

Morfología y marcadores moleculares de lesión de riñones de donantes añosos

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

Introducción

Los criterios de exclusión así como la edad límite para admitir donantes de órganos y para ser receptor de los mismos son actualmente menos estrictos. La oferta de donación de riñones corresponde cada vez más a personas mayores de 65 años y se estima que la aceptación de los órganos de donantes añosos puede suponer un incremento del 20% del número total de trasplantes (1).

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que los trasplantes de riñones de donante añosos conducen a un incremento de la ausencia de función primaria (2); a niveles de creatinina más altos y al descenso entre el 10-20 % de la supervivencia del injerto a largo plazo con referencia a donantes más jóvenes (3-5).

Los riñones de donantes añosos presentan una pérdida nefronal ligada a la edad (1) y con mayor o menor grado de severidad patologías secundarias a hipertensión arterial, arteriosclerosis o diabetes, cambios estructurales que no pueden ser adecuadamente valorados exclusivamente por pruebas funcionales renales como niveles de creatinina, aclaramiento de creatinina, proteinuria, etc. (6).

La morfología macroscópica de los riñones una vez extraídos es de ayuda para decidir sobre la viabilidad del injerto. Una vez comprobado que el tamaño de los riñones es normal (no hay atrofia o malformaciones), que se decap-

sula bien, que la superficie es lisa (lo que sugiere ausencia de secuelas fibrosas por procesos infecciosos), y se comprueba el grado de afectación vascular, descartando estenosis severas de origen aterosclerótico: el equipo de extracción dictamina la idoneidad de los riñones para trasplante. No obstante, la morfología microscópica es sin duda determinante para poder predecir con más garantías el funcionamiento futuro del injerto (3). La biopsia en donantes marginales pueden ser potencialmente un instrumento para excluir los injertos de alto riesgo (7); sobretodo si se establece una valoración global de las lesiones renales presentes, lo que puede ayudar a discriminar con más seguridad la idoneidad del injerto y decidir apriorísticamente sobre el tipo de receptor más adecuado o la realización de trasplante renal doble.

Con el propósito de conseguir unificar los criterios de selección de órganos en 1998 un grupo multicéntrico de nefrólogos procedentes de 13 hospitales españoles elaboraron un documento de consenso en el que desarrollaron dos algoritmos de selección en función de la edad del donante, datos analíticos, y lesiones macro y microscópicas (3). En el mismo año un grupo de patólogos de hospitales andaluces desarrollaron un documento de trabajo donde establecieron los criterios para la valoración semicuantitativa de las lesiones renales en donantes añosos, que han sido los empleados en este trabajo (tabla 1) (8, 9). La valoración global de las lesiones glomerulares, vasculares y tubulointersticiales requiere de una adecuada preservación de los detalles morfológicos, que las secciones en congelación no proporcionan, por ello recurrimos al empleo de un horno de microondas diseñado para el procesamiento acelerado en parafina de las biopsias.

Con referencia a los marcadores moleculares de lesión siguen siendo motivo de investigación y debate. El Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) es la principal citocina inductora de fibrosis (10-12). Entre otros mecanismos, a través de la hipersecreción de endotelina 1 por las células endoteliales, mesangiales y tubulares renales, responsables del desarrollo de hipertensión arterial intrarrenal

Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Universitario San Cecilio, Facultad de Medicina,
Granada.

*Servicio de Nefrología,
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Correspondencia:

Francisco O'Valle Ravassa
Avda. de Madrid s/n
Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
18012 Granada, España
Tel.: 958246180 FAX: 958243510
e-mail: fovalle@ugr.es

TABLA I. NUEVO PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE BIOPSIAS RENALES DE DONANTES AÑOSOS CON INCLUSIÓN EN PARAFINA ACELERADA MEDIANTE HORNO DE MICROONDAS.

- GLOMÉRULOS ESCLEROSADOS: (0) Ausencia, (1) 0-10%, (2) 11-20%, (3) >20%
- GLOMÉRULOS CON FIBROSIS CAPSULAR: (0) Ausencia, (1) 0-15%, (2) 16-40%, (3) >40%
- GLOMÉRULOS QUISTIFICADOS: (0) Ausencia, (1) 0-15%, (2) 16-40%, (3) >40%
- ARTERIOPATÍA HIALINA: (0) Ausencia, (1) Presencia de hialina sin oclusión patente de luces en menos del 50% de las arteriolas, (2) Presencia de hialina sin oclusión patente de luces entre el 50-100% de las arteriolas o con oclusión de luces en menos del 25% de las arteriolas, (3) Presencia de hialina con oclusión patente de las luces en 50-100% de las arteriolas
- ELASTOSIS MIOINTIMAL: (0) Ausencia, (1) Engrosamiento intimal con reducción entre el 0-20% de la luz arterial, (2) Engrosamiento intimal con reducción entre el 20-50% de la luz arterial, (3) Engrosamiento intimal con reducción de más del 50% de la luz arterial
- ATROFIA TUBULAR Y CILINDROS: (0) Ausencia, (1) Atrofia afectando a menos de 4 campos por cada 20 de 40x escogidos al azar y/o muy ocasionales cilindros (2) Atrofia afectando entre 4-10 campos por cada 20 de 40x y/o al menos 1 cilindro por campo de 40x, (3) Atrofia afectando a más del 50% de 10 campos de 40x y/o presencia de cilindros patentes en todos los campos.
- INFILTRADO INFLAMATORIO: (0) Ausencia, (1) infiltrado inflamatorio en menos de 3 campos por cada 20 de 40x escogidos al azar (2) infiltrado inflamatorio entre 3-8 campos por cada 20 de 40x, (3) infiltrado inflamatorio en más de 8 campos entre 20 de 40x.
- FIBROSIS INTERTICIAL*: (0) Ausencia, (1) Fibrosis afectando a menos de 3 campos por cada 20 de 40x escogidos al azar, (2) Fibrosis afectando entre 3-8 campos por cada 20 de 40x, (3) Fibrosis afectando a más de 8 campos entre 20 de 40x.

* Para deslindarla de la atrofia tubular se valorará la presencia de áreas desprovistas de al menos el 50% de los túbulos que normalmente deberían estar presentes en las mismas.

y del daño isquémico (13). El gen del angiotensinogeno, a través de su producto la angiotensina II, también está relacionado con la inducción de fibrosis intersticial en modelos experimentales, como demuestra el hecho de que el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II o los bloqueadores del receptor de la angiotensina II frenan la progresión de la fibrosis (14). Por último, El gen MDR1 cuyo producto es la glicoproteína-P, en contraposición a los anteriores, se encuentra relacionado con los mecanismos de detoxificación de xenobióticos y metabolitos endógenos principalmente en los túbulos proximales renales (15) y por tanto, su adecuada expresión podría evitar en parte las lesiones en el parenquima renal.

El propósito de este trabajo es incidir en la importancia del estudio morfológico protocolizado de las lesiones renales en donantes añosos, mediante un sistema de puntuación: mostrar nuestra experiencia en el procesamiento acelerado de las biopsias con el empleo de hornos de microondas especiales para laboratorio y presentar un estudio preliminar de posibles marcadores moleculares de lesión renal.

Material y métodos

45 cuñas renales (22 de riñón derecho y 23 de riñón izquierdo) procedentes de 23 donantes (30.7% mujeres y 69.2% hombres) fueron utilizadas para llevar a cabo el estudio morfológico y molecular. La media de edad de los donantes fue 62.4 años (rango 53-77). Las muestras tisulares recibidas en fresco fueron seccionadas y procesadas, la mitad fue congelada introduciéndola en 2-metilbutano (Merck, Darmstadt, Alemania) enfriado a -50 °C durante 5-

10 segundos en nitrógeno líquido y el resto fijado en Preserve(tm) (mezcla fijadora compuesta de glyoxal y alcohol en baja concentración) (Vitro S.A., Sevilla, España) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación se procedió a su inclusión acelerada en parafina empleando un horno de microondas con control de temperatura y potencia (Energy Beam Science Inc. modelo H2800/2, potencia de 1800 vatios, Vitro S.A., España) según el protocolo siguiente: fijación en Preserve(tm) a 55°C durante 8 minutos, seguido de dos cambios en alcohol absoluto a 67°C durante 4 y 2 minutos, respectivamente: dos cambios en alcohol isopropílico a 74°C de 4 y 2 minutos y por último inmersión en Parafina a 83°C durante 8 minutos. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS) y tricrómico de Masson, también empleando procedimientos de tinción acelerada con el mismo horno de microondas.

Para la valoración morfológica de las lesiones glomerulares, tubulares, intersticiales y vasculares en las cuñas renales se estableció un nuevo sistema de puntuación semicuantitativa, extraído de las conclusiones del grupo de anatomía patológica del "taller de trabajo sobre trasplante de riñones subóptimos" (8, 9), que se detalla en la tabla I.

- Procedimientos de biología molecular:

Sobre el tejido renal congelado se determinó el mRNA de los principales mediadores moleculares de lesión: TGF-β1, endotelina 1, angiotensinógeno y MDR1 (glicoproteína P), mediante técnica de RT-PCR.

- Protocolo de extracción del RNA.

El aislamiento del RNA celular total se realizó a partir del tejido congelado a -80 °C: Tras su homogenización en solución de isotiocianato de guanidina, se procedió a la extracción fenólica y posterior precipitación con etanol, siguiendo la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (16). El RNA purificado disuelto en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) una vez valorado espectrofotométricamente a 260/280 nm fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

- Síntesis de cDNA y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El cDNA fue sintetizado a partir de 2 µg de RNA celular total y 100 ng de cebador oligo dT (Promega, Madison, WI, USA); cada 20 µl de reacción contenía 500 µM de dNTPs, 1U/µl de inhibidor de las ribonucleasa: RNasin; (Promega) y 10 U/µl de Transcriptasa Inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Promega). La transcripción inversa se realizó durante 40 minutos a 37 °C. Como control interno de la cantidad de RNA de partida de cada muestra, se amplificó un fragmento del gen de la β₂-microglobulina humana. Las reacciones de PCR para los genes MDR-1, TGFβ, endotelinas 1, angiotensinógeno y β₂-microglobulina, se llevaron a cabo en tubos independientes con el cDNA procedente de 100 ng de RNA total y 1U de Taq DNA polimerasa termoestable (DyNAZyme™ II DNA polymerasa) (Vitro SA). Las condiciones de amplificación se optimizaron para cada gen a amplificar en particular.

Para el cDNA de cada marcador se emplearon los pares de primers sintéticos que se especifican en la tabla 2. Cada primer 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, CA, USA).

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 β₂-microglobulina como control interno, para normalizar la cantidad de material de partida de cada muestra. Como control de expresión de los marcadores en el riñón se emplearon 15 biopsias renales de adultos menores de 50 años (media 40±8 años).

Resultados

Con respecto a la función renal de los donantes añosos, los valores de creatinina fueron normales en el 100% de los casos, en un 14% se detectó hematuria o glucosuria y no presentaban albuminuria. El 23.2% de los donantes tenían antecedentes de hipertensión arterial.

Los resultados obtenidos del procesamiento acelerado y posteriores tinciones histoquímicas en horno de microondas, permitieron en el plazo máximo de dos horas y media, obtener secciones histológicas equiparables a las conseguidas con el procesamiento habitual lo que facilitó la valoración de las lesiones histopatológicas. Como se aprecia en las imágenes obtenidas con este procedimiento (figura 1) las lesiones fueron fácilmente identificables gracias a la calidad conseguida en el procesamiento del tejido y en las técnicas histoquímicas.

Se analizaron todos los glomérulos y vasos presentes en la muestra considerando como:

Muestra adecuada: 25 glomérulos o más y al menos dos arterias interlobulillares y/o arcuatas. Muestra marginal: 15-25 glomérulos y al menos una arteria interlobuli-

TABLA II. PARES DE "PRIMERS" O CEBADORES EMPLEADOS PARA LA SÍNTESIS DE CDNA

cDNA	Primers sintéticos	Tamaño
Endotelina 1	Sense 5'-GCTCCTGCTCCTCCTTGATGG-3'	360-pb
	Antisense 5'-TCTTGATGCTGTTGCTGATGG-3'	
Angiotensinógeno	Sense 5'-CTGCAAGGATCTTATGACCTGC-3'	217-pb
	Antisense 5'-TACACAGCAAACAGGAATGGGC-3'	
TGF-β1	Sense 5'-CTGCGGATCTCTGTGTCATT-3' y	246-pb
	Antisense 5'-CTCAGAGTGTGCTATGGTG-3'	
MDR-1	Sense 5'-CCCATCATTGCAATAG CAGG-3'	167-pb
	Antisense 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'	
β ₂ -microglobulina	Sense 5'-ACCCCCACTGAAAAGAT GA-3'	120-pb
	Antisense 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	

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

llar o arcuata. Muestra inadecuada: Menos de 15 glomérulos y/o ausencia de arterias. Con estos criterios el 91.1% de las biopsias fueron consideradas como muestras adecuadas, el 5.8% como muestras marginales y sólo el 2.9% como muestras inadecuadas.

La prevalencia de las lesiones en los riñones de donantes mayores de 60 años fue elevada (tabla 3). Estas lesiones fueron principalmente glomerulares, el 23.8% de las biopsias presentaron esclerosis glomerular mayor del 20%, 34.1% entre el 10-20%, 26.8% entre 0-10% y sólo en dos casos no existió glomerulosclerosis. La fibrosis capsular estuvo presente en más de la mitad de las biopsias, siendo de grado leve en el 47.6%. La quistificación glomerular afectó al 51.2% de las biopsias, aproximadamente el 50% fueron grados 0 ó 1 y sólo en un caso afectó a más del 40% de los glomérulos. Las lesiones vasculares (arteriosclerosis, arteriopatía hialina y elastosis miointimal) afectaron al 51.2% de las cuñas renales, siendo la arteriopatía hialina en el 10.5% y la elastosis miointimal en el 17.5% de las muestras de carácter moderado o severo (tabla 3). Las lesiones túbulointersticiales como la atrofia tubular y fibrosis intersticial fueron patentes en más del 90% de las biopsias, si bien con variables grados de intensidad como se indica en la tabla 3.

TABLA III. VALORACIÓN DE LAS LESIONES VASCULARES Y TUBULOINTERSTICIALES RENALES EN DONANTES AÑOSOS.

Arteriopatía hialina	44.7%	44.7%	7.9%	2.6%
Elastosis miointimal	42.5%	40.0%	15.0%	2.5%
Atrofia Tubular	0.0%	75.6%	21.9%	2.4%
Cilindros tubulares	37.5%	45.0%	17.5%	0.0%
Fibrosis intersticial	7.5%	72.5%	25.0%	5.0%
Inflamación intersticial	57.1%	33.3%	7.1%	2.3%

Las puntuaciones globales obtenidas empleando el protocolo comentado en la tabla 1 nos hicieron recomendar como no aptos para trasplante el 33.5% de los riñones (puntuación media 10,8) y en un 20.9% de los casos (puntuación media 8,3) se aconsejó que el receptor del órgano fuera mayor de 60 años. Aptos para cualquier receptor fueron el 46.5% de los injertos (puntuación media de 5,5).

En dos casos, fue detectada la presencia de un adenocarcinoma de células claras y un carcinoma oculto de células transicionales. Ambas lesiones descubiertas en el momento de la extracción de los órganos tras el estudio microscópico.

La expresión media de mRNA de los cuatro mediadores de lesión valorados en los riñones de donantes añosos, se encontró por encima de la que presentaron los riñones control (figura 2). En todos los casos estas diferencias fueron estadísticamente significativa ($p < 0.05$, t de Student).

Lesiones glomerulares

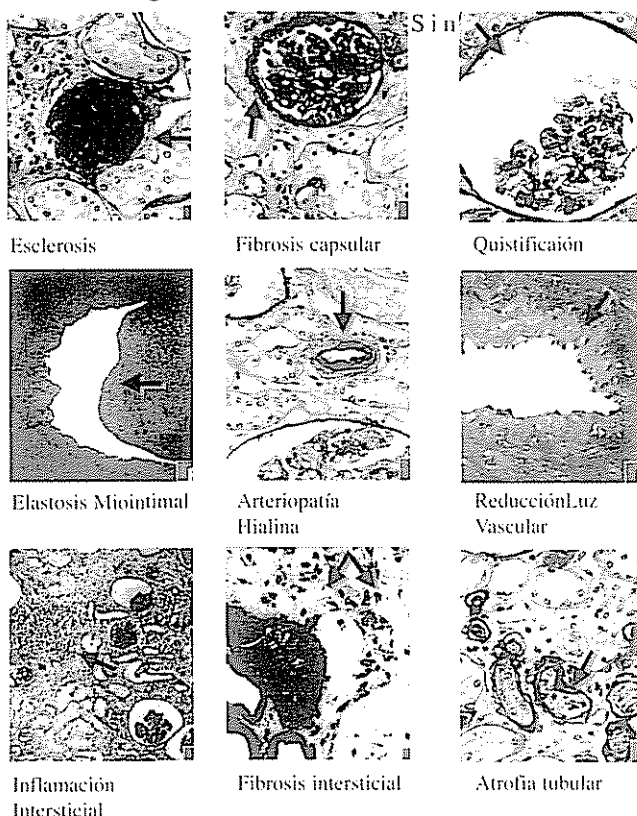
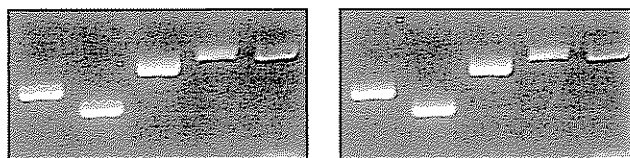


Figura 1. Principales lesiones valoradas en el protocolo de estudio de biopsias renales de donante añoso. Muestras con inclusión acelerada en parafina mediante horno de microondas. A) Glomerulosclerosis (PAS 400x). B) Fibrosis capsular (PAS 400x). C) Quistificación glomerular (PAS 600x). D) Elastosis miointimal (H&E 40x). E) Arteriopatía hialina (PAS 600x). F) Arteriosclerosis (H&E 40x). G) Infiltrado inflamatorio en parches rodeando glomérulos con quistificación y esclerosis (PAS 100x). H) Fibrosis intersticial (Tricrómico de Masson 400x). I) Atrofia tubular con refuerzo y duplicación de membranas basales (PAS 400x).

MDR1 B2M ET1 TGFB1 ANG



Riñones control (n=15)		Riñones Donante añoso (n=45)	
MDR1	0,338 ± 0,23	MDR1	0,403 ± 0,18*
ET-1	0,156 ± 0,16	ET-1	0,227 ± 0,18*
TGFB-1	0,198 ± 0,14	TGFB-1	0,286 ± 0,15*
Angiotens.	0,055 ± 0,07	Angiotens.	0,101 ± 0,07**

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa. Niveles de expresión de mRNA de TGF- β 1, Endotelina 1 (ET1), Angiotensinógeno (ANG) y MDR1 obtenidos por RT-PCR en los riñones de donantes añosos y en los riñones control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ t de Student.

embargo, ninguno de los marcadores estudiados tuvo relación con el grado de lesión morfológica (figura 3). Así las tres categorías (apto, apto para receptor añoso y no apto para trasplante), que se obtuvieron en función de la puntuación del protocolo utilizado, mostraron niveles de expresión de mRNAs muy parecidos, sin que se apreciaran diferencias estadísticas significativas.

Discusión

Las lesiones morfológicas renales guardan relación con la edad, especialmente la alteraciones glomerulares, vasculares e intersticiales (glomeruloesclerosis, arteriosclerosis, arteriopatía hialina y la fibrosis intersticial) (7). Con la edad el número de glomerulos disminuye entre el 30-50% con incremento del porcentaje de esclerosis o anomalías glomerulares, las estructuras vasculares sufren engrosamiento de la intima, duplicación de la lámina interna e hialinización (17). Sin embargo los cambios morfológicos asociados a la edad muestran considerables variaciones individuales que en general no pueden ser determinadas exclusivamente por la evaluación de la función renal.

MDR1 B2M ET1 TGFβ1 ANG



	Aptos (n=16)	Aptos para receptores añosos	No aptos
MDR1	0,393±0,20	0,360±0,17	0,392±0,19
ET1	0,292±0,20	0,270±0,26	0,116±0,11
TGFβ	0,335±0,14	0,245±0,10	0,284±0,19
Angiotens	0,116±0,09	0,070±0,10	0,092±0,08

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa. Niveles de expresión de mRNA de TGF-β1, Endotelina 1 (ET1), Angiotensinógeno (ANG) y MDR1 obtenidos por RT-PCR agrupados en función de la puntuación global de las lesiones morfológica de los riñones de donates añosos. Análisis de la varianza no significativo.

La biopsia en donantes añosos puede añadir importante información sobre la validez del riñón para el trasplante. El binomio estructura-función aplicado a la valoración de la idoneidad de los riñones de donantes añosos aún no está definitivamente aclarado. En los trabajos que se aduce que la biopsia renal carece de utilidad, no están suficientemente definidos los parámetros histopatológicos estudiados y en general en ellos se ha realizado un análisis de supervivencia del injerto muy superficial (18, 19). Sin embargo la mayoría de los trabajos concluyen que la biopsia renal puede definir la intensidad de los cambios involutivos y de este modo permitir conocer el estado del parenquima renal (7, 18, 20) e incluso que los parámetros histopatológicos presentes en la biopsia pueden ser factores predictores independientes de la función renal (18). La primera aproximación de Gaber y colaboradores que establecieron el porcentaje de glomeruloes-

clerosis > ó < 20% como único criterio morfológico de aceptación del injerto renal y como predictor de la función renal (21), pronto quedó demostrado, que era absolutamente insuficiente para decidir sobre la viabilidad futura del injerto (7).

Karpinski y colaboradores recientemente aplicando un protocolo de valoración semicuantitativa de lesiones vasculares, glomerulares y tubulointersticial postulan que el estudio de la función y estructura de los donantes de alto riesgo son necesarios para obtener un buen resultado en el trasplante y concluyen que el cálculo del aclaramiento de creatinina junto a la valoración de las lesiones vasculares pueden predecir la función renal en el receptor y son de utilidad para seleccionar a los donantes de alto riesgo (20). Los riñones de donante que tienen una puntuación global igual o superior a 6, empleando su sistema de puntuación, se asocian con un 100% de incidencia de retraso en el inicio de la función renal en el receptor (20).

El tamaño y tipo de biopsia es también importante. Muruve considera que realizar la valoración sobre cuñas renales no es reproducible y tiende a sobreestimar lesiones como la glomeruloesclerosis, dado que este tipo de lesión tiene más prevalencia cerca de la corteza que en los glomerulos más profundos (22). Sin embargo, emplear cuñas supone obtener una adecuada cantidad de parénquima renal con un número de glomerulos y de vasos suficientes para realizar un adecuado estudio, que nunca se puede alcanzar con muestras procedentes de cilindros renales (7).

Nosotros hemos establecido un algoritmo de decisión sobre la base de la puntuación morfológica global de las lesiones que pueden acontecer en el envejecimiento renal. Hemos considerando como riñón apto para cualquier receptor la puntuación <5; riñón apto para donante añoso la puntuación entre 5-8; riñones para trasplante doble la puntuación entre 9-12 y no aptos para trasplantes la puntuación >12 ó puntuación de 3 en glomeruloesclerosis, arteriopatía hialina y elastosis miointimal (o alternatively, o la puntuación acumulada por encima de 8 puntos en estas tres lesiones). Con estos criterios El 46% de los riñones fueron aptos para trasplante cuatro de ellos solo para receptores añosos y cuatro para trasplante doble.

Analizados los criterios macro y microscópicos seguidos en el documento de consenso para los donantes mayores de 60 años y de 75 años (3), creemos que son menos selectivos que los empleados por nosotros (8, 9). Comparativamente siguiendo estos criterios sólo hubieran sido descartados cinco de los riñones estudiados, se hubieran recomendado diez para trasplante doble y el resto hubieran sido informados como aptos para trasplante simple. No obstante como en dicho trabajo se menciona (3), una vez analizada la severidad de las lesiones intersticiales y vasculares en las biopsias, se hubiera reducido con toda seguridad el número real de riñones aptos para trasplante. Quizás el problema radica en que, en el documento de consenso no se especifica como valorar o establecer una puntuación de dichas lesiones. Además, el hecho de

valorar las biopsias renales sobre cortes criostáticos dificulta la interpretación de algunas de las lesiones. Con el nuevo sistema de puntuación la categorización y la optimización del receptor quedan más explícitas y los resultados son fácilmente interpretables. El protocolo que empleamos tiene en cuenta un mayor número de lesiones y detalla un sistema concreto de puntuación que puede aportar homogeneidad en los resultados entre diferentes patólogos. Con la todavía corta experiencia de la que disponemos, creemos que los criterios seguidos están permitiendo una buena selección de los órganos, a tenor de los resultados preliminares del seguimiento de los pacientes trasplantados. No obstante, no hemos analizado aún la repercusión que sobre la función y la supervivencia del injerto pueda tener a largo plazo.

El disponer de tejido incluido en parafina de forma rápida, controlada y en un intervalo de tiempo razonable (1 hora) mediante horno de microondas es importante porque facilita el procesamiento, la tinción y el estudio morfológico haciendo posible analizar con más exactitud las lesiones. En un estudio realizado en paralelo con el material congelado, el porcentaje y la intensidad de las lesiones se infravaloran, se puntúan aproximadamente un 10% menos de glomerulosclerosis y lesiones como la arteriopatía hialina con tinción de hematoxilina-eosina puede pasar desapercibidas en los cortes criostáticos por falta de definición y por no emplear las técnicas histoquímicas idóneas para la valoración de cada lesión específica.

Los resultados preliminares mostrados en el trabajo sobre los marcadores moleculares de lesión indican que los niveles de expresión de TGF β 1, Endotelina, Angiotensinógeno, se encuentran incrementados con la edad, pero no han permitido relacionar la puntuación global de las lesiones, en los diferentes compartimentos tisulares renales, con los niveles de expresión de los marcadores moleculares. La explicación tal vez sea que cada marcador está involucrado en la alteración de estructuras específicas como vasos o intersticio y hemos intentado relacionar los niveles de expresión con la totalidad de las lesiones.

Por último consideramos, que la realización de una biopsia protocolizada del injerto en donantes añosos es de trascendental importancia. Esta sistemática nos permitiría conocer y establecer la severidad de las lesiones vasculares, glomerulares y tubulointersticiales, así como saber, en el caso de realizar una biopsia postrasplante, si las lesiones que observamos corresponden a lesiones preexistentes o de novo.

Agradecimientos

A la generosidad de los donantes de órganos. A los doctores Fernández Alonso, García González, López Rubio, Pérez Requena y Palomo, por su contribución en la elaboración y discusión del protocolo de trabajo sobre biopsias de donante añoso.

Bibliografía

1. J. LIOVERAS. The elderly donor. *Transplant Proc* 23: 2592-2594, 1991.
2. C. KAPLAN, B. PATERNACK, H. SHAH, G. GALLO. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am J Pathol* 80: 227-230, 1975.
3. JM. MORALES, A. ANDRÉS, L. PALLARDÓ, L. CAPDEVILA, JM. CAMPISTOL, JM. GIL VERNET, JM. GRINYO, F. OPPENHEIMER, I. LAMPREAVE, F. VALDÉS, D. DEL CASTILLO, JM. GONZÁLEZ POSADA, F. ANAYA, L. OROFINO, R. MARCÉN, M. GONZÁLEZ MOLINA, M. ARIAS. GRUPO DE ESTUDIO FORUM RENAL. Trasplante renal en pacientes de edad avanzada con un riñón de donante añoso. *Nefrología XVIII(supl. 5):* 32-46, 1998.
4. R. SHAPIRO, C. VIVAS, P. SCANTLEBURY, ML. JORDAN, HA. GRITSCH, J. NEUGARTEN, J. MCCAULEY, P. RANDHAWA, W. IRISH, JJ. FUNG, T. HAKALA, RL. SIMMONS, TE. STARZL. Suboptimal kidney donors. *Transplantation* 62: 1242-1246, 1996.
5. PC. KUO, LB. JOHNSON, EJ. SCHWEITZER, EJ. ALFREY, J. WASKERWITZ, ST. BARTLETT. Utilization of the older donor for renal transplantation. *Am J Surgery* 172: 551-557, 1996.
6. H. BASAR, A. SORAN, R. SHAPIRO, C. VIVAS, VP. SCANTLEBURY, ML. JORDAN, HA. GRITSCH, J. MCCAULEY, P. RANDHAWA, W. IRISH, TR. HAKALA, JJ. FUNG. Renal transplantation in recipients over the age of 60; the impact of donor age. *Transplantation* 67: 1191-3, 1999.
7. E. POKORNÁ, S. VÍTKO, M. CHADIMOVÁ, O. SCHÜCK, H. EKBERG. Proportion of glomerulosclerosis in procurement wedge renal biopsy cannot alone discriminate for acceptance of marginal donors. *Transplantation* 69: 36-43, 2000.
8. R. GARCÍA DEL MORAL, J. FERNÁNDEZ ALONSO, I. GARCÍA GONZÁLEZ, LÓPEZ RUBIO, J. PÉREZ REQUENA, MJ. PALOMO. Conclusiones del grupo de trabajo de anatomía patológica acerca del taller de trabajo sobre trasplante de riñones subóptimos. Sevilla 30 de junio, 1998.
9. F. O'VALLE, M. GÓMEZ-MORALES, A. OSUNA, M. AGUILAR, A. OLMO, J. BRAVO, ME. REGUERO, B. ESPIGARES, D. AGUILAR, C. ASECIO, RG. DEL MORAL. Valoración protocolizada de la biopsia renal de donante añoso. Propuesta de un nuevo sistema de puntuación. *Nefrología XX (suplemento 4):* 83, 2000.
10. WA. BORDER, NA. NOBLE. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 331: 1286-1292, 1994.
11. VK. SHARMA, RM. BOLOGA, GP. XU, B. LI, J. MOURADIAN, J. WANG, D. SERUR, V. RAO, M. SUTHANTHIRAN. Intra-graft TGF- β 1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49: 1297-1303, 1996.
12. M. KETTELER, NA. NOBLE, WA. BORDER. Transforming growth factor beta and angiotensin II. The missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Annu Rev Physiol* 57: 279-295, 1995.
13. C. RAMÍREZ, A. OLMO, F. O'VALLE, F. MASSEROLI, M. AGUILAR, M. GÓMEZ-MORALES, F. REVELLES, MJ. GARCÍA-CHICANO, F. ARREBOLA, ME. REGUERO, RG. DEL MORAL. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3 and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats.

- Exp Nephrology 8: 161-172, 2000.
14. EA. BURDMANN, TE. ANDOH, CC. NAST, A. EVANS, BA. CONNORS, TM. COFFMAN, J. LINDSLEY, WM. BENNETT. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* 269: F491-F499, 1995.
 15. RG. DEL MORAL, A. OLMO, M. AGUILAR, F. O'VALLE. P-glycoprotein: A new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 6: 89-97, 1998.
 16. P. CHOMCZYNSKI, N. SACCHI. Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
 17. WW. BROWN, BB. DAVIS, LA. SPRY, Wongsurawat N, Malone JD, Domoto DT. Aging and the kidney. *Arc Intern Med* 146:1790, 1986.
 18. PS. RANDHAWA, MI. MINERVINI, M. LOMBARDERO, R. DUQUESNOY, J. FUNG, R. SHAPIRO, M. JORDAN, C. VIVAS, V. SCANTLEBURY, A. DEMETRIS. Biopsy of marginal donors kidneys: Correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation* 69: 1352-1357, 2000.
 19. LE. RATNER, V. JOSEPH, G. ZIBARI, S. PATEL, WR. MALEY, D. KITTUR, J. BURDICK, J. OLSON. Related Articles. Transplantation of kidneys from hypertensive cadaveric donors. *Transplant Proc.* 27: 989-90, 1995.
 20. J. KARPINSKI, G. LAJOIE, D. CATTRAN, S. FENTON, J. ZALTZMAN, C. CARDELLA, E. COLE. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation* 67: 1162-1167, 1999.
 21. LW. GABER, LW. MOORE, RR. ALLOWAY, MH. AMIRI, SR. VERA, AO. GABER. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation* 60: 334-339, 1995.
 22. NA. MURUVE, KM. STEINBECKER, AM. LUGER. Are wedge biopsies of cadaveric kidneys obtained at procurement reliable? *Transplantation* 69: 2384-2388, 2000.