

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^a, C. Asensio^a, R.G. del Moral
Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario San Cecilio. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. ^a**Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.**
Correspondencia: Dr. Francisco O'Valle Ravassa. Avda. de Madrid, s/n. Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. E-18012 Granada. España. Fax: 958 243 510. E-mail: fovalle@ugr.es

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 donantes añosos.

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 donantes añosos conducen a un incremento de la ausencia de la 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 intensidad, patologías secundarias a hipertensión arterial, arteriosclerosis o diabetes, y 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 ayuda a decidir sobre la viabilidad del injerto. Una vez comprobado que el tamaño de los riñones es normal (no hay atrofia o malformaciones), que se decapsula bien y que la superficie es lisa (lo que sugiere ausencia de secuelas fibrosas por procesos infecciosos), se comprueba el grado de afectación vascular, y se descartan estenosis agudas de origen aterosclerótico. El equipo de extracción dictamina la idoneidad

de los riñones para el 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], sobre todo 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 I) [8,9]. La valoración global de las lesiones glomerulares, vasculares y tubulointersticiales requiere una adecuada preservación de los detalles morfológicos, que las secciones en congelación no proporcionan, por ello recurrimos al empleo de un horno 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 la hipertensión arterial intrarrenal y del daño isquémico [13]. El gen del angiotensinógeno, 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], por tanto, su adecuada expresión podría evitar en parte las lesiones en el parénquima 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 microondas especiales para laboratorio y presentar un estudio preliminar de posibles marcadores moleculares de lesión renal.

PACIENTES 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) se utilizaron para llevar a cabo el estudio morfológico y molecular. La media de edad de los donantes fue de 62,4 años (rango 53-77). Las muestras tisulares que se recibieron en fresco se seccionaron y procesaron; la mitad se congeló introduciéndola en 2-metilbutano (Merck, Darmstadt, Alemania), enfriada a -50 °C durante 5-10 segundos en nitrógeno líquido, y el resto se fijó en Preserve™ (mezcla fijadora compuesta de glyoxal y alcohol en baja concentración) (Vitro S.A., Sevilla, España) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la prefijación se procedió a su inclusión acelerada en parafina, empleando un horno microondas con control de temperatura y potencia (Energy Beam Science Inc. modelo H2800/2, potencia de 1.800 W, Vitro S.A., España), según el protocolo siguiente: refijación en Preserve a 55 °C durante ocho minutos, seguido de dos cambios en alcohol absoluto a 67 °C durante cuatro y dos minutos; dos cambios en alcohol isopropílico a 74 °C de cuatro y dos minutos, y por último inmersión en parafina a 83 °C durante ocho minutos. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS) y tricrómico de Masson, también empleando procedimientos de tinción acelerada con el mismo horno 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.

Tabla I. Nuevo protocolo de evaluación de biopsias renales de donantes añosos con inclusión en parafina acelerada mediante horno 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 que afecta a menos de cuatro campos por cada 20 de 40x escogidos al azar o muy ocasionales cilindros. (2) Atrofia que afecta entre 4-10 campos por cada 20 de 40x o al menos un cilindro por campo de 40x. (3) Atrofia que afecta a más del 50% de 10 campos de 40x o presencia de cilindros patentes en todos los campos.
Infiltrado inflamatorio	(0) Ausencia. (1) Infiltrado inflamatorio en menos de tres 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 ocho campos entre 20 de 40x.
Fibrosis intersticial ^a :	(0) Ausencia. (1) Fibrosis que afecta a menos de tres campos por cada 20 de 40x escogidos al azar. (2) Fibrosis que afecta entre 3-8 campos por cada 20 de 40x. (3) Fibrosis que afecta a más de ocho campos entre 20 de 40x.

^a 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.

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 Sachi [16]. El RNA purificado disuelto en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), una vez valorado espectrofotométricamente a 260/280 nm, se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El cDNA se sintetizó 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, 1 U/µL de

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'-GTTCAAACCTCTGCTCCTGA-3'	
β ₂ -microglobulina	Sense 5'-ACCCCACTGAAAAAGAT 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.

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, TGF-β, endotelinas 1, angiotensinógeno y β₂-microglobulina se llevaron a cabo en tubos independientes con el cDNA, procedente de 100 ng de RNA total y 1 U de Taq DNA polimerasa termoestable (DyNAZyme™ II DNA polimerasa) (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 II. Cada *primer* se adicionó a una concentración final de 25 pM 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 programa informático Visilog 4.1 (Noesis, Velizy, France). Los datos se estandarizaron empleando 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,

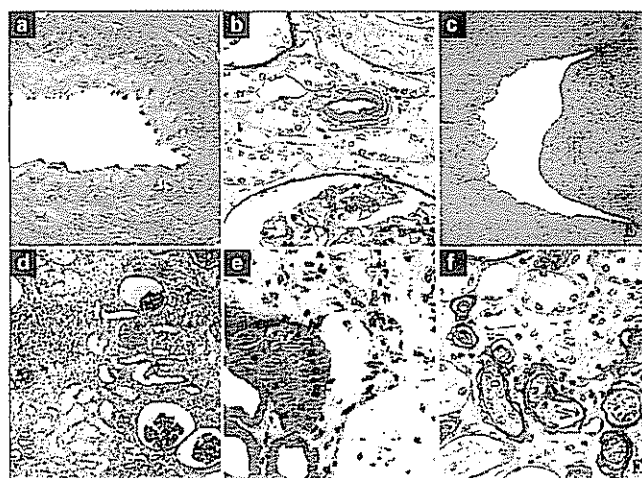


Figura 1. Lesiones vasculares: a) elastosis miointimal. b) arteriopatía hialina. c) reducción luz vascular. Lesiones túbulointersticiales: d) inflamación intersticial. e) fibrosis intersticial. f) atrofia tubular. Principales lesiones valoradas en el protocolo de estudio de biopsias renales de donante añoso. Muestras con inclusión acelerada en parafina mediante horno microondas. A) Glomeruloesclerosis (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 glomerulos 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).

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 que se obtuvieron del procesamiento acelerado y las posteriores tinciones histoquímicas en el horno 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 (Fig. 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 glomerulos y vasos presentes en la muestra, considerando como:

Muestra adecuada: 25 glomerulos o más y al menos dos arterias interlobulillares o arcuatas. Muestra marginal: 15-25 glomerulos y al menos una arteria interlobulillar o arcuata. Muestra inadecuada: menos de 15 glomerulos o ausencia de arterias. Con estos criterios el 91,1% de las biopsias se consideraron muestras adecuadas, el 5,8% muestras marginales y sólo el 2,9% muestras inadecuadas.

La prevalencia de las lesiones en los riñones de donantes mayores de 60 años fue elevada (Tabla III). 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 el 0-10% y sólo en dos casos no existió glomeruloesclerosis. La fibrosis capsular estuvo presente en más de la mitad de las biopsias, y en un 47,6% fue de grado leve. La quistificación glomerular afectó al 51,2% de las biopsias; aproximadamente el 50% fueron grados 0 o 1, y

Tabla III. Valoración de las lesiones vasculares y tubulointersticiales renales en donantes añosos.

	Ausencia (0)	Leve (1)	Moderada (2)	Aguda (3)
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%

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, la arteriopatía hialina en un 10,5% y la elastosis miointimal en un 17,5% de las muestras, de carácter moderado o agudo (Tabla III). Las lesiones tubulointersticiales, como la atrofia tubular y la fibrosis intersticial, fueron patentes en más del 90% de las biopsias, si bien con variables grados de intensidad, como se indica en la tabla III.

Las puntuaciones globales que se obtuvieron empleando el protocolo comentado en la tabla I nos hicieron recomendar como no aptos para el trasplante al 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. Un total de 46,5% de los injertos (puntuación media de 5,5) fueron aptos para cualquier receptor.

En dos casos se detectó la presencia de un adenocarcinoma de células claras y un carcinoma oculto de células transicionales. Ambas lesiones se descubrieron 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 (Fig. 2). En todos los casos, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$; t de Student). Sin embargo, ninguno de los marcadores estudiados tuvo relación con el grado de lesión morfológica (Fig. 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 mRNA 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 un incremento del porcentaje de esclerosis o anomalías glomerulares, las estructuras vasculares sufren un engrosamiento de la íntima, duplicación de la lámina interna e hialinización [17]. Sin

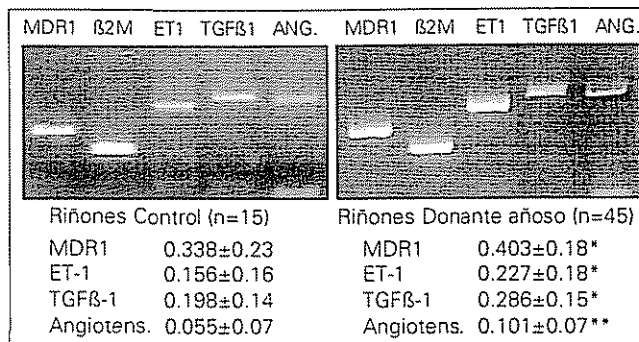


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa. Niveles de expresión de mRNA de TGF-β1, Endotelina 1 (ET1), Angiotensinógeno (ANG) y MDR1 obtenidos por RT-PCR en los riñones de donantes añosos y en los riñones control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; t de Student.

embargo, los cambios morfológicos asociados a la edad muestran considerables variaciones individuales, que en general no pueden determinarse exclusivamente por la evaluación de la función renal.

La biopsia en donantes añosos puede añadir una 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 parénquima renal [7,18,20]. Incluso los parámetros histopatológicos presentes en la biopsia pueden ser factores predictores independientes de la función renal [18]. La primera aproximación de Gaber et al, que establecieron el porcentaje de glomeruloesclerosis mayor o menor de 20%, como único criterio morfológico de aceptación del injerto renal y como predictor de la función renal [21], pronto quedó demostrada que era absolutamente insuficiente para decidir sobre la viabilidad futura del injerto [7].

Karpinski et al, 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. Concluyen que el cálculo del aclaramiento de creatinina junto a la valoración de las lesiones vasculares pueden predecir la función renal en el receptor, además de ser de utilidad para seleccionar a los donantes de alto riesgo [20]. Los riñones de donante que tienen una puntuación global igual o superior a seis, 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 pre-

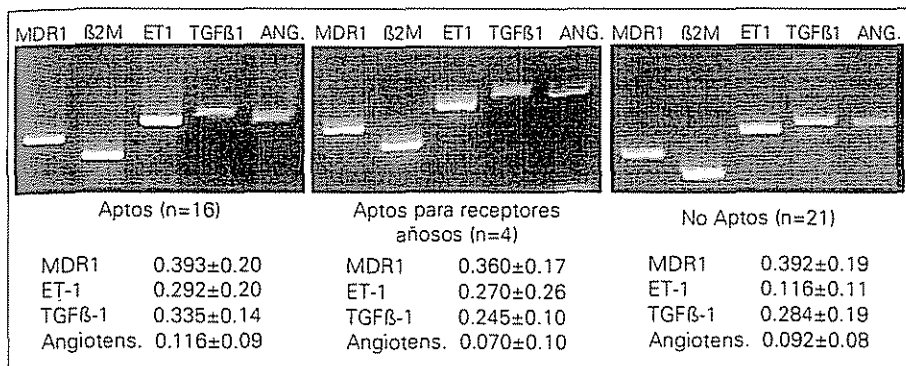


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa. Niveles de expresión de mRNA de TGF-β1, endotelina 1 (ET1), angiotensinógeno (ANG) y MDR1 obtenidos por RT-PCR, agrupados en función de la puntuación global de las lesiones morfológicas de los riñones de donantes añosos. Análisis de la varianza no significativo.

valencia cerca de la corteza que en los glomérulos más profundos [22]. Sin embargo, emplear cuñas supone obtener una adecuada cantidad de parénquima renal con un número de glomérulos 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 año la puntuación entre 5-8; riñones para trasplante doble, entre 9-12, y no aptos para trasplantes >12 o puntuación de 3 en glomeruloesclerosis, arteriopatía hialina y elastosis miointimal (alternativamente, 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 sólo 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 se habrían descartado cinco de los riñones estudiados, se habrían recomendado 10 para trasplante doble y el resto se habría considerado como aptos para trasplante simple. No obstante, como en dicho trabajo se menciona [3], una vez analizada la intensidad de las lesiones intersticiales y vasculares en las biopsias, se habría reducido con toda seguridad el número real de riñones aptos para trasplante. Quizá el problema radica en que en el documento de consenso no se especifica cómo 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 segui-

miento 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 (una hora) mediante horno microondas es importante, porque facilita el procesamiento, la tinción y el estudio morfológico, y hace 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 glomeruloesclerosis, y lesiones como la arteriopatía hialina con tinción de hematoxilina-eosina pueden 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-β1, endotelina y 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. 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 intensidad 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*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lioveras J. The elderly donor. *Transplant Proc* 1991; 23: 2592-4.
2. Kaplan C, Paternack B, Shah H, Gallo G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am J Pathol* 1975; 80: 227-30.
3. Morales JM, Andrés A, Pallardó L, Capdevila L, Campistol JM, Gil Vernet JM, et al, Grupo de Estudio Forum Renal. Trasplante renal en pacientes de edad avanzada con un riñón de donante año. *Nefrología* 1998; XVIII (Suppl 5): S32-46.

4. Shapiro R, Vivas C, Scantlebury P, Jordan ML, Gritsch HA, Neugarten J, et al. Suboptimal kidney donors. *Transplantation* 1996; 62: 1242-6.
5. Kuo PC, Johnson LB, Schweitzer EJ, Alfrey EJ, Was-kerwitz J, Bartlett ST. Utilization of the older donor for renal transplantation. *Am J Surgery* 1996; 172: 551-7.
6. Basar H, Soran A, Shapiro R, Vivas C, Scantlebury VP, Jordan ML, et al. Renal transplantation in recipients over the age of 60: the impact of donor age. *Transplantation* 1999; 67: 1191-3.
7. Pokorná E, Vítko S, Chadimová M, Schüick O, Ekberg H. Proportion of glomerulosclerosis in procurement wedge renal biopsy cannot alone discriminate for acceptance of marginal donors. *Transplantation* 200; 69: 36-43.
8. García del Moral R, Fernández-Alonso J, García-González I, López-Rubio, Pérez-Requena J, Palomo MJ. Conclusiones del grupo de trabajo de anatomía patológica acerca del taller de trabajo sobre trasplante de riñones subóptimos. Sevilla, 30 de junio, 1998.
9. O'Valle F, Gómez-Morales M, Osuna A, Aguilar M, Olmo A, Bravo J, et al. Valoración protocolizada de la biopsia renal de donante añoso. Propuesta de un nuevo sistema de puntuación. *Nefrología* 2000; XX (Suppl 4): 83.
10. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 1994; 331: 1286-92.
11. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF- β 1 mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996; 49: 1297-303.
12. Ketteler M, Noble NA, Border WA. Transforming growth factor beta and angiotensin II. The missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 279-95.
13. Ramírez C, Olmo A, O'Valle F, Masseroli F, Aguilar M, Gómez-Morales M, et al. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3 and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrology* 2000; 8: 161-72.
14. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evans A, Connors BA, Coffman TM, et al. Prevention of experimental cyclosporin-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol* 1995; 269: F491-9.
15. Del Moral RG, Olmo A, Aguilar M, O'Valle F. P-glycoprotein: A new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 1998; 6: 89-97.
16. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
17. Brown WW, Davis BB, Spry LA, Wongsurawat N, Malone JD, Domoto DT. Aging and the kidney. *Arc Intern Med* 1986; 146: 1790.
18. Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, Duquesnoy R, Fung J, Shapiro R, et al. Biopsy of marginal donors kidneys: Correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation* 2000; 69: 1352-7.
19. Ratner LE, Joseph V, Zibari G, Patel S, Maley WR, Kitzur D, et al. Related Articles. Transplantation of kidneys from hypertensive cadaveric donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 989-90.
20. Karpinski J, Lajoie G, Cattran D, Fenton S, Zaltzman J, Cardella C, et al. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation* 1999; 67: 1162-7.
21. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO. Glomerulosclerosis as a determinant of post-transplant function of older donor renal allografts. *Transplantation* 1999; 60: 334-9.
22. Muruve NA, Steinbecker KM, Luger AM. Are wedge biopsies of cadaveric kidneys obtained at procurement reliable? *Transplantation* 2000; 69: 2384-8.