98: 859.
14. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation: report of 9 cases. *J Clin Invest* 1955; 34: 327.
15. Carrel A, Guthrie C. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. *JAMA* 1906; 47:1648.
16. Carrel A, Guthrie C. L'anastomose des vaisseaux sanguins par la méthode du patching dans les transplantations du rein. *C R Soc de Biologie* 1906; 276.
17. Carrel A. Transplantation in mass of the kidneys. *Journ of Experim Med* 1908; 98.
18. Converse JM, Casson PR. Introduction to human transplantation. In: Rappaport FT and Dausset J. *Human Transplantation* 1968, Ed. Grune/Stratton, página 3.
19. Floresco N. Recherches sur la transplantation du rein. *J Physiol Path Gen* 1905; 7: 47.
20. Parkinson D, Woodworth HC. Observations on vessel and organ transplants. *Exper Med Surg* 1947; 5: 49.
21. Oudot J. Transplantation rénale. *Presse Méd* 1948; 56: 319.

- 
22. Lefebvre L. Transplantation prolongée de reins au cou. *Arch Internat Physiol* 1949; 57:110.
23. Simonsen M. Biological incompatibility in kidney transplantation in dogs. Serological investigations. *Acta Path et Microbiol Scandinav* 1953; 32: 36.
24. Dempster WJ. Kidney homotransplantation. *Br J Surg* 1953; 40: 447.
25. Küss R, Poisson J. Transplantation renale. *Encyclopedie Medico-Chirurgicale* 1973; Paris, 18067, D (20)-2.
26. Kolff WJ, Berk H. The artificial kidney, a dialyser with a great area. *Acta Med Scand* 1944; 117-121.
27. Lawler RH, West JW, McNulty PH, Clancy EJ, Murphy RP. Homotransplantation of the kidney in the human. A preliminary report. *JAMA* 1950; 144: 844.
28. Lawler RH, West JW, McNulty PH, Clancy EJ, Murphy RP. Homotransplantation of the kidney in the human. Supplemental report of a case. *JAMA* 1951;147:45.
29. Küss R, Teinturier J, Milliez P. Quelques essais de greffe rein chez l'homme. *Mem Acad Chir* 1951;77:755.
30. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation: report of 9 cases. *J Clin Invest* 1955;34:327.
31. Michon L, Hamburger J, Oeconomos N, Delinotte G, Richet G, et al. Une tentative de transplantation rénale chez l'homme. Aspects médicaux et biologiques. *Presse Med* 1953;61:1419.

- 
32. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 1955;6:432.
33. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild W. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA*. 1956;160:277.
34. Brower PA, Harrison JH, Landes RR. Renal transplantation History. *Supp Urology* 1977;1:5.
35. Murray JE. Reflections on the First Successful Kidney Transplantation. *World J Surg* 1982;6:372.
36. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy JB Jr. Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins. *N Engl J Med* 1960;262:1251.
37. Murray JE, Harrison JH. Surgical management of fifty patients with kidney transplants including eighteen pairs of twins. *Amer J Surg* 1963;105:205.
38. Küss R, Legrain M, Mathey G, Nedey R. Epilogue d'une homo transplantation rénale de soeur à frère non jumeaux. *Presse Médicale* 1960;40:1473.
39. Küss R, Legrain M, Mathey G, Camey M. Étude de 4 cas d'irradiation totale per le cobalt radiactif préalable à une transplantation rénale allogénique. *Revue Française d'études Cliniques et Biologiques* 1962;7:1028.
40. Gil-Vernet JM, Caralps A, Ruano D. New approach to the splenic vessels. *J Urol* 1978;119:313.

- 
41. Miranda B, Fernández G, Felipe C, et al. Centros de trasplante renal. Análisis comparativo de actividades y coberturas. *Nefrología* 1999;19:111-123..
  42. Resel Estevez L. Estado actual del trasplante renal. *Clínicas Urológicas de la Complutense* 1999;7. Editora Universidad Complutense.
  43. Jacobbi L, McBride V, Etheredge E, et al. The risk, benefits and costs of expanding donor criteria. A collaborative prospective three-years study. *Transplantation* 1995; 60: 1491-1496
  44. Alexander J, Vaughn W, Carey M. The use of marginal donors for organ transplantation: The older and younger donors. *Transplant Proc* 1991; 23: 905-909
  45. Grande L, González F, Manlerola C, García-Valdecas, et al. Does donor age exclude liver grafting? *Transplant Proc* 1993; 25: 3153-3155.
  46. Vroemen JPAM, Van der Vliet JA, and Kootstra G. The emergence in-situ preservation of kidneys for transplantation. *Neth J Surg* 1983; 35: 50-60
  47. Kootstra G, Wijnen R, Van Hooff JP, and Van der Linden CJ. Twenty percent more kidneys though a non-heart-beating program. *Transplant Proc* 1991; 23: 910-911
  48. Statements and Recommendations on Non Heart-Beating Donors. *ETCO-Newsletter* November, 1995; 13 (2)
  49. Kootstra G, Daemen JHC, and Oomen APA. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 2893-2894

- 
50. Organización Nacional de Trasplantes. *Documento de Consenso Español* Donación de órganos a corazón parado. Noviembre 1995
51. Casavilla A, Ramírez R, Shapiro R, et al. Liver and kidney transplantation from non-heart-beating donors: The Pittsburgh Experience. *Transplant Proc* 1995; 27: 710-712
52. D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59: 977-982
53. D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. A controlled non-heart-beating donors: A potencial source of extrarenal organs. *Transplant Proc* 1995; 27: 707-709
54. Booster MH, Wijnen RMH, Ming Y, et al. In situ perfusion of kidneys from non-heart-beating donors: The Maastricht Protocol . *Transplant Proc* 1993; 25: 1503-1504
55. Kozaki M, Matsuno N, Tamaki T, et al. Procurement of kidney grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1991; 23:2575-2578
56. Rigotti P, Morpurgo E, Comandella MG, et al. Non- Heart Beating donors: an alternative organ source in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 2579-2580
57. García-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, et al. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation: Laboratory observations and clinical application. *Ann Surg* 1975, 182 (5): 576-584
58. Garvin PJ, Buttorff JD, Morgan R, et al. In situ cold perfusion of kidneys for transplantation. *Arch Surg* 1980; 115: 180-182

- 
59. Schweizer RT, Sutphin BA, Bartus SA. In situ cadaver kidney perfusion. *Transplantation* 1981; 32 (6): 482-484
60. Fujita T, Matsui M, Yanaoka M, Shinoda M, and Nadie Y. Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors. *Transplant Proc* 1989; 21: 1215-1217
61. Ruers TJM, Vroemen JPAM, Kootstra G. Non-heart-beating donors: A successful contribution to organ procurement. *Transplant Proc* 1986; 18; 408-410
62. Kootstra G, Ruers TJM and Vroemen JPAM. Non-Heart Beating donors: contribution to the shortage. *Transplant Proc* 1986; 18 (5): 1410-1412
63. Banowsky LH, Sullivan M, Moorehouse J, et al. In mortuo renal perfusion for cadaver kidney preservation. *Investigative Urology* 1971; 9: 199-205
64. Booster MH, Wijnen RMH, Vroemen JPAM, Van Hooff JP and Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors. A proposal for a standardized protocol. *Transplantation* 1993; 56: 613-617
65. Vromen MAM, Leunissen KML, Persijn GG, and Kootstra G. Short and long-term results with adult non-heart beating donor kidneys. *Transplant Proc* 1988; 20: 743-745
66. Wijnen RMH, Booster MH, Stubenitsky BM, et al. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet* 1995; 345: 1067-1070
67. Kootstra G. The asystolic, or non-heart-beating donors. *Transplantation* 1997; 63: 917-921

- 
68. Rowinski W, Walaszewski J, Lagiewska B, and Pacholczyk M. Use of kidneys from marginal and non-heart-beating donors: warm ischemia per se is not the most detrimental factor. *Transplant Proc* 1993; 25: 1511-1512
69. Morpurgo E, Rigotti P and Ancona E. Is warm ischemia the main limiting factor in the use of non-heart-beating donors in renal transplantation?. *Transplant Proc* 1993; 25: 1509-1510
70. Guillard G, Tat P, Haas O, et al. Renal harvesting after in situ cooling by intra-aortic double-balloon catheter. *Transplant Proc* 1993, 25: 1505-1506
71. Rosental R, Strokan V, Bitsans J, et al. Kidney harvesting from non-heart-beating donors: a surgical approach. *Transplant Proc* 1991; 23: 2588
72. Sakagami K, Takasu S, Kawamura T, et al. A comparison of university of wisconsin and euro-collins' solutions for simple cold storage in non-heart- beating cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 824-826
73. Southard JH, Van Gulik TM, Ametani MS, et al. Important components of the UW Solution. *Transplantation* 1990; 49: 251-257
74. Alshaibani K, Nizamuddin N, Raza S, et al. University of Wisconsin versus Eurocollins solution for kidney preservation: Analysis of clinical outcome. *Transplant Proc* 1998; 30: 3681-3682
75. Schlumpf R, Candinas D, Zollinger A, et al. Kidney procurement from non-heart-beating donors: transplantation results. *Transplant Int* 1992, 5 (suppl 1): 5424-5428
76. Colpart JJ, Bret M, Tognet E, et al. Viabilité à un an des greffons rénaux prélevés après arrêt cardiaque irréversible. *ETCO Newsletter* 1991; 9: 5-11

- 
77. Castelao AM, Griñó JM, González C, et al. Update of our experience in long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1993; 25: 1513-1515
78. Alonso A, Buitron JG, Gómez M, et al. Short and long-term results with kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1997; 29:1378-1380
79. Kinukawa T, Ohshima S, Fujita, et al. Exploration of the system for cadaver kidney transplantation with the non-heart-beating donor: efficacy of in situ cooling and low-dose cyclosporine. *Transplant Proc* 1993, 25: 1524-1526
80. Koffmann CG, Bewick M, Chang RWS, et al. Comparative study of systolic and asystolic kidney donors between 1988 and 1991. *Transplant Proc* 1993, 25: 1527-1529
81. Valdés F, Pita S, Alonso A, et al. Comparative study of the use of systolic and asystolic kidney donors between 1981-1995 in La Coruña, Spain. *Transplant Proc* 1997; 29: 3565-3566
82. Hattori R, Kinukawa T, Ohshima S, et al. Outcome of kidney transplantation from non-heart-beating donors: Comparison with heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992; 24: 1455-1456
83. Jhonson HK, Skelley L, Warner H, et al. Results following use of the García- Lefrak double ballon catheter. *Transplant Proc* 1984; 16:122-125
84. Heineman E, Daemen J.H.C, and Kootstra G. Non-heart-beating donors: Methods and techniques. *Transplant Proc* 1995; 27: 2895-2897



- 
85. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant Proc* 1987; 19: 4129-4136
86. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988; 20: 891-894
87. J Lloveras, JM Puig, M Cerdà, et al. Newly developed four lumen catheter for in situ renal perfusion of non-heart-beating donors that provides perfusion pressure monitoring. *Transplant Proc* 1995; 27: 2909-2912
88. Anaise D, Yland MJ, Ishimaru M, et al. Organ procurement from non-heart-beating cadavers donors. *Transplant Proc* 1989; 21: 1211-1214
89. Paprocki S, Kruk R, Erturk, et al. A technique for successful transplantation of organs from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1992; 54: 381-383
90. Henry M.L. Pulsatile preservation in renal transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:3575-3576
91. Matsuno N, Sakurai E, Uchiyama M, et al. Use of in situ cooling and machine perfusion preservation for non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1993; 25: 3095-3096
92. Daemen J.H.C, de Vries B, Oomen A.P.A., et al. Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart-beating donor kidneys early results. *Transplant Int* 1997; 10: 317-322
93. Booster M.H., Wijnen R.M.H., Yin M, et al. Enhanced resistance so the effects of normothermic ischemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc* 1993; 25: 3006-3011

- 
94. Stubenitsky B.M, Ametani M, Danielewicz R., et al. Regeneration of ATP in kidney slices after warm ischemia and hypothermic preservation. *Transplant Int* 1995; 8: 293-297
95. Maessen J.G., Van der Vusse G.J., Vor M, and Kootstra G. New approach to preservation of non-heart-beating donors: Total body cooling. *Transplant Proc* 1987; 19: 4159-4161
96. Baumgartner W.A, Melville G, Fraser C.D, et al. Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. *Transplantation* 1989; 47: 123-127
97. Koyama I, Shinozuka N, Watanabe T, et al. Utilization of kidneys from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1997; 29: 3550-3551
98. Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, et al. Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992; 24: 1327-1328
99. Alvarez J, Del Barrio R, Torrente J, et al. Postransplant long-term outcome of kidneys obtained from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1995; 27: 2903-2905
100. Valero R, Sanchez J, Cabrer C, et al. Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc* 1995; 27: 2899-2900
101. Hoshino T, Maley W.R, Stump K.C, et al. Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 1987; 19: 4123-4128

- 
102. Maessen J.G, Van der Vusse G.J., Vork M, and Kootstra G. The beneficial effect of intermediate normothermic perfusión during cold storage of ischemically injured kidneys. *Transplantation* 1989; 47: 409-414
103. Mayfield KB, Ametani M, Southard J. H, et al. Mechanim of action of ex vivo blood reserve in six-day preserved kidneys. *Transplant Proc* 1987; 19: 1367-1368
104. Gaber O, Yang H.C, Haag B.W, et al. Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys. *Transplant Proc* 1987;19: 1369-1371
105. Arias J, Alvarez J, Gomez M, et al. Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II NHBD. *Transplant Proc* 1997; 29: 3486-3487
106. González X, García-Valdecasas J.C, et al. Adenin nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29: 3480-3481
107. Rijkmans B.G, Buurman W.A, and Kootstra G. Six day canine kidney preservation. *Transplantation* 1984; 37: 130-134
108. García-Valdecasas J.C, Tabet J, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transplant Int* 1998; 11: 424-432
109. Valero R, García-Valdecasas J.C, Tabet J, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pig. *Transplantation* 1998; 66: 170-176.

- 
110. Valero R, García-Valdecasas J.C, Net M, et al. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2000; 70: 730-737.
111. Valero R. Donants d'òrgans a cor parat. Recirculació normotèrmica i refredament corporal amb derivació cardiopulmonar com a mètode d'obtenció d'òrgans. Estudi clínic i experimental. Barcelona, 2000. (*Tesis Doctoral* - Facultat de Medicina de la Universidad de Barcelona).
112. Castela AM, Sabader R, Griñó JM. Et al. Renal function of transplanted kidneys from non-heart-beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1988; 20:841-843.
113. Castela AM, Griñó JM, Gonzalez C, et al. Long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1991; 23:2584-2586.
114. Schlumpf K, Candinas D, Weder W, et al. Acute vascular rejection with hemolytic uremic syndrome in kidneys from non-heart-beating donors: associated with secondary grafts and early cyclosporine treatment. *Transplant Int* 1993; 25:1518-1521.
115. Cho YW, Terazaki PI, Cecka JM, Gjertson DW. Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N Engl J Med* 1988; 338(4):221-225..
116. Daemen JH, de Vries B, Kootstra G. The effect of machine perfusion preservation on early function of non-heart-beating donor kidneys. *Transplant Proc* 1997 Dec;29(8):3489..
117. Gonzalez-Segura C, Castela AM, Torras J, et al. A good alternative to reduce the kidney shortage: kidneys from nonheartbeating donors. *Transplantation* 1998 Jun 15;65(11):1465-70.

- 
118. Light JA, Kowalski AE, Sasaki TM, et al. A rapid organ recovery program for non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1997 Dec;29(8):3553-6.
119. Matsuno N, Sakurai E, Kubota K, et al. Evaluation of the factors related to early graft function in 90 kidney transplants from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1997 Dec;29(8):3569-70.
120. Tanabe K, Oshima T, Tokumoto T, et al. Long-term renal function in on-heart-beating donor kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation* 1998 Dec 27;66(12):1708-13.
121. Wijnen RM, Booster MH, Nieman FH, et al. Retrospective analysis of the outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Transplant Proc* 1995 Oct;27(5):2945-6; discussion 2935-9..
122. Rowinski W, Walaszewski J, Lagiewska B, pacholczyk M. Use of kidneys from marginal and non-heart-beating donors: warm ischemia per se is not the most detrimental factor. *Transplant Proc* 1993; 25: 1511-1512.
123. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988; 20(5):891-894.
124. Wijnen RM, Booster M, Speatgens C, et al. Long-term follow-up of transplanted non-heart-beating donor kidneys: preliminary results of a retrospective study. *Transplant Proc* 1993; 25: 1522-1523.
125. Hoshino T, Maley WR, Bulkey GB, Williams GM. Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for salvage of kidneys taken from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1988; 45(2): 284-289.

- 
126. Matsuno N, Kozaki M, Sakurai E, et al. Effects of combination in situ cooling and machine perfusion preservation on non-heart-beating donor kidney procurement. *Transplant Proc* 1993; 25: 1516-1517.
127. Schlumpf K, Candinas D, Zollinger A, et al. Kidney procurement from non-heart-beating donors: transplantation results. *Transplant Int* 1992; 5 (suppl 1) S424-428.
128. Kinukawa T, Oshima S, Fujita T, Ono I. Exploration of the system for cadaver kidney transplantation with the non-heart-beating donor: efficacy of in situ cooling and low-dose cyclosporine. *Transplant Proc* 1993; 25: 1524-1526.
129. Shirakura R, Kamiike W, Matsumura A, et al. Multiorgan procurement from non-heart-beating donors by use of Osaka University cocktail, Osaka rinse solution, and the portable cardiopulmonary bypass machine. *Transplant Proc* 1993 Dec;25(6):3093-4.
130. Wijnen RM, Booster MH, Stubenitsky BM, de Boer J, Heineman E, Kootstra G. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet* 1995 Apr 29;345(8957):1067-70.
131. Weight S.C, Bell P.R and Nicholson M. L. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Sur* 1996; 83: 162-170
132. Belzer F. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676
133. Belzer F. Principles of organ preservation. *Transplant Proc* 1988; 20: 925-927

- 
134. Mela L. Mitochondrial function in shock, ischemia and hypoxia. In: Couley RA TB ed. *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia*. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1982: 84-94
135. Granger D.N., Rutili G, Mc Cord J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29
136. Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-142
137. Mc Cord J.M. The superoxide free radical: its biochemistry and patophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-414
138. Granger D.N, Mc Cord J.M, Parks D.A, et al. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84
139. Luque P. Trasplante renal experimental en cerdo con donante a corazón parado. Estudio de la lesión por isquemia-reperfusión. Marcadores de viabilidad del injerto. 1999 (*Tesis Doctoral* - Facultat de Medicina de la Universidad de Barcelona).
140. Mc Cord J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 17: 159-162
141. Bulkley G.B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-411

- 
142. Colomer J, Fernández-Cruz L, Sáenz A, et al. Radicales libres de oxígeno y trasplante de órganos. *Rev Quir Esp* 1988; 15: 305-312
143. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Critical Care Medicine* 1988; 16: 947-953
144. Hayaishi O, Shimuzu T. Metabolic and functional significance of prostaglandins in lipid peroxide research. *Lipid peroxides in biology and medicine* pag 41-43. Yagi K ed. Academic Press, London, 1982
145. Green C.J, Healing G, Lunec J, et al. Evidence of free-radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotrasplantation. *Transplantation* 1986; 41: 161-165
146. Hotter G, León S, Roselló-Catafau J, et al. Altered levels of phospholipase A2, lipoperoxidation and arachidonate metabolism in rat pancreas transplantation. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and leukotriene research* 1990; 21: 573- 576
147. Lefer A.M and Lefer D.J. Pharmacology of the endothelium in ischemia- reperfusion and circulatory shock. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90
148. Menger M.D. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia- reperfusion. *Transplant Proc* 1995; 27: 2863-2865
149. Kubes P. and Granger D.N. Role of leukocytes in reperfusion-induced intestinal dysfunction. *DN & P Mayo* 1992; 5(4): 197- 206
150. Fuggle S.V. and Koo D.H. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 763-769



- 
151. Connolly J.K. Guy S.P. and Parrot N.R. Cytokine gene expression and eicosanoid production in renal reperfusion injury. *Transplant Proc* 1995; 27: 2816-2818
152. Beekhuizen H. And Van de Covel J.S. Endothelial cell adhesion molecules in inflammation and postischemic reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30: 4251-4256
153. Finn W.F. Prevention of ischemic injury in renal transplantation. *Kidney Int* 1990; 37: 171-182
154. Franssen C, Defraigne J.O, Detry O., et al. Antioxidant defense and free radical production in a rabbit model of kidney ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 1995; 27: 2880-2883
155. Hoshino T, Maley W, Bulkley G and Melville G. Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1988; 45: 284-289
156. Bosco P.J, Schweizer R.T. Use of oxygen radical scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation. *Arch Sur* 1988; 123: 601-604
157. Rosenberg L, Merion R.M, Campbell D.A, et al. Peripheral blood catalase in patients undergoing renal transplantation. *J Sur Res* 1988; 44: 493-498
158. Rosati R, Stortoni F, Filingeri V, et al. Allopurinol and superoxido dismutase administration in prevention of rat kidney ischemic injury. *Transplant Proc* 1988; 20: 928-930

- 
159. Koyama I, Bulkley G.B, Melville G, et al. The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold- preserved ischemic kidneys. *Transplantation* 1985; 40: 590-595
160. Alcaraz A, López-Boado M.A, Vicens A, Talbot-Wright, et al. Efecto beneficioso de la SOD en la liberación de radicales libres de oxígeno en el trasplante renal experimental. *Act Urol Esp* 1992; 16: 83-87
161. Kurokawa T and Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 1999; 31: 1775-1776
162. Grisham M.B. Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant Proc* 1995; 27: 2842-2843
163. Gaboury J, Woodman R, Granger D.N., et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265: 862-867
164. Salvemini D, Seibert K, Masferrer J., et al. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest* 1994; 93: 1940-1947
165. Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GF: Transforming growth factors: Isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3494-3498..
166. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB: Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3676-3680.

- 
167. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB: Transforming Growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983;258:7155-7160.
168. Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, Sporn MB: Cellular transformation by coordinated actino of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* 1984;309:804-806..
169. Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Wideman J, Blacher R, Pan YC, Stein S, Lehrman SR, Smith JM, Lamb LC, et al: Purification and properties of a transforming growth factor-beta from bovine kidney. *Biochemistry* 1983;22:5692-5698.
170. Hirschberg R: Introduction a Oscar for TGF-beta and Its Perfomance in the Kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:107-110.
171. Frolik CA, Wakefield LM, Smith DM, Sporn MB: Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblast. *J Biol Chem* 1984;259:10995-11000.
172. Massague, J. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6: 597-641.
173. Shimizu, A., and M Yamanaka. Apoptosis and cell desquamation in repair process of isquemic tubular necrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993;64: 171-180.
174. Ribeiro SM, Poczatec M, Shultz-Cherry, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 1992; 274: 13586.

- 
175. Border WA, Noble NA, Yamamoto T et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361.
176. Holmes, H.D., T. Nakamura, D.A. Cieslinski, D. Miller, R.V. Emmons, and W.A. Border. Role of proteoglycans and cytoskeleton in the effects of TGF- $\beta$ 1 on renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 1993;43: 575-584.
177. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Bioche* 1998; 67: 753.
178. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 1998; 95: 737..
179. Gamble JR, Vadas MA. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 1988; 242: 97..
180. Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isemann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol* 1996; 157: 360..
181. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; 334: 260..
182. Ristow HJ. BSC-1growth inhibitor/type beta transforming growth factor is a strong inhibitor of thymocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5531..

- 
183. Andjelic S, Khanna A, Suthanthiran M., Nikolic-Zugic J. Intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation and cyclosporin A synergistically induce TGF-beta 1-mediated apoptosis in lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 2527..
184. Igotz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1987; 262: 6443..
185. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6: 1899.
186. Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J. Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor: pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *J Biol Chem* 1987; 262: 17467.
187. Goes N, Urmson J, Ramassas V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. *Transplantation* 1995; 59: 565-572.
188. Gobe G, Willgoss W, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56:1299-1304.
189. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells of adult and neonatal mice. *J Cell Biol* 1989; 108: 661.
190. Assoian RK, Komoriya A, Meyers C, Miller DM, Sporn MB, Transforming growth factor-beta in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterisation. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155.

- 
191. Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 1994; 93: 892.
192. Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ. Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int* 1998; 53: 302.
193. Haberstroh U, Zahner G, Disser M, Thaiss F, Wolf G, Stahl RA. TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture: role of PDHG beta-receptor expression. *Am J Physiol* 1993; 264: F199.
194. Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 37: 689.
195. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int* 1992; 41: 1213.
196. Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM, Haralson MA. Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am J Pathol* 1992; 140: 45..
197. Isaka Y, Fujjiwara 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* 1994; 92: 2597..
198. Akagi Y, Isaka Y, Arai M et al. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotids suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50: 148.

- 
199. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994; 45: 916.
- Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1814.
200. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidneys of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 1993; 44: 313.
201. Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M, Fujishima M. TGF-beta 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45.
202. Tamaki K, Okuda S, Ando T, Iwamoto T, Nakayama M, Fujishima M. TGF-beta 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45:525.
203. Paul LC: Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1995; 46: 1491.
204. Waltenberger J, Miyazono K, Funak, et al. Transforming growth factor-beta and organ transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 2038.
205. Wolf G. Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 174-180..
206. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal cytokine. *New Phys Sci* 1994; 9: 40-42..

- 
207. Solez K, et al. Report of the third Banff conference on allograft pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996; 28: 441-441.
208. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713..
209. Robertson H, Wong WK, Talbot D, Burt AD, Kirby JA. Tubulitis after renal transplantation: demonstration of an association between CD103+ T cells, TGF- $\beta$ 1 expression and rejection grade. *Transplantation* 2001; 71: 306-313..
210. Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 441..
211. 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* 1996; 50: 1904..
212. Mannon RB, Kopp JB, Ruiz P et al. Chronic rejection of mouse kidney allografts. *Kidney Int* 1000; 55: 1935.
213. Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, Gabbiani G, Sraer JD. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp Nephrol* 1996; 4:241.
214. Muchaeta-Kubara EC, el Nahas AM. Myofibroblast phenotypes expresión in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 904..
215. Pedagogos E, Hewitson TD, Walker RG, Nicholis KM, Becker GJ. Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 1997; 64: 1192..



- 
216. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, et al. Platelet derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 1996; 148: 1169..
217. Futamura A, Izumino K, Nakagawa Y, Takata M, Inoue H, Iida H. Effect of the platelet-derived growth factor antagonist trapidil on mesangial cell proliferation in rats. *Nephron* 1999; 81: 428..
218. Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 638: 1..
219. Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop A, MaCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1999; 67: 929..
220. Gruden G, Thomas S, Burt D, et al. Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 730..
221. Lonnemann G, Shapiro L, Engel-Blum G, Muller GA, Koch K, Dinarello CA: Cytokines in human renal interstitial fibrosis I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. *Kidney Int* 1995; 47: 837..
222. Ruiz-Ortega M, Largo R, Bustos C, Gomez-Garre D, Egido J. Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1266..

- 
223. Matas AJ. Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 1766..
224. Nagano H, Nadeau KC, Takada M, Kusaka M, Tilney NL. Sequential cellular and molecular kinetics in acutely rejecting renal allografts in rats. *Transplantation* 1997; 63: 1101.
225. Opelz G Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998; 53: 217..
226. Kusaka M, Ziai F, Hancock WW, Tilney NL, Mackenzie HS. Systemic hypertension accelerates chronic rejection of renal allografts in the rat. *Transplant Proc* 1999; 57: 1727..
227. Hahn AWA, Resink TJ, Bernhardt J, et al. Stimulation of autocrine platelet-derived growth factor AA-homodimer and TGF-beta in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;178:1451-1458.
228. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. Hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90: 456..
229. Chua CC, Diglio CA, Siu BB, et al. Angiotensin II induces TGF-beta1 production in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1994;1223:141-147.
230. Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, et al. Angiotensin II stimulates the autocrine production of TGF-beta1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2347-2357.

- 
231. Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, et al. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous TGF-beta1. *J Clin Invest* 1993;92:1366-1372.
232. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1990;259:F768-F777.
233. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 2431.
234. Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 1993;3:1531-1540.
235. Maschio G, Alberti D, Janin G, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 1996;334:939-945..
236. Wolf G, Thaiss F, Sthal RAK. Cyclosporine stimulates expresion of TGF-beta in renal cells. *Transplantation* 1995;60:237-241.
237. Sheata M, Cope GH, Johnson TS. Cyclosporine enhances the expression of TGF-beta in the juxtglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int* 1995;48:1487-1496.
238. Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, et al. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracelular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes* 1995;44:895-899..

239. Hoffman BB, Sharma K, Ziyadeh FN: Potential role of TGF- $\beta$  in diabetic nephropathy. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:190-196.
240. Studer RK, Negrete H, Craven PA, DeRuberts FR: Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and TGF- $\beta$  bioactivity in mesangial cells. *Kidney Int* 1995;48:422-430.
241. Perella MA, Jain MK, Lee ME: Role of TGF- $\beta$  in vascular development and vascular reactivity. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 136-143.
242. Perella MA, Paterson C, Tan L, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME. Suppression of interleukin-1 $\beta$ -induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by TGF- $\beta$ 1 in vascular smooth muscle cells: Evidence for mechanisms other than NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 1996; 271: 13776-80
243. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2495-2508.
244. Border WA, Noble NA, Yamamoto T et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992; 360: 361.
245. Campistol JM, Iñigo P, Jimenez W, Lario S, Clesca PH, Oppenheimer F, Rivera F. Losartan decreases plasma levels of TGF- $\beta$ 1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1999; 56: 714-19.
246. Basile DP, Martin DR, Hammerman MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potencial role for TGF-beta in repair. *Am J Physiol* 1998; 44:F894-F903.

- 
247. Guijarro C, Massy ZA, Kasiske BL. Clinic correlation between renal allograft failure and hyperlipidemia. *Kidney Int Suppl* 1995; 52; S56..
248. Eddy AA. Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* 1996; 50: 1139.
249. Ding G, van Goor H, Ricardo SD, Orlowski JM, Diamond JR. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1997; 51: 147..
250. Ziyadeh FN: The Extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1993;22:736-744.
251. Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 1990;259:F704-F714.
252. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- $\beta$ . *Kidney Int* 1992;42:647-656.
253. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of TGF- $\beta$ . *J Clin Invest* 1994;93:536-542.
254. van Det NF, Verhagen NAM, Tamsma JT, Berden JHM, Bruijin JA, Daha MR, van der Woude FJ: Regulation of glomerular cell production of fibronectin and TGF- $\beta$  by high glucose, not by angiotensin II. *Diabetes* 1997;46:834-840.

- 
255. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522.
256. Paul LC. Adverse effects of immunosuppressive drugs on long-term graft outcome. *Transplant Proc* 1998; 64: 190..
257. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Bennett WM. Sodium depletion enhances fibrosis and the expression of TGF-beta 1 and matrix proteins in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 71.
258. Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M. In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta 1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997; 63: 1037.
259. Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD. Transforming growth factor (TGF)-beta mimics and anti-TGF-beta antibody abrogates the in vivo effects of cyclosporine: demonstration of a direct role of TGF-beta in immunosuppression and nephrotoxicity of cyclosporine. *Transplantation* 1999; 67: 882.
260. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andog TF. Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* 1997; 64: 1829.
261. Weight S.C, Bell P.R and Nicholson M. L. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Sur* 1996; 83: 162-170
262. Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 287.

- 
263. Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 1996 10: 1077.
264. Lefer AM. Mechanisms of the protective effects of transforming growth factor-beta in reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1323.
265. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischaemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; 64: 190.
266. Pimentel JL Jr, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A, Martinez-Maldonado M. Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 1233.
267. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997; 51: 1553.
268. Peters H, Border WA, Noble NA. Targeting TGFbeta overexpression in renal disease: maximising the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 1998; 54: 1570.
269. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. Hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; 90: 456.
270. Baez S. Bayliss response in the microcirculation. *Fed Proc.* 1968 Nov-Dec;27(6):1410-5.

271. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998; 31: 181..
272. Watschinger B, Sayegh MH. Endothelin in organ transplantation. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 2130.
273. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 2130.
274. Braun C, Conzelmann T, Vetter S, et al. Prevention of chronic renal allograft rejection in rats with an oral endothelin A receptor antagonist. *Transplantation* 1999; 68: 739.
275. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al. Transforming growth factor beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 1435..
276. Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, et al. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 1996; 27: 885..
277. Vane J.R, Änggård E.E, and Botting R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36
278. Yanisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 323: 411-415
279. Jiménez W, Ros J, Morales-Ruiz M, Leivas A. Nitric oxide synthases, nitric oxide, prostaglandins, and endothelins in chronic liver diseases: their contribution to portal



- hypertension and ascitis. *Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy*. Ed Masson 1997: 27
280. Jiménez W, Poo J.L, and Leivas A. Endothelin and systemic, renal, and hepatic hemodynamic disturbances in cirrhosis. *Therapy in liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy*. Ed Masson 1997
281. Zaugg Ch E, Hornstein P.S, Zhu P, et al. Endothelin-1-induced release of thromboxane A2 increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts. *Circulation* 1996; 24: 742-747.
282. Sirois M.G, Filep J.G, Rousseau A, et al. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A2. *Eur J Pharmacol* 1992; 214: 119-125
283. Deng L.Y., Day R, Schiffrin E.L. Localization of sites of enhanced expression of endothelin-1 in the kidney of DOCA-salt hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1158-1164. Abstract
284. Yukimura T, Notoya M, Mizojiri K, et al. Hig resolution localization of endothelin receptors in rat renal medulla. *Kidney Int* 1996; 50: 135-147. Abstract
285. Kohan et al. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kid Dis* 1997; 29: 2 – 26.
286. Kumano K, Masui N, Soh S, et al. Plasma endothelin level following kidney transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26: 2114 – 2116.
287. Castillo J, Berrazueta J.R, Herrera L, et al. Nitric oxide and endothelins are effector agents of hyperacute vascular rejection. *Transplant Proc* 1996; 28: 635

- 
288. Mouquet C, Carayon A, Ourahma S, et al. Course of plasma endothelin levels during acute rejection in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26: 279
289. Fabrega E, Figols J, Duenas C, et al. Value of endothelin in cellular rejection after liver transplantation. *Clinic Transplant* 1997; 11: 25-28. Abstract
290. Xiao X.R, Ao J.H, Li Y.T, et al. Plasma endothelin levels in the early period after renal transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 1212 – 1214
291. Tomita K, Kazutoma U, Nakanishi T, et al Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N Engl J Med* 1989; 321: 1127.
292. Yamada K, Gunji Y, Kishisawa E, et al. Possible involvement of endothelin in posttransplant acute tubular necrosis. I: Studies in renal transplant patients. *Transplantation* 1994; 57: 1137-1138.
293. Wilhelm S.M, Simonson M.S, Robinson A.V, et al. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int* 1999; 55: 1011-1018.
294. Kraus T.W, Mehrabi A, Klar E, et al. Endothelin concentration in porcine hepatic tissue during ischemia and reperfusion. *Transplant Proc* 1995; 27: 2752–2753.
295. Shibouta Y, Suzuki N, Shino A, et al. Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure. *Life Sciences* 1990; 46: 1611-1618
296. Sakamoto K, Yokoyama T. Possible involvement of endothelin in posttransplant acute tubular necrosis. II: Studies in rats. *Transplantation* 1994; 57: 1140–1141

- 
297. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, and Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989; 83: 1762-1767
298. Espinosa G, López A, Cernadas M.R, et al. Role of endothelin in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Kidney Int* 1996; 50: 776 – 782
299. Buyukgebiz O, Aktan A.O, Haklar G, et al. BQ-123, a specific endothelin (ETA) receptor antagonist, prevents ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation. *Transplant Int* 1996; 9: 201- 207. Abstract
300. Fukunaga K, Takada Y, Taniguchi H, et al. Endothelin antagonist treatment for successful liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1999; 67: 328-332
301. Mitsuoka H, Suzuki S, Sakaguchi T, et al. Contribution of endothelin-1 to microcirculatory impairment in total hepatic ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 1999; 67: 514 – 520
302. Jin M.B, Zhu Y, Zhang S, et al. Attenuation of ischemic liver injury by a non-selective endothelin receptor antagonist. *Transplant Proc* 1997; 29: 1335
303. Hendry B.M, James A.F. Endothelin antagonists in renal disease. *Lancet* 1997; 350: 381- 382.
304. Furchgott R.F and Zawadzki V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373- 376.
305. Palmer R.M.J, Ferrige A.G. and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

- 
306. Bachmann S and Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization, and function. *Am J Kid Dis* 1994; 24: 112-129.
307. Sessa W.C. Endothelial-derived nitric oxide as a mediator of vascular function. *Therapy in liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy*. Ed Masson 1997 : 21-25
308. Knowles R.G. and Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. ***Biochem J*** 1994; 298: 249-258
309. Noiri E, Peresleni T, Miller F, et al. In vivo targetin of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 2377- 2383
310. Whittle B.J.R, López-Belmonte J. and Rees D.D. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 646-652
311. Ramwell P. and Thomas G. Nitric oxide and its role in transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 2074-2076
312. King A.J. and Brenner B.M. Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am J Physiol* 1991; 29: 653-662
313. Radi R, Beckman J.S, Bush K.M, et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-487.

314. Conger J, Robinette J, Villar A, et al. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1995; 96: 631-638.
315. Shoskes D.A, Xie Y, Gonzalez-Cadavid N.F. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 1997; 63: 495-500.
316. Mashiach E, Sela S, Winaver J, et al. Renal ischemia-reperfusion injury: contribution of nitric oxide and renal blood flow. *Nephron* 1998; 80: 458-467.
317. Correas M.A, Martín B, Antolín F, et al. Estudio del papel del óxido nítrico en la isquemia caliente en el riñón trasplantado. *Arch Esp Urol* 1997; 50: 495-503.
318. Cristol J.P, Thiemermann C, Mitchell J.A, et al. Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 188-194.
319. Negita N, Ishii T, Kunikata S, et al. Cytoprotective effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. *Transplant Proc* 1996; 28: 1904-1905.
320. Satoh S, Stowe N.T, Inman S.R, et al. Renal vascular response to vasodilators following warm ischemia and cold storage preservation in dog kidneys. *J Urol* 1993; 149: 186-189.
321. Kin S, Sasaki T, Gu K, et al. The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant Proc* 1995; 27: 754-757.
322. Kin S, Sasaki T, Gu K, et al. L-arginine can attenuate warm ischemic injury in the rat kidney and nitric oxide production in the preserved kidney. *Transplant Proc* 1996; 28: 1889-1890.

- 
323. Weight S.C, Furness P.N. and Nicholson M.L. Nitric oxide generation is increased in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1998; 85: 1663-1668.
324. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59: 772-779.
325. Oishi A, Inagaki M. and Tanaka N. Correlation between nitric oxide production and preservation of sinusoidal endothelial cells during cold ischemia. *Transplant Proc* 1997; 29: 1338-1339.
326. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 43-52. Abstract.
327. Cottart Ch, Do L, Blanc M.C, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29: 809-813.
328. Esteban F, Gómez-Jiménez J, Martín M.C, et al. Nitric oxide and hepatic ischemic injury in human orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27: 2283-2285.
329. Isobe M, Katsuramaki T, Kimura H, et al. Correlation between nitric oxide and endothelin after prolonged warm ischemia-reperfusion injury in pig livers. *Transplant Proc* 1998; 30: 3750-3753.
330. Kaufman R.P, Anner H, Kobzik L, et al. Vasodilator prostaglandins (PG) prevent renal damage after ischemia. *Ann Surg* 1987; 205 : 195-198.
331. Lelcuk S, Alexander F, Kobzik L, et al. Prostacyclin and thromboxane A2 moderate postischemic renal failure. *Surgery* 1985; 98:207-212.

332. Kuzu M.A, Köksoy C, AlaÇayir I, et al. Thromboxane synthase inhibitor, UK 38485, prevents renal injury in the rabbit isolated perfused kidney exposed to cold ischemia. *Transplantation* 1995; 59 : 1096-1099.
333. Kin S, Stephanian E, Gores P, et al. Effect of thromboxane A2 synthesis inhibitor OKY-046 on canine pancreas and kidney preservation. *Transplant Proc* 1993; 25:1627-1628.
334. Garvin P.J, Niehoff M.L, Robinson S.M, et al. Evaluation of the thromboxane A2 synthetase inhibitor OKY-046 in a warm ischemia-reperfusion rat model. *Transplantation* 1996; 61:1429-1434.
335. Suehiro T, Yanaga K, Itasaka H, et al. Beneficial effect of thromboxane A2 synthetase inhibitor on cold-stored rat liver. *Transplantation* 1994; 58: 768-773.
336. Kobayashi T, Esato K, Morita N, et al. Effects of thromboxane A2 synthesis inhibitor (OKY-046) on total liver ischemia in rats. *Int. Surg* 1996; 81: 115-118 . Abstract.
337. Isozaki H, Okajima K, Hara H, et al. The protective effect of thromboxane A2 synthetase inhibitor against ischemic liver injury. *Surg Today* 1994 24: 435-440. Abstract.
338. Kuroda T, Shiohara E, Haba Y, et al. The effect of a thromboxane A2 receptor antagonist (ONO 3708) on ischemia-reperfusion injury of the dog pancreas. *Tranplantation* 1994; 57: 187-194.
339. Kato A, Hishida A and Nakagima T. Role of thromboxane A2 and prostacyclin in uninephrectomy-induced attenuation of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1995; 48:1577-1583

- 
340. Paller M.S and Manivel J.C. Prostaglandins protect kidneys against ischemic and toxic injury by a cellular effect. *Kidney Int* 1992; 42: 1345-1354
341. Xu N. Effect of electroacupuncture of taixi point. of plasma thromboxane A2 and prostacyclin in the rabbit with renal ischemia. *Chen Tzu Yen Chiu* 1993; 18: 240-242. Abstract.
342. García-Valdecasas J.C, Rull R, Grande L, et al. Prostacyclin, thromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. *Tranplantation* 1995; 60: 662-667.
343. Chen H.M, Chen M.F and Shyr M.H. Prostacyclin analogue (OP-2507) attenuates hepatic microcirculatory derangement, energy depletion, and lipid peroxidation in a rat model of reperfusion injury. *J Surg Res* 1998; 80: 333-338.
344. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976 ; 263: 663-665.
345. Fitzgerald G.A, Brash A.R, Falardeau P, et al. Estimated rate of prostacyclin secretion into circulation of normal man. *J Clin Invest* 1981; 68: 1272-1276.
346. Hamberg M, Svensson J. and Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Nat Acad Sci* 1975; 72: 2994-2998.
347. Bhagyalakshmi A. and Frangos J.A. Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 31-37.



- 
348. Llinás M.T, González J.D, Moreno C y Salazar F.J. Interacción entre óxido nítrico y prostaglandinas en el control de la función renal. *Hipertensión* 1998; 15 : 140- 142.
349. Radomsky M.W, Palmer R.M.J. and Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
350. Jain S, Furness PN, Nicholson ML, et al. The role of TGF-beta in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2000; 69(9):1759-66.
351. Hutchinson IV. The role of TGF-beta in transplant rejection. *Transplant Proc* 1999;31(7A):9S-13S.
352. Lawrence DA. TGF-beta: an overview. *Kidney Int Suppl* 1995;49:s19-23.
353. Bitzer M, Sterzel RB, Bottinger EP. TGF-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1998;21:1-12.
354. Chirwin JM, Pryzbyla RJ, McDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1978; 18: 5294-5299.
355. Siebert PD, Larrick JW. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 1993; 14: 244-249.
356. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 523-526.

- 
357. Asbert M, Ginès A, Ginès P, Jiménez W, et al. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 104: 1485-1491.
358. Solá J, Camps J, Arroyo V, et al. Longitudinal study of renal prostaglandin excretion in cirrhotic rats: relationship with the renin-aldosterone system. *Clin Sci* 1988; 75: 263-269.
359. Balasch J, Arroyo V, Fabregues F, et al. Neurohormonal and hemodynamic changes in severe cases of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Ann Intern Med* 1994; 121: 27-33.
360. Maessen J.G, Van der Vusse G.J, Vork M, and Kootstra G. Nucleotides, nucleosides, and oxypurines in human kidneys measured by use of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1988; 34: 1087-1090.
361. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968; 7: 4030.
362. Solez K, et al. Report of the third Banff conference on allograft pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996; 28: 441-441.
363. Peña D. Estadística. Modelos y Métodos. Vol II. *Modelos lineales y series temporales*. 1993. Alianza Universidad Textos.
364. Cuadras C.M. *Métodos de Análisis multivariante*. 1981. Editorial EUNIBAR.
365. Kleinbaum D.G. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. 1988. Second edition. PWS-Kent publishing company.

- 
366. Pereira MG. *Epidemiologia Teoria e Prática*. 1995, 1ª edição, Editora Guanabara Koogan.
367. Alcaraz A, Luque P, Mendes DR et al. Experimental kidney transplantation in pigs from non-heart-beating donors: evaluation of vasoactive substances and renal artery flow. *Transplant Proc* 2001 Sep;33(6):2971-2.
368. Alcorta DA, Prakash K, Waga I, Sasai I, Munger W, Jennette JC, Falk RJ. Future glomerular approaches to the diagnosis and treatment of glomerular disease. *Semin Nephrol* 2000; 20: 20-31
369. Porter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, Thompson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg* 1998; 85: 1373-7.
370. Jain S, Bicknell GR, Nicholson ML. Molecular changes in extracellular matrix turnover after ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2000; 87: 1188-92.
371. Globé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56:1299-1304.
372. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. *Transplantation* 1995; 59: 565-572.
373. Takada M, Nadeu KC, Shaw GD, Tilney NL. Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 1997; 64: 1520-1525.

374. Newby AC, Fabunmi RP, Geoge SJ, Southgate KM, Banning AP, Thurston VJ et al. Neointimal fibrosis in vascular pathologies: role of growth factors and metalloproteinases in vascular smooth muscle proliferation. *Exp Nephrol* 1998; 3: 108-113.
375. Jain S, Bicknell GR, White SA, Willians ST, Furness PM, Nicholson ML. Comparison of the expresion of fibrosis-associated genes in glomeruli after renal trasplantation between conventional cadaveric and non-heart-beating donors. *Br J Surg* 1999; 86: 1264-8.
376. Takada M, Nadeu KC, Shaw GD, Marquete KA, Tilney NL, The cytoquine-adhesion molecule cascade in isquemia/reperfusion injury of the rat kidney: inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99: 2620.
377. Pirsch JD, Pleog RJ, Grange S, et al. Determinants of graft survival after renal transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1581.
378. Robertson H, Wong WK, Talbot D, Burt AD, Kirby JA. Tubulitis after renal transplantation: demonstration of an association between CD103+ T cells, TGF- $\beta$ 1 expression and rejection grade. *Transplantation* 2001; 71: 306-313.
379. Kilshaw PJ, Alpha E beta 7. *J Clin Pathol-Mol Pathol* 1999; 52: 203.
380. Wever PC, Aten J, Rentenaar RJ, et al. Apoptotic tubular cell death during acute renal allograft rejection. *Clin Nephrol* 1998; 49: 28.
381. Mohamed MAS, Robertson H, Booth TA, Balapuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies. A comparative study between Cyclosporin-A and Tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69: 1002.

- 
382. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713.
383. Branton MH, Kopp JB. TGF- $\beta$  and fibrosis. *Microbes Infect* 1999; 1: 1349-65.
384. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Tomoka S, Kagami S. Antagonists of transforming growth factor-beta: a novel approach to treatment of glomerulonephritis and prevention of glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1992; 41: 566.
385. Wahl SM, Transforming growth factor-beta in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol* 1992; 12: 61..
386. Marrak P, Kappler J. Subversion of the immune system by pathogens. *Cell* 1994; 76: 323.
387. Winyard P, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA, Woolf AS: Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int* 1996; 49: 135-146.
388. Perella MA, Jain MK, Lee ME: Role of TGF- $\beta$  in vascular development and vascular reactivity. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 136-143.
389. Perella MA, Paterson C, Tan L, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME. Suppression of interleukin-1beta-induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by TGF- $\beta$ 1 in vascular smooth muscle cells: Evidence for mechanisms other than NF-kappaB. *J Biol Chem* 1996; 271: 13776-80.

- 
390. Becker BN, Jacobson LM, Becker YT, et al. Renin-angiotensin system gene expression in post-transplant hypertension predicts allograft function. *Transplantation* 2000; 69(7):1485-91.
391. Ferrario RG, Foulkes R, Salvati P, Patrono C, Hemodynamic and tubular effects of endothelin and thromboxane in the isolated perfused rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1989; 171: 549.
392. Cozza EN, Gomez-Sanchez CE, Effects of endothelin-1 on its receptor concentration and thymidine incorporation in calf adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127: 549.
393. McMillen MA, Huribal M, Cunningham ME, et al. Endothelin-1 increases intracellular calcium in human monocytes and causes production of interleukin-6. *Crit Care* 1995; 280: 103.
394. Lieberthal W, Wold EF, Rennke HG, Valeri CR, Levinsky NG. Renal ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Physiol* 1989; 256: 894-900.
395. Lefer AM. Transforming growth factor-beta and reperfusion injury. Mechanisms of the protective effects of transforming growth factor-beta in reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*. 1991 Sep 12;42(7):1323-7. Review.
396. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF- $\beta$ 1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2000; 58: 1174-85..

- 
397. Nicholson ML, Bicknell GR, Barker G, Doughman TM, Williams ST, Furness PN. Intragraft expression of transforming growth factor beta 1 gene in isolated glomeruli from human renal transplants. *Br J Surg* 1999; 86: 1144..
398. Maessen J.G, Van der Vusse G.J, Vork M, and Kootstra G. Nucleotides, nucleosides, and oxypurines in human kidneys measured by use of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1988; 34: 1087-1090.
399. Luque M<sup>a</sup>.P, Alvarez-Vijande R, Alcaraz A, et al. Experimental study of the cellular energy charge in pig kidney transplants with non-heart-beating donors *Transplant Proc* 1999; 31: 2352- 2353.
400. Garvin P.J, Castaneda M, Niehoff M, et col. An experimental evaluation of nucleotide enhancement techniques for kidney transplantation. *J Sug Res* 1985; 38: 29-38.
401. Nicholson ML, Bailey E, Williams S, Harris KP, Furness PN. Computerized histomorphometric assessment of protocol renal transplant biopsy specimens for surrogate markers of chronic rejection. *Transplantation* 1999; 68: 236.
402. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66:1014.
403. Zhang JG, Walmsey MW, Moy JV, et al. Differential effects of cyclosporin A and tacrolimus on the production of TGF-beta: implications for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Int* 1998; 11 (suppl 1): S325.

- 
404. Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS6161443 on functional and morphological changes in chronically rejection rat kidneys allografts. *Transplantation* 1995; 59: 460.
405. Wiesel M, Carl S. A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combination with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients: 1-year results. The European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *J Urol* 1998; 159: 28.
406. Ducloux D, Fournier V, Bresson-Vautrin C, et al. Mycophenolate mofetil in renal transplant recipients with cyclosporine-associated nephrotoxicity: a preliminary report. *Transplantation* 1998; 65: 1504.
407. Weir MR, Anderson L, Fink JC et al. A novel approach to the treatment of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 1998; 64: 1706.
408. Hueso M, Bover J, Seron D, et al. Low-dose cyclosporine and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients with suboptimal renal function. *Transplantation* 1998; 66: 1727.
409. Paredes D, Sola R, Guirado L, et al. Treatment of kidney transplants with chronic rejection using angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Transplant Proc* 1997; 29: 2587.
410. Barnas U, Schmidt A, Haas M, Oberbauer R, Mayer G. The effects of prolonged angiotensin-converting enzyme inhibition on excretory kidney function and proteinuria in renal allograft recipients with chronic progressive transplant failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1822.
411. Capistol JM, Inigo P, Jimenez W, et al. Losartan decreases plasma levels Of TGF-beta 1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 1999; 56: 714..



- 
412. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 1990; 346: 371.
413. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522.
414. Bottinger EP, Factor VM, Tsang ML, et al. The recombinant proregion of transforming growth factor beta 1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5877.
415. Ebner R, Chen RH, Shum L, et al. Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science* 1993; 260: 1344.
416. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171.
417. Roberts IS, Farrington C, Dziobon M, Brenchley PE, Short CD, Canfield AE. Thrombospondin-1 expression in renal allograft rejection (Abstract). *J Pathol* 1997; 181: 53A.
418. Tada H, Isogai S. The fibronectin production is increased by thrombospondin via activation of TGF-beta in cultured human mesangial cells. *Nephron* 1998; 79: 38.
419. Lantz I, Dimeny E, Larsson E, Fellstrom B, Funa K. Increased immunoreactivity of transforming growth factor-beta in human kidney transplants. *Transpl Immunol* 1996; 4: 209.

420. Basile DP, Rovak JM, Martin DR, Hammerman MR. Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischaemic injury. *Am J Physiol* 1996; 270: F500.