

## Glicoproteína-P, TGF- $\beta$ y endotelinas en la nefropatía crónica del injerto, un estudio molecular

M.E. Reguero, M. Aguilar, A. Olmo, M. Gómez-Morales, B. Espigares, A. Osuna\*, C. Asensio\*, R.G. del Moral, F. O'Valle

### Resumen

Presentamos el estudio molecular por RT-PCR de los mediadores de lesión más importantes (TGF $\beta$ -1, endotelina 1, endotelina 3, angiotensinógeno y glicoproteína-P -MDR1-, un regulador de la nefrotoxicidad por inmunosupresores en la nefropatía crónica del injerto).

Método: Estudiamos 45 biopsias renales procedentes de pacientes trasplantados con nefropatía crónica del injerto que recibían tratamiento inmunosupresor estándar y 23 biopsias renales control. 50.0% de las biopsias estudiadas presentaban según los criterios de Banff una puntuación II, 33.3% una puntuación I y el 16.6% una puntuación III. Cada marcador molecular de lesión fue analizado semicuantitativamente por densitometría en geles teñidos con bromuro de etidio usando el ARNm de la  $\beta_2$ -microglobulina como marcador interno.

Resultados: El estudio realizado estableció diferencias estadísticamente significativas para los niveles de expresión de ARNm de los marcadores moleculares entre los controles y los pacientes diagnosticados de nefropatía crónica del injerto. Todos los marcadores mostraron un incremento en este último grupo comparado con el grupo control, más evidente para MDR1 y TGF $\beta$ -1 (0.588 frente a 0.333 [ $p < 0.01$ ], y 0.520 frente a 0.199, [ $p < 0.001$ ], respectivamente). Por otra parte, hubo una correlación directa entre los marcadores tanto en los pacientes como globalmente, con un considerable solapamiento en todos los casos, especialmente entre MDR1 y ET1 (coeficiente de co-

rrelación de Spearman  $r = 0.837$ ,  $p < 0.01$ ). Un hallazgo fue la clara relación inversa entre los niveles de expresión de ARNm y la puntuación de Banff (ej. Pacientes con altos niveles de expresión de los marcadores de lesión, principalmente MDR1 y ET-1, tenían las puntuaciones de Banff más bajas).

Conclusión: El uso de técnicas de biología molecular para cuantificar ARNm de marcadores de lesión de NCI es una aproximación prometedora que puede complementar el uso del esquema de Banff y corroborar las actuales hipótesis patofisiológicas respecto al origen de las lesiones de la NCI. La notable diferencia de niveles de expresión de ARNm entre pacientes para cada marcador estudiado incrementa la posibilidad de emplear tratamientos farmacológicos específicos para cada uno (ej. Inhibidores ACE para niveles excesivos de ARNm de angiotensinógeno, o en el futuro próximo, bloqueantes del receptor tipo A de las endotelinas). La relación inversa entre cada marcador estudiado aquí y la puntuación de Banff sugiere la necesidad de nuevos estudios de estos marcadores con el fin de establecer el origen de las lesiones y también mejorar el análisis prospectivo de la NCI y su posible respuesta al tratamiento.

### Summary

Aims: We present a RT-PCR study of chronic transplant nephropathy to determine the expression levels of the most important mediators in this lesion (TGF $\beta$ -1, endothelin 1, endothelin 3, angiotensinogen and P-glycoprotein -MDR1-, a regulator of the nephrotoxicity of immunosuppressive drugs).

Method: We study 45 kidney biopsies from patients diagnosed with chronic transplant nephropathy and receiving standard immunosuppressive protocol and 23 control biopsies of healthy individuals. 50.0% renal biopsies studied belong to Banff score II, 33.3% to score I and 16.6% to score III. The ethidium bromide staining gels for each marker were analysed semiquantitatively by densitometry using  $\beta_2$ -microglobulin mRNA as an internal marker.

Results: Our study made it possible to establish differences in the amounts of mRNA for each marker between controls and patients diagnosed with chronic transplant nephropathy. All markers showed an increased expression in the latter group compared with the control group, more evident for MDR1 and TGF $\beta$ -1 (0.588 vs 0.333 [ $p < 0.01$ ], and 0.520 vs 0.199, [ $p < 0.001$ ], respectively). Moreover, there was a direct correlation between markers, both in patients and overall, with considerable overlap in all cases, especially between MDR-1 and ET1 (Spearman's test,  $r = 0.837$ ,  $p < 0.01$ ). A finding of note was the clear inverse relation between the mRNA levels of each marker and the Banff score (assigned with a standard procedure developed in 1995),

Servicio de Anatomía Patológica  
Hospital Universitario San Cecilio  
Facultad de Medicina, Universidad de Granada  
\* Servicio de Nefrología.  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves  
Granada (España)

### Correspondencia:

Francisco O'Valle Ravassa  
Departamento de Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Avda. de Madrid, s/n.  
18012 Granada (España)  
Tel. 958 246 180  
Fax 958 243 510  
E-mail: fovalle@ugr.es

i.e., patients expressing the highest levels of lesion markers (principally MDR1 and ET-1) had the lowest Banff score.

**Conclusions:** The use of molecular biology techniques to quantify mRNA of markers of chronic transplant nephropathy lesions is a promising approach that can complement the use of the Banff scheme and corroborate current pathophysiological hypotheses regarding the origin of these lesions. The notable differences between patients in the levels of mRNA for each marker studied here raise the possibility of using specific pharmacological treatments for each (e.g., ACE Inhibitors for excess levels of angiotensinogen mRNA, or in the near future, type A endothelin receptor blockers). The inverse relation between each marker studied here and the Banff score suggests the need for further study of these markers in order to address the origin of these lesions and also to refine the prospective analysis of chronic transplant nephropathy and possibly its response to treatment.

## Introducción

Uno de los principales problemas del trasplante renal es la nefropatía crónica del injerto (NCI), que produce el declive progresivo de la función del injerto meses o años después del trasplante (1,2). Hasta el 40% de los injertos desarrollan progresivamente una disfunción después de los primeros meses postrasplante que conduce al fracaso renal, a pesar del uso de fármacos inmunosupresores a dosis suficientes para prevenir el rechazo agudo (3).

La NCI debe su causa a factores inmunológicos antígeno-dependientes [severidad, número y momento en que se produce el rechazo agudo (4,5), desigualdades en antígenos HLA (6,7)] y a factores no inmunológicos o antígeno-independientes (8-10) [edad del donante (11), lesión por isquemia-reperfusión (12) hipertensión (13), trigliceridemia, función renal y proteinuria (9)] que han sido destacados como factores de riesgo en diferentes estudios mediante análisis multivariante (11,14).

Los cambios morfológicos de la NCI consisten en fibrosis intersticial y atrofia tubular (15) que pueden ir acompañados de hiperplasia fibrointimal arterial (vasculopatía del trasplante) y lesión glomerular con incremento en el número de células mesangiales y matriz mesangial, engrosamiento y duplicación de membranas basales glomerulares (glomerulopatía del trasplante) (16). Aunque ninguna de estas lesiones es específica de la NCI, son las valoradas semicuantitativamente en la nueva clasificación de Banff (17).

Se reconoce que la duración y extensión del daño son determinantes importantes, pero el diagnóstico morfológico de NCI no es de utilidad para identificar los mecanismos patogénicos que llevan al fracaso del injerto, porque la fibrosis intersticial renal puede ser el resultado final de múltiples tipos de lesiones (18). Los mecanismos moleculares que se suceden en la NCI permanecen por aclarar. Una cantidad importante de mediadores que incluye citocinas proinflamatorias, enzimas, factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, la IL-1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa, la angiotensina II y las endotelinas (19) pueden tener un papel activo en la patogenia de la NCI.

## Material y métodos

Se analizaron 68 biopsias renales procedentes de 45 pacientes trasplantados, diagnosticados de NCI y 23 biopsias renales de donantes de riñón sin patologías relevantes valoradas según protocolo previamente descrito (20), procedentes de los Servicios de Nefrología de los Hospitales Virgen de Las Nieves y Clínico Universitario San Cecilio. Las biopsias se obtuvieron mediante punción percutánea con aguja de 13 mm de diámetro, bajo control ecográfico. El material fue remitido en fresco envuelto en una gasa humedecida en suero fisiológico.

### Procedimientos de biología molecular

Fueron congeladas en nitrógeno líquido porciones de tejido de biopsias renales, almacenadas a

-80°C para la extracción posteriormente de ARN. A partir del tejido renal congelado se determinó la expresión de ARNm de los principales mediadores moleculares de lesión: Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ 1), endotelina 1 (ET1), endotelina 3 (ET3), angiotensinógeno (AN) y glicoproteína-P (MDR1), mediante técnica de RT-PCR.

### Protocolo de extracción del ARN

El tejido renal congelado fue rápidamente homogeneizado con un triturador de tejidos Ultra-Turrax® T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Alemania), en solución comercial de TRIZOL® LS Reagent (Life Technologies, Paisley, Scotland). El ARN total fue aislado según lo descrito previamente por Chomczynski y Sachi (21) con ligeras modificaciones y cuantificado por espectrofotometría.

### Síntesis de ADNc y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En resumen, se realizó la transcripción inversa a ADNc a partir de 2  $\mu$ g de ARN total en 20  $\mu$ l de mezcla de reacción conteniendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de DTT, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 unidades de Transcriptasa Inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Vitro SA, Sevilla, España), 30 unidades de inhibidor de ribonucleasas (Ribonucleace Inhibitor) (Vitro SA.), 1  $\mu$ M de cebador oligo dT (oligo d [T] 18) (Vitro SA.), 1  $\mu$ M de cebador hexanucleótido (Random Primer) (Vitro SA.) y 0.5 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP set) (Vitro SA.). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante 1 hora y posteriormente a 75°C durante 10 minutos, para desactivar la transcriptasa inversa, y enfriada en hielo 5 minutos. 3  $\mu$ l de ADNc fueron amplificados con 1 unidad de ADN polimerasa termoestable (DyNAzyme™ II DNA Polymerase) (Vitro SA.), en un volumen final de 50  $\mu$ l conteniendo: 10 mM de Tris-HCl, 150 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % de Tritón X-100, 200  $\mu$ M de cada dNTP y 0.5  $\mu$ M de cada cebador. El perfil de amplificación de los 35 ciclos fue como sigue: desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, unión de los cebadores a 55°C du-

TABLA 1. PARES DE "PRIMERS" O CEBADORES EMPLEADOS PARA LA SINTESIS DE ADNc

ADNc	Primers sintéticos	Tamaño
Endotelina 1	Sense 5'-CTTCTGCCACCTGGACATCATTGG-3' Antisense 5'-CAGTCTTTCTCCATAATGTCTTCAGC-3'	222-pb
Endotelina 3	Sense 5'-GTCTGTCTACTATTGCCACCT-3' Antisense 5'-CTTGTCATATCTCCCCACACA-3'	
Angiotensinógeno	Sense 5'-CTGCAAGGATCTTATGACCTGC-3' Antisense 5'-TACACAGCAAACAGGAATGGGC-3'	184-pb
TGF-β1	Sense 5'-CTGCGGATCTCTGTGTCATT-3' y Antisense 5'-CTCAGAGTGTTGCTATGGTG-3'	217-pb
MDR-1	Sense 5'-CCCATCATTGCAATAG CAGG-3' Antisense 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'	246-pb
β <sub>2</sub> -microglobulina	Sense 5'-ACCCCCACTGAAAAAGAT GA-3' Antisense 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	167-pb
		120-pb

pb: pares de bases. TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta 1. MDR-1: gen de la multirresistencia a fármacos.

rante 60 segundos y extensión a 72°C, 30 segundos. Antes de los 35 ciclos las muestras fueron calentadas a 94°C durante 3 minutos y al finalizar se añadió un tiempo extra de 4 minutos de extensión a 72°C.

Para amplificar la secuencia específica los genes MDR1, ET1, ET3, TGF-β1, AN y β<sub>2</sub>M, se utilizaron parejas de cebadores con la secuencia para cada gen que se especifican en la tabla 1. Cada cebador se adicionó a una concentración final de 25 pmol por reacción. La fidelidad de los productos de PCR se demostró por secuenciación automática (Applied Biosystems, Model 373A, Foster City, California, USA).

Las secuencias de la pareja de cebadores utilizada para el estudio del gen MDR1 fueron descritas por Chen y colaboradores en 1986 (22), para los residuos 2596 a 2615, cebador 1, y los residuos 2733 a 2752, cebador 2, de la secuencia del ADNc del gen MDR1 humano. Para el gen ET1, el cebador 1 se describió para los residuos 462 a 486, y para los residuos 658 a 683 el cebador 2 (23). El diseño de las secuencias de la pareja de cebadores utilizada para el estudio del gen ET3 fue realizado mediante un programa de ordenador, que se encuentra disponible en la base de datos "GEN EMBL Data Library" de Alemania (24). Las secuencias de la pareja de cebadores utilizada para el estudio del gen TGF-β1, se tomaron para el cebador 1 desde el residuo 2154 al 2173; y para el cebador 2 desde el 2380 al 2399 (25). Para el gen AN, el cebador 1 se describió para los residuos 1209 a 1231, y para los residuos 1404 a 1426 el cebador 2 (26). Las secuencias de la pareja de cebadores utilizada para el estudio del gen constitutivo de la β<sub>2</sub>M para los residuos 1544 a 1563, cebador 1, y los residuos 2253 a 2262 y 3508 a 3517, cebador 2, fueron descritas por Gussow y colaboradores en 1987 (27).

Para cuantificar la expresión de cada gen mencionado, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (1.5% normal y 1.5% de agarosa de bajo punto de fusión) y la intensidad de cada banda se determinó densitométricamente usando el software

Visilog 4.1 (Noesis, Velizy, France). Los datos se estandarizaron usando los niveles de expresión de la β<sub>2</sub>M como control interno, para normalizar la cantidad de material de partida de cada muestra. Como controles de expresión de los marcadores en el riñón se estudiaron 23 biopsias renales de adultos (media 53 años, rango 16-78), 52.17% hombres y 47.83% mujeres.

## Resultados

La edad media de los pacientes con NCI fue de 38.26 ± 9.76 años con predominio de hombres (71.43 %) sobre mujeres (28.57 %). La supervivencia media del injerto fue de 1577.91 ± 1.312 días (rango 51-6473). 3 pacientes perdieron el injerto. La creatinina media en el momento de la biopsia fue de 2.39 ± 0.72 mg/dL; al mes de tratamiento 2.27 ± 0.64 mg/dL y al final del seguimiento de 2.81 ± 2.27 mg/dL.

36 biopsias fueron adecuadas según los criterios de la clasificación de Banff (1997) (17), 6 marginales y 3 biopsias insuficiente. Los grados de NCI a los que correspondieron dichas biopsias fueron: 14 casos grado I (33.3%), 21 grado II (50%) y 7 grado III (16.6%). 10 pacientes (23.26%) sufrieron previamente un episodio de rechazo agudo y en 13 casos (36.11%) infección por citomegalovirus.

Mediante técnica de RT-PCR se puso de manifiesto en los controles la expresión de ARNm de todos los genes evaluados. En la tabla 2 se especifican los valores densitométricos obtenidos de la cuantificación de las bandas desarrolladas en geles de agarosa a partir de los productos de RT-PCR para el ARNm del gen MDR1, gen ET1, gen ET3, gen TGF-β y el gen AN. Los de mayor expresión fueron los ARNm del gen MDR1 y el gen TGF-β1 (tabla 2). Comparativamente con los controles, en la NCI la expresión de ARNm de los genes estudiados se encontró incrementada alguno de ellos de forma estadísticamente significativa (MDR1 p<0.001, t de Student; TGF-

TABLA 2. VALORES DENSITOMÉTRICOS DE LA CUANTIFICACION DE LAS BANDAS OBTENIDAS MEDIANTE DESARROLLO EN GELES DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA EL ARNm DE LOS GENES MDR1, ET1, ET3, TGF- $\beta$ 1 Y AN, DE LAS BIOPSIAS DIAGNOSTICADAS DE NCI.

	MDR1 (x $\pm$ DS)	ET1 (x $\pm$ DS)	ET3 (x $\pm$ DS)	TGF $\beta$ (x $\pm$ DS)	AN (x $\pm$ DS)
N.C.I	0.588 $\pm$ 0.374	0.334 $\pm$ 0.441	0.033 $\pm$ 0.051	0.520 $\pm$ 0.399	0.107 $\pm$ 0.181
Control	0.333 $\pm$ 0.223	0.184 $\pm$ 0.178	0.013 $\pm$ 0.023	0.199 $\pm$ 0.106	0.065 $\pm$ 0.064
P	<0.01 <sup>*</sup>	NS <sup>*</sup>	<0.05 <sup>†</sup>	<0.001 <sup>†</sup>	NS <sup>†</sup>

N.C.I.: Nefropatía Crónica del Injerto. x $\pm$ DS:media  $\pm$ desviación estándar. <sup>\*</sup>t de Student. <sup>†</sup>test de Man Whitney. NS: No significativo.

TABLA 3. VALORES DENSITOMÉTRICOS DE LA CUANTIFICACION DE LAS BANDAS OBTENIDAS MEDIANTE DESARROLLO EN GELES DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE LA RT-PCR PARA EL ARNm DEL GEN MDR1, GEN ET1, GEN ET3, GEN TGF- $\beta$  Y EL GEN AN, DE LAS BIOPSIAS DIAGNOSTICADAS DE NCI SEGUN EL GRADO DE BANFF (1997).

mRNA	CONTROL	N.C.I. I	N.C.I. II	N.C.I. III	P
MDR1 (x $\pm$ DS)	0.333 $\pm$ 0.223	0.694 $\pm$ 0.323 <sup>*</sup>	0.528 $\pm$ 0.416	0.640 $\pm$ 0.451	P<0.05 <sup>(ANI)</sup>
ET1 (x $\pm$ DS)	0.184 $\pm$ 0.178	0.490 $\pm$ 0.639	0.234 $\pm$ 0.316	0.351 $\pm$ 0.354	NS <sup>(KW)</sup>
ET3 (x $\pm$ DS)	0.013 $\pm$ 0.023	0.022 $\pm$ 0.036	0.035 $\pm$ 0.053	0.031 $\pm$ 0.058	NS <sup>(KW)</sup>
TGF $\beta$ (x $\pm$ DS)	0.199 $\pm$ 0.106	0.486 $\pm$ 0.345 <sup>†</sup>	0.567 $\pm$ 0.473 <sup>†</sup>	0.445 $\pm$ 0.398	P<0.01 <sup>(KW)</sup>
AN (x $\pm$ DS)	0.065 $\pm$ 0.064	0.149 $\pm$ 0.241	0.062 $\pm$ 0.107	0.166 $\pm$ 0.243	NS <sup>(KW)</sup>

x $\pm$ DS: media $\pm$ desviación estándar. ANI: test de Anova para una vía. KW: test de Kruskal Wallis. Newman Keul <sup>\*</sup>p<0.01 frente al control. test de Man Whitney <sup>†</sup>p<0.05. <sup>†</sup>p<0.001 frente al control.

$\beta$ 1 p<0.001test de Mann Whitney) (tabla 2). A pesar de existir modificaciones en la expresión de los distintos marcadores moleculares en función del grado de NCI según criterios de Banff de 1997 (17), fundamentalmente disminución de la expresión de ARNm a medida que se incrementa el grado de NCI, no se pudo establecer una relación estadística significativa consistente (tabla 3). Igualmente, no se demostró ninguna correlación entre los niveles de expresión de ARNm de los genes estudiados y haber sufrido episodios de rechazo agudo previos a la NCI, ni con la función renal valorada por los niveles de creatinina sérica. Con respecto al inicio de función renal eficaz se demostró correlación estadísticamente significativa entre ésta y los niveles de ARNm del gen AN (coeficiente de correlación de Spearman r=0.392, p<0.05).

Entre los marcadores moleculares cabe destacar la fuerte correlación que mantienen la expresión del ARNm del gen ET1 y el ARNm del gen MDR1 (coeficiente de

correlación de Spearman r=0.837, p<0.01) (tabla 4). Del ARNm del gen AN con el ARNm del gen MDR1 y ET1. Sin embargo fueron escasas las correlaciones significativas entre la expresión del ARNm del gen TGF- $\beta$ 1 y el resto de ARNm.

Un hecho constatado fue la variabilidad interpersonal en la expresión de los distintos marcadores de lesión. Como se aprecia en la figura 1, biopsias de diferentes pacientes con el mismo grado de NCI presentaron niveles de ARNm muy dispares.

## Discusión

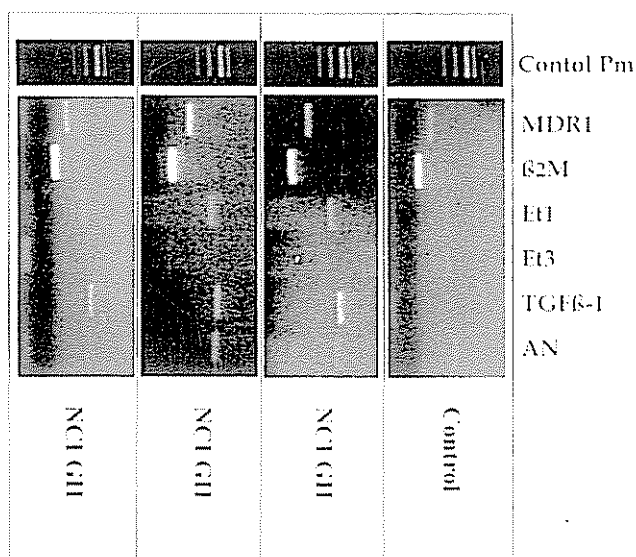
Se han valorado por RT-PCR los niveles de expresión de ARNm de diferentes marcadores moleculares de lesión TGF- $\beta$ 1, ET1, ET3, AN y MDR1. Todos ellos presentaron niveles de expresión más elevados en la NCI que en los controles. El TGF- $\beta$ 1 fue el que mostró mayor incremento de expresión. Distribuidos los niveles de expresión de ARNm de cada marcador según el grado de NCI, según los criterios de Banff de 1997 (17), se apreció como en la NCI grado I se encontraban más elevados y que sólo los niveles de TGF- $\beta$ 1, de los marcadores valorados, seguían incrementándose a medida que progresaba el grado de la NCI. Este hecho sugiere que la participación de los mediadores vasoactivos se establece fundamentalmente en las primeras fases del proceso y que en los estadios finales lo que observamos es el resultado de la lesión parenquimatosa fibrosante inducida y mantenida por factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1.

TABLA 4. CORRELACIONES ENTRE LOS RESULTADOS DEL ARNm DE LOS GENES ESTUDIADOS

	MDR1	ET1	ET3	TGF $\beta$	AN
MDR1	—	0.837 <sup>1</sup>	NS	NS	0.603 <sup>2</sup>
ET1	—	—	NS	NS	0.606 <sup>2</sup>
ET3	—	—	—	0.656 <sup>2</sup>	NS
TGF $\beta$	—	—	—	—	NS
AN	—	—	—	—	—

Correlación de Spearman. <sup>1</sup>p<0.01. <sup>2</sup>p<0.001.

FIGURA 1



Expresión de ARNm de TGF- $\beta$ 1, ET1, ET3, AN y MDR1 en tejido renal de sujetos sanos y con nefropatía crónica del injerto (NCI). Técnica de PCR sobre geles de agarosa. Control PM: Estándar de Peso Molecular. TGF- $\beta$ 1: Factor de Crecimiento transformante beta 1. ET1: Endotelina 1. ET3: Endotelina 3. AN: Angiotensinógeno. MDR1: gen de la glicoproteína P. Obsérvese mayor expresión de los marcadores en los pacientes con NCI con referencia al control, especialmente TGF- $\beta$ 1 y MDR1, así como la variabilidad de expresión de AN entre los pacientes con semejantes lesiones según la puntuación de Banff 1997.

La NCI puede ser considerada como un proceso de formación excesiva de fibrosis en respuesta a la lesión renal que conduce a la disfunción y al daño arquitectural renal (9). Desde hace años se conoce que el ARNm del TGF- $\beta$ 1 y la expresión de proteína están incrementadas en la NCI (28,29). Sharma y colaboradores detectaron niveles elevados de ARNm de TGF- $\beta$ 1 por RT-PCR en el 72% de 36 biopsias con NCI estudiadas (30) y demostraron la existencia de correlación estadística entre TGF- $\beta$ 1 y fibrosis intersticial, aunque no consiguieron demostrar asociación con las lesiones vasculares y glomerulares. El polimorfismo genético de este factor de crecimiento tiene implicaciones en la patogenia de la NCI, ya que los pacientes con un genotipo de alta producción de TGF- $\beta$  presentan un riesgo aumentado de pérdida tardía del injerto (31,32). Todos estos hallazgos sitúan a esta crinopectina como el factor de lesión principal aunque no exclusivo. Existen otros moduladores de la función renal que habían sido considerados como simples hormonas vasoactivas, como es el caso de las endotelinas (33,34) o los polipéptidos que forman parte del sistema renina-angiotensina (35) que a su vez, podrían tener un importante papel como moduladores del crecimiento celular y de la síntesis de matriz.

Aunque los fenómenos vasoactivos que aparecen en los procesos fibrogénicos no se conocen completamente, si se sabe que la acción vascular de las endotelinas, ya sea de manera directa o indirecta, desemboca en el con-

junto de procesos reparativos y fibrosantes que se observan en los estadios finales de las enfermedades renales crónicas.

El AN es un posible candidato genético para explicar la fisiopatología de la NCI ya que su expresión regula la presión sanguínea a través de la modulación de la expresión de endotelinas, la proliferación vascular y mesangial y otros aspectos de la respuesta inflamatoria como la quimiotaxis y la fibrosis reparativa (36). También ha sido demostrado que la angiotensina II es un potente estimulador de la producción de TGF- $\beta$  (37,38). La relación entre la angiotensina II y TGF- $\beta$ , ha sido puesta de manifiesto cuando tras la utilización de inhibidores del enzima convertidor de angiotensina o antagonistas de sus receptores celulares, se ha conseguido bloquear la fibrosis intersticial renal (39-42).

Con respecto a la inducción farmacológica, se ha postulado el que la ciclosporina A es capaz de inducir de manera directa un aumento de la producción de TGF- $\beta$  por parte de las células epiteliales y fibroblastos de riñón en cultivo (43). La síntesis incrementada de TGF- $\beta$  inducida por la CsA, podría ser la responsable de las modificaciones de las tasas intraglomerulares y tubulares de endotelina 1 y 3 que se observan en la nefrotoxicidad provocada por dicho fármaco (44,45).

Un hallazgo destacable en la expresión de los ARNm de los distintos marcadores ha sido su gran variabilidad interpersonal, lo que no ha permitido establecer relaciones estadísticas entre la puntuación de Banff para la NCI y dichos marcadores moleculares y además ha puesto de manifiesto la diferente situación de cada paciente supuestamente en el mismo estadio lesional, lo que permite considerar que el empleo exclusivo del esquema de Banff pueda ser insuficiente para valorar las biopsias renales con NCI.

Concluimos que el uso de técnicas de biología molecular para cuantificar ARNm de marcadores de lesión de NCI es una aproximación prometedora que puede complementar el uso del esquema de Banff y corroborar las actuales hipótesis patofisiológicas respecto al origen de las lesiones de la NCI. La notable diferencia de niveles de expresión de ARNm entre pacientes para cada marcador estudiado incrementa la posibilidad de emplear tratamientos farmacológicos específicos para cada uno (ej. Inhibidores ACE para niveles excesivos de ARNm de angiotensinógeno, o en el futuro próximo, bloqueantes del receptor tipo A de las endotelinas). La relación inversa entre cada marcador estudiado aquí y la puntuación de Banff sugiere la necesidad de nuevos estudios de estos marcadores con el fin de establecer el origen de las lesiones y también mejorar el análisis prospectivo de la NCI y su posible respuesta al tratamiento.

## Bibliografía

1. Tilney NL, Paul LC. Antigen-independent events leading to chronic graft dysfunction. *Transplantation Biology: Ce-*

- llular and Molecular Aspects, edited by Tilney NL, Strom TB, Paul LC. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven; p 629, 1996.
2. Paul LC, Tilney NL. Alloantigen-dependent events in chronic rejection. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*, edited by Tilney NL, Strom TB, Paul LC. Philadelphia, New York, Lippincott-Raven; p 567, 1996.
  3. Paul LC: Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 47: 1491-1499, 1995.
  4. Almond SP, Matas A, Gillingham K et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 55: 752-756, 1993.
  5. Waaga AM, Rocha AM, Tilney NL. Early risk factors contributing to the evolution of long-term allograft dysfunction. *Transplant Rev* 11: 208-216, 1997.
  6. Cecka JM. The UNOS scientific transplant registry. *Clin Transpl* 1-21, 1999.
  7. Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Gores PF, Dunn DL, Sutherland DER, Najarian JS. Causes of renal allograft loss: Progress in the 1980, challenges for the 1990s. *Ann Surg* 214: 679-688, 1991.
  8. Fellström BG, Larsson E. Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection. *Immunol Rev* 134: 83-98, 1993.
  9. Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 56: 783-793, 1999.
  10. Ponticelli C. Optimization of cyclosporine therapy in renal transplantation. *Transplant Proc* 30: 1718-1720, 1998.
  11. Gjetton DW. A multi-factor analysis of kidney graft outcomes at one and five years posttransplantation: 1996, edited by Cecka JM, Treasakl I, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, p 343, 1997.
  12. Shoskes D, Cecka M. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 55: 1697-1701, 1998.
  13. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Collaborative Transplant Study. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int* 53: 217-222, 1998.
  14. McLaren AJ, Fuggle SV, Welsh KI, Gray DW, Morris PJ. Chronic allograft failure in human renal transplantation. *Ann Surg* 232: 98-103, 2000.
  15. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff Working Classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44: 411-422, 1993.
  16. Habib R, Broyer M. Clinical significance of allograft nephropathy. *Kidney Int* 44 (Suppl. 43): S95-S98, 1993.
  17. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. The Banff '97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713-23, 1999.
  18. Cosio FG, Pelletier RP, Secmak DD, Falkenhain ME, Henry ML, Elkhammas EA, Davies EA, Bumgardner GL, Ferguson RM. Pathologic classification of chronic allograft nephropathy: pathogenic and prognostic implications. *Transplantation* 67: 690-696, 1999.
  19. Simonson MS, Emancipator SN, Knauss T, Hricik DE. Elevated neointimal endothelin-1 in transplantation-associated arteriosclerosis of renal allograft recipients. *Kidney Int* 54: 960-971, 1998.
  20. O'Valle F, Gómez-Morales M, Reguero ME, Aguilar M, Olmo A, Espigares B, Aguilar D, Del Moral RMG, Osuna A, Asensio C, Del Moral RG. Morfología y marcadores moleculares de lesión de riñones de donantes añosos. Sociedad Española de Diálisis y Trasplante. En prensa 2001.
  21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
  22. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47: 381-389, 1986.
  23. O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Davenport AP, Cameron IT, Smith SK. Presence of messenger ribonucleic acid for endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in human endometrium and a change in the ratio of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor subtype across the menstrual cycle. *J CE&M* 75: 1545-1549, 1992.
  24. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem* 264: 18156-19161, 1989.
  25. Collins T, Ginsburg D, Boss JM, Orkin SN, Pober JS. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* 316: 748-50, 1985.
  26. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. *J Clin Invest* 91: 2058-2064, 1993.
  27. Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, Ploegh HL. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 139: 3132-8, 1987.
  28. Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Golg LI, et al. Transforming growth factor-beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 6: 286-294, 1995.
  29. Paul LC, Saito K, Davidoff A, Benediktsson H. Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am J Kidney Dis* 28: 441-450, 1996.
  30. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49: 1297-1303, 1996.
  31. Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D, Awad MR, Sinnott PJ. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. *Transplant Proc* 30: 862-863, 1998.
  32. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene: Association with transforming growth factor-beta production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 66: 1014-1020, 1998.
  33. Ong ACM, Jowett TP, Firth FD, Burton S, Kitamura M, Fine LG. An endothelin-1 mediated autocrine growth loop involved in human renal tubular regeneration. *Kidney Int* 48: 390-401, 1995.
  34. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin in the progressive renal disease of glomerulopathies. *Miner Electrol Metab* 21: 283-291, 1995.

35. Harris RC, Martinez-Maldonado M. Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrol Metab* 21: 328-335, 1995.
36. Sharma AM, Beige J, Distler A. Role of genetic variants of the renin-angiotensin system in chronic renal allograft injury. *Kidney Int* 53: 1461-1465, 1998.
37. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of  $\beta 1$  integrins and transforming growth factor- $\beta$ -induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 69: 68-76, 1994.
38. Sharma HS, Vanheugten HAA, Goedbloed MA, Verdouw PD, Lamers JMJ. Angiotensin-II-induced expression of transcription factors precedes increase in transforming growth factor- $\beta 1$  messenger RNA in neonatal cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 105-112, 1994.
39. Kon V, Hunley TE, Fogo A. Combined antagonism of endothelin A/B receptors links endothelin to vasoconstriction whereas angiotensin II effects fibrosis. Studies in chronic nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 60: 89-95, 1995.
40. Pimentel JL, Sundell CL, Wang S, Koff 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* 48: 1233-1246, 1995.
41. Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 45: 1637-1647, 1994.
42. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 47: 1285-1294, 1995.
43. Wolf G, Thais F, Stahl RAK. Cyclosporine stimulates expression of transforming growth factor- $\beta$  in renal cells. Possible mechanism of cyclosporines antiproliferative effects. *Transplantation* 60: 237-241, 1995.
44. Matsumura Y, Murata S, Takada K, Takaoka M, Morimoto S. Involvement of transforming growth factor  $\beta 1$  for platelet-induced stimulation of endothelin-1 production. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21: 991-996, 1994.
45. Murata S, Matsumura Y, Takada K, Asai Y, Takaoka M, Morimoto S. Role of transforming growth factor-beta 1 on platelet-induced enhancement of endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 1524-1530, 1995.