
Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina
Departament de Medicina

Programa de Biopatologia en Medicina

Tesis Doctoral

**“Expresión de genes citoprotectores y de regeneración celular
tras el síndrome de isquemia-reperfusión en un modelo
experimental de trasplante renal con donantes a corazón
latiente y parado.”**

Memòria presentada pel
Sergio Lario García
per optar al grau de Doctor en Biologia

Director de tesis
Dr. Josep M^a Campistol Plana

Codiretor
Dr. Aleix Cases Amenós
Tutor
Dr. Albert Torras Rabasa

Nefrologia i Transplantament Renal
Institut Clínic de Urologia i Nefrologia (ICNU)
Universitat de Barcelona
Hospital Clínic, Barcelona.

Barcelona, Novembre de 2007.

A mi familia —mi querida hija, Júlia, mi
compañera de viaje, Cristina. A Albert, por sus
cenas espectáculo y a Irene por su efervescencia
adolescente.

A mis padres, Carmina y Joaquín, por sus sacrificios y por quererme tanto.

A mis tatos, Xavier y Virginia, por estar siempre ahí.

«La experiencia no es lo que te sucede,
sino lo que haces con lo que te sucede»

— Aldous Huxley

►Agradecimientos

«Entre dues explicacions, escull la més clara;
entre dues formes, la més elemental;
entre dues expressions, la més breu.»

—Eugeni d'Ors

Para unos el número trece es distintivo de mal augurio y para otros de buena suerte. Yo no lo sé, lo cierto es que son los años en los que he estado en Hormonal y en los que me he formado a múltiples niveles. Con esta tesis termino una etapa. Un período en el que he conocido y convivido con mucha gente y en el que he vivido de todo, desde lo mejor que me podía haber pasado —que ha sido haber conocido a Cristina, hasta momentos tristes por la pérdida de amigos.

Mi agradecimiento a todos.

Al Dr. Josep M^a Campistol, *Campis*, Director del Institut Clínic de Nefrologia i Urologia (ICNU) que tanto ha confiado en mi persona y trabajo, por su manera de pensar y hacer. Nada tarda tanto como lo que no se empieza. Gracias Campis por tu tiempo y dedicación.

Al Dr. Aleix Cases, Cap de Secció de Diàlisi del ICNU —mi primer jefe, codirector de este trabajo y sin el que, ciertamente, no hubiera continuado mi recorrido científico y al Dr. Albert Torras, Consultor del Servei de Nefrologia del ICNU i Professor Titular de la UB, por la ayuda prestada durante estos años.

A la Dra. Francisca Rivera-Fillat, Jefe de Servicio de Hormonología, por admitirme en su laboratorio en aquel año 1993...

Al Dr. Wladimiro Jiménez, Cap del Laboratori de Bioquímica y Genètica Molecular, por el apoyo recibido, por iniciar en su momento los estudios moleculares de cuyos protocolos y formalidades hemos aprendido todos tanto.

A los urólogos del ICNU: Dra. Pilar Luque, Dr. Diogo Mendes, Dr. Ricardo Álvarez y Dr. Antonio Álcara, por el desarrollo del modelo experimental de trasplante renal en cerdo en el Hospital Clínic y por dejarnos participar en sus investigaciones.

A la Dra Begoña Campos, profesora de la Unitat de Bioestadística de Departament de Salut Pública de la UB, por su paciencia en el análisis estadístico del modelo, y por los ánimos aportados durante estos años.

A los adjuntos de Hormonal, Dr. Josep Oriola—*primer on molecular biology* de tantos becarios, entre ellos yo mismo; y a Joan Gaya, Roser Casamitjana y M Jesús Mtz de Osaba.

Al Dr. Joan Clària, por los *isoprostanos sufridos compartidos*. A la Dra. Mercè Brunet, por aquel paseo *calmanervios* previo a la comunicación en Seattle.

A Mónica Bescós —mi compañera de pupitre. A tenor de la serie, ha de ser una niña, felicidades. A las Cristinas, la Mur y la Diez, y a Judith *It's up to you New York, New York*. A Pablo, Álex y Fritz, clínicos con un pie en el lab —alguno, el cuerpo entero. A la nueva etapa del grupo —iniciada con Elisenda y Mari, buena suerte.

A Alberto Leivas por los momentos compartidos —todos memorables. Por ser la alegría de la huerta, por ser mi colega en Hormonal, por invitarme a comer y tantas otras cosillas... Y como no, a Manolito, *my local hero*, y a la tercera del *pack*, Pepa Ros.

A Lluïsa Boqué y Toni Llorens, mi primera maestra en Hormonal y mi primer maestro fuera de él. Por su amistad, por su fuerza y por las ganas de hacer las cosas bien. Nunca te olvidaré Toni.

A les tietes del laboratori —Marga (al fin me llamaste por algo parecido a mi nombre: *Regio*), Leonor (*ese chorizo de Salamanca, vaya meriendas!*), Montse Guillén, Maite (*tú lo sabes, sólo me dejo pinchar por ti*), al cuarto de las Pilis (Pili y Pilar), Nuri, Cristina Ferrán, las Carmenes, Marina, a la señora María y a la Ana... en definitiva, una larga lista de señoras con las que hemos convivido otra larga serie de becarios y que nos han ido moldeando y aconsejando durante años.

Esa serie de becarios compartimos durante largo tiempo el camarote de los hermanos Marx: las *DNA girls* —Esther Titos, Marta López, Montsita; los *Nefro mates* —Blanca y Dani G, buena suerte en la *Poronpompeu*; y a Guillermo —*estupenz*, Pili C, Marce, Eva G, Nieves, Pau... A mis iniciadores en nefrología, los Drs Mariona Bono y Jordi Calls. Y como no, a los resis Manuel Pérez — *cúchame una cosa*, e Inma Iguala—*vaya ... de espía*.

A la *Unidad Cómica* —Loreto, MaryJoe, Montserrat, Leire y quien se quiso apuntar; por esos cafés matutinos, con tertulia digna de ser emitida. Sé que siempre estáis ahí.

A Fina Guasch, de Planificación y Control de Roche Diagnostics, por la confianza depositada en Alberto Leivas y en mi en los inicios de la PCR en tiempo real en Hormonal, por aquel año 2001.

A los Drs. Maria Molina y Antoni Xaubet, por las colaboraciones emprendidas y que llegaron a buen término.

A toda una serie de eficientes administrativos que me han facilitado multitud de tareas. Cruz, Roser, Laura y Dolors, gracias.

Por último, disculpas a los omitidos. He compartido tanto tiempo con tanta gente que seguramente me deje a alguien.

► **Índice**

Índice

Índice de Tablas y Figuras	<i>ix</i>
Publicaciones y presentaciones a congresos	<i>xi</i>
Glosario de abreviaturas	<i>xiii</i>

Introducción **1**

La obtención de órganos para trasplantes en España **3**

Alternativas para aumentar la obtención de órganos	
Tipos de donante a corazón parado	
Criterios de selección	
Procedimientos de extracción de órganos	
Experiencia tras la utilización de órganos de donante a corazón parado	

Isquemia-reperfusión y función retrasada del injerto **9**

Disfunción endotelial vascular en la isquemia renal	
Disfunción tubular en la isquemia renal	
Mecanismos de muerte celular en la isquemia renal	

Respuesta celular a la hipoxia **17**

Factor inducible por hipoxia-1	17
HIF en la fisiopatología renal	

Factor de crecimiento vascular endotelial	21
VEGF en la fisiología renal	
VEGF en el trasplante renal	

Hemoxigenasa-1	24
HO-1 en la fisiopatología renal	
HO-1 en el trasplante renal	

Óxido nítrico sintasas	30
NO en la fisiopatología renal	
NO en el trasplante renal	

Regeneración epitelial tubular	37	
Factor transformante del crecimiento- β 1	37	
TGF- β en la fisiopatología renal		
TGF- β 1 en la fibrosis renal		
Participación del TGF- β 1 en el trasplante renal		
TGF- β 1 y la lesión inmunológica aguda		
TGF- β 1 y la nefropatía crónica del trasplante renal		
Trombospondina-1	48	
Activación de TGF- β 1 por TSP-1		
TSP-1 en la fisiopatología renal		
TSP-1 y VEGF en la patología renal crónica		
Conexiones entre los sistemas HIF-1 y TGF-β	53	
Mecanismo de acción de la ciclosporina y la azatioprina	55	
Complicaciones a largo plazo del trasplante renal: NCIR	58	
Hipótesis y Objetivos	61	
Resultados	67	
Artículo 1	Expression of transforming growth factor- β 1 and hypoxia inducible factor-1 α in an experimental model of kidney transplantation. <i>Transplantation</i> 2003; 75: 1647-1654	69
Artículo 2	Thrombospondin-1 mRNA expression in experimental kidney transplantation with heart- and non-heart beating donors. <i>J Nephrol</i> 2007; 20: 588-595.	81
Discusión	93	
Conclusiones	105	

Apéndices	113
Apéndice I	117
Diseño del estudio	
Trasplante experimental en cerdo	
Apéndice II	119
Determinación de la expresión de TGF- β 1 por PCR competitiva	
Generación del estándar interno de DNA heterólogo (EI-MIMIC)	
Aislamiento del RNA total	
Retrotranscripción	
PCR cuantitativa para TGF- β 1	
Amplificación de <i>18S rRNA</i> como housekeeping	
Apéndice III	127
Cuantificación de por PCR en tiempo real con el sistema LightCycler	
Semicuantificación por PCR a tiempo real curvas standard de cDNA	
Optimización de la PCR en tiempo real	
Control de calidad, determinación de los coeficientes de variación	
Bibliografía	133

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1.	Mecanismos inducidos por la isquemia que conducen al daño renal.	11
Figura 2.	Mecanismos celulares y moleculares inducidos por la isquemia que conducen al rechazo agudo y al desarrollo de NCIR.	14
Figura 3.	Activación de HIF-1 por hipoxia.	17
Figura 4.	Reacción catalizada por la HO-1.	25
Figura 5.	Inductores de la HO-1.	27
Figura 6.	Efectos del NO.	33
Figura 7.	Etapas de la fibrogénesis renal.	45
Figura 8.	Las trombospondinas median el flujo de información desde la matriz extracelular a la célula.	49
Figura 9.	Relación entre HIF y TGF- β .	53
Figura 10.	Factores inmunológicos y no-inmunológicos de la NCIR.	58
<hr/>		
Tabla 1.	Estrategias para prevenir la lesión por isquemia-reperfusión.	15
Tabla 2.	Genes regulados por HIF.	19
Tabla 3.	Factores profibróticos en el riñón.	46
<hr/>		
Figura A1.	Diseño experimental del trasplante renal en cerdo con donantes a corazón latiente (HBD) y parado (NHBD).	117
Figura A2.	Procesos de generación del estándar interno de DNA heterólogo.	121
Figura A3.	PCR cuantitativa para TGF- β 1 y amplificación del 18S rRNA como <i>housekeeping</i> .	123
Figura A4.	Coefficientes de variación intraensayo del control de calidad para la PCR competitiva.	125
Figura A5.	Coefficientes de variación intraensayo del control de calidad para la PCR en tiempo real.	128
Figura A6.	Coefficientes de variación interensayo de los controles de calidad.	129
Figura A7.	Control de calidad de eficiencias.	129
Figura A8.	Comparativa de la PCR competitiva y la PCR en tiempo real en tiempo de trabajo.	130
<hr/>		
Tabla A1.	Comparativa de características de la cuantificación por PCR.	131

Los presentes resultados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. *Expression of transforming growth factor- β 1 and hypoxia-inducible factor-1 α in an experimental model of kidney transplantation.* Lario S, Mendes D, Bescós M, Iñigo P, Campos B, Alvarez R, Alcaraz A, Rivera-Fillat F, Campistol JM. *Transplantation* 2003; 75: 1647-1654.
2. *Thrombospondin-1 mRNA expression in experimental kidney transplantation with heart- and non-heart beating donors.* Lario S, Bescós M, Campos B, Mur C, Luque P, Alvarez R, Campistol JM. *J Nephrol* 2007; 20: 588-595.

y Congresos Nacionales e Internacionales:

1. *Papel del TGF- β 1 en la reparación tisular renal en un modelo experimental de síndrome de isquemia-reperfusión en trasplante renal.* Lario S, Mendes D, Iñigo P, Bescós M, Alcaraz A, Campistol JM. XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Zaragoza, Septiembre-Octubre 2001. *Nefrología* 2001; 21(Suppl 2): A310.
2. *Aumento de expresión de trombospondina-1 en un modelo experimental de trasplante renal de donantes a corazón parado.* Lario S, Bescós M, Campos B, Mur C, Luque P, Alvarez R, Campistol JM. 8º Congreso de la Societat Catalana de Trasplantament. Barcelona 6-9 de febrero de 2005.
3. *Increased expression of thrombospondin-1 mRNA in kidneys from experimental non-heart beating donors.* Lario S, Bescós M, Campos B, Mur C, Luque P, Alvarez R, Campistol JM. American Transplant Congress 2005. Seattle, WA, Mayo 21-25, 2005.

Glosario de abreviaturas ^(a)

α -SMA	α -actina del músculo liso (<i>smooth muscle α-actin</i>)
ADP	difosfato de adenosina (<i>adenosine diphosphate</i>)
AMP	monofosfato de adenosina (<i>adenosine monophosphate</i>)
ANGII	angiotensina II (<i>angiotensin II</i>)
ATP	trifosfato de adenosina (<i>adenosine triphosphate</i>)
BH4	tetrahidrobiopterina (<i>tetrahydrobiopterin</i>)
CO	monóxido de carbono (<i>carbon monoxide</i>)
CTGF	factor de crecimiento del tejido conectivo (<i>connective tissue growth factor</i>)
CV _{inter}	coeficiente de variación intrerensayo
CV _{intra}	coeficiente de variación intraensayo
DGF	retraso de la función del injerto (<i>delayed graft function</i>)
EGF	factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
ET-1	endotelina-1 (<i>endothelin-1</i>)
FAD	dinucleótidos de flavina-adenina (<i>flavin-adenine dinucleotides</i>)
FMN	mononucleótidos de flavina (<i>flavin mononucleotides</i>)
GFR	tasa de filtración glomerular (<i>glomerular filtration rate</i>)
HBD	donante a corazón latiente (<i>heart beating donor</i>)
HGF	factor de crecimiento del hepatocito (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF-1	factor inducible por hipoxia-1 (<i>hypoxia inducible factor-1</i>)
HRE	elemento de respuesta a hipoxia (<i>hypoxia-response element</i>)
HTK	solución histidina-triptófano-ketoglutarato (<i>histidine-tryptophan-ketoglutarate solution</i>)
ICAM-1	molécula de adhesión intracelular-1 (<i>intracellular adhesion molecule-1</i>)
IGF-I	factor de crecimiento insulínico tipo I (<i>insulin-like growth factor-I</i>)
IL-1 β	interleuquina-1 β (<i>interleukin-1β</i>)
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil ester (<i>N^o-nitro-L-arginine methyl ester</i>)
L-NMMA	N ^o -mono metil-L-arginina (<i>N^o-monomethyl-L-arginine</i>)
LTBP	proteína de unión al TGF- β latente (<i>latency associated binding protein</i>)
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	proteína quimioattractante de monocitos-1 (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
NAD ⁺	dinucleótido de nicotiamida-adenina (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NCIR	nefropatía crónica del injerto renal (<i>chronic allograft nephropathy</i>)
NF- κ B	factor nuclear κ B (<i>nuclear factor κB</i>)
NF-AT	factor nuclear de las células T activadas (<i>nuclear factor of activated T cells</i>)

^a La mayoría de traducciones de los términos de biología molecular provienen de:

- Buscador del Centre de Terminologia de l'Institut d'Estudis Catalans (termCat) <http://www.termcat.cat/>
- Base de datos interactiva para Europa (IATE) <http://iate.europa.eu/iatediff/SearchByQueryEdit.do>
- Vocabulario de bioquímica y biología molecular de la Asociación Internacional de Traductores y Redactores de Medicina y Ciencias Afines (TREMEDICA).
http://tremedica.org/glosarios/bio_molecular/Glosario/index.html

NHBD	donante a corazón parado (<i>non-heart beating donor</i>)
NO	óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NOS	óxido nítrico sintasa (<i>nitric oxide synthase</i>)
NTA	necrosis tubular aguda (<i>acute tubular necrosis</i>)
PAF	factor activador de las plaquetas (<i>platelet activating factor</i>)
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno-1 (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PARP	poli-(ADP) ribosa polimerasa (<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>)
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas (<i>platelet derived growth factor</i>)
RLO	radicales libres de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
sGC	guanilato ciclasa soluble (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
Smads	<i>drosophila gene mothers against decapentaplegic</i>
SPARC	<i>serin protein acidic and rich in cystein</i>
TGF- β	factor transformante del crecimiento- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
TIMP-1	inhibidor tisular de metaloproteasas-1 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>)
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
UW	Universidad de Wisconsin
VCAM1	molécula de adhesión celular vascular-1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	receptor del VEGF
VSMC	células vasculares musculares lisas (<i>vascular smooth muscle cell</i>)

► **Introducción**

La obtención de órganos para trasplantes en España

En la década de 1960, antes de que el concepto de muerte cerebral fuera establecido, la principal fuente de obtención de órganos eran los individuos con parada cardíaca. Del desarrollo de las técnicas de reanimación y de la ventilación artificial, nace la concepción de muerte encefálica en 1970, esto es, la muerte del individuo previa a la parada cardiorrespiratoria por el cese de las funciones encefálicas.

En el año 1979 se promulga la Ley Española de Trasplantes, desarrollada en el Real Decreto de 1980 y actualizada en el Real Decreto de 2000. Esta ley regula todo el procedimiento de la donación, extracción y trasplante de donante vivo y cadáver, indicando los criterios médicos para el diagnóstico clínico de la muerte cerebral. A partir de este momento, en el que se establecen las bases diagnósticas de muerte cerebral, desciende el interés por los donantes a corazón parado puesto que los órganos obtenidos de donantes en muerte encefálica presentan mejor calidad. Todo ello derivó en el abandono casi total de la extracción de riñones de donante a corazón parado. En países como Japón, la principal fuente de órganos proviene de donantes a corazón parado ya que la muerte cerebral no se acepta legalmente.

El número de donantes potenciales está en torno de los treinta por millón de habitantes. La tasa de donantes por millón de población continúa incrementándose en España desde la década de los 80. En 2006 hubo 1509 donantes España, lo que representa uno de los índices de donación de órganos por millón de habitantes más altos del mundo (33,8)(Organización Nacional de Trasplantes, 2006). Aunque el número de donantes es cada vez mayor, continúa existiendo un déficit de órganos (Miranda et al., 2003; Valentin et al., 2005).

El trasplante renal de donante vivo representa, en la actualidad, una minoría de la actividad trasplantadora total en España —102 trasplantes de donante en 2006— aunque el número este tipo de trasplantes se ha duplicado en los últimos cuatro años (Organización Nacional de Trasplantes, 2006). Esto ha venido facilitado por la puesta en marcha de los programas de donante vivo mediante laparoscopia: al ser menor la agresión quirúrgica, y más pronta la recuperación postoperatoria, muchos candidatos ven facilitada la decisión de ser donantes. Es una buena alternativa de futuro, dados los

excelentes resultados de supervivencia del injerto y que la necesidad supera a la oferta de órganos de cadáver (Altes Ineva et al., 2005).

Además, con la aplicación de la Ley de Seguridad vial a partir de 1992 que obliga al uso de los cinturones de seguridad y del casco, el número de traumatismos craneoencefálicos y de víctimas mortales en accidentes de tráfico descendió, afortunadamente, aunque se agravó la problemática del déficit de donantes. En la actualidad, la principal causa de muerte en los donantes es el accidente cerebrovascular (el 60%), mientras que los traumatismos craneoencefálicos suponen un 15% (Valentin et al., 2005).

Alternativas para aumentar la obtención de órganos

La falta de órganos aptos para trasplante exige a la utilización de todos los medios humanos y técnicos en la investigación de alternativas:

- i. **Donantes marginales.** Como consecuencia de esta escasez, se han ido ampliando cada vez más los criterios de selección de los cadáveres donantes de órganos. Las únicas contraindicaciones absolutas para la donación renal son el HIV, la sepsis, el fracaso multiorgánico, las neoplasias con metástasis y la insuficiencia renal crónica (Andres et al., 2001). Esto ha significado aceptar donantes de edad más avanzada, al observarse que no influía en la supervivencia posterior del paciente. También varió la primera causa de muerte de los donantes (Valentin et al., 2005), que pasó del traumatismo craneoencefálico a la hemorragia intracraneal espontánea, por lo que cambió el grupo de edad. Se trata de los donantes marginales, pues tienen, antes de la extracción, una estancia prolongada en la UCI con administración de drogas vasoactivas y patologías asociadas a la edad como hipertensión arterial y diabetes mellitus, entre otras. A pesar de todo, se están utilizando de forma creciente y se han convertido en los donantes más frecuentes. El uso de injertos de donantes marginales supone un beneficio para los pacientes en lista de espera en diálisis, puesto que su uso mejora su supervivencia y su calidad de vida (Ojo et al., 2001).
- ii. **Donante a corazón parado (Non heart-beating donor, NHBD).** El programa de obtención de riñones de donantes a corazón parado se inició en el Hospital Universitario de Maastrich (Vroemen et al., 1983). Se estimó que el número de donantes potenciales podría aumentar hasta un 20% (Kootstra et al.,

1991). Se define donante a corazón parado como aquel individuo en situación de parada cardiorrespiratoria irrecuperable, fallecido con un tiempo de isquemia caliente —tiempo entre la parada cardíaca y el inicio de la perfusión fría— lo suficientemente corto que permita la extracción de órganos viables para ser utilizados para trasplante. Se considera parada cardíaca irreversible, según la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, cuando el paciente presenta ausencia de actividad eléctrica cardíaca efectiva tras al menos treinta minutos de reanimación cardiopulmonar avanzada, en ausencia de drogas depresoras o hipotermia inducida.

- iii. **Donante vivo:** la donación de vivo se está extendiendo en nuestro ámbito debido a que la nefrectomía de individuos sanos es una cirugía de bajo riesgo. La única necesidad es la de contar con un familiar voluntario con sistema ABO compatible. Los resultados de funcionalidad y supervivencia del injerto son excelentes, puesto que la programación permite tener una situación óptima del donante y del receptor, con inicio de la inmunosupresión en los días previos al trasplante, con estabilidad hemodinámica sin necesidad de vasopresores, ausencia de aterosclerosis o hipertensión en el donante y tiempos de isquemia cortos (Baid-Agrawal and Frei, 2007; Plaza, 2001).

Tipos de donante a corazón parado

Así como la donación de órganos basada en la muerte cerebral estaba regulada por ley, la basada en la parada cardiorrespiratoria del paciente no disponía de normativa. En el *First International Workshop on Non Heart-Beating Donors*, celebrado en Maastricht, se redactaron las recomendaciones, definiciones y características de lo que debían ser los donantes a corazón parado (Daemen et al., 1994). Se propuso una clasificación en cuatro categorías, conocida como la Clasificación de Maastricht (Kootstra et al., 1995).

La adaptación a nuestro ámbito se tradujo en el Documento de Consenso Español emitido por la Organización Nacional de Trasplantes (Organización Nacional de Trasplantes, 1995; Organización Nacional de Trasplantes, 2006):

- i. **Ingreso en parada cardíaca.** El individuo sufre parada cardíaca y se traslada al hospital sin haber practicado maniobras de reanimación cardiopulmonar. No se

conoce el tiempo de parada cardiaca, es decir, el tiempo de isquemia caliente. Se trata de un donante muy poco frecuente en nuestro medio.

- ii. **Parada cardiaca con maniobras de reanimación inefectivas.** El paciente se encuentra ingresado en el hospital y sufre parada cardiaca que no se revierte con las maniobras de reanimación. La información sobre este donante sí se conoce. El objetivo es disminuir al máximo el tiempo de isquemia caliente. Es el segundo tipo más frecuente.
- iii. **A la espera de la parada cardiaca.** Paciente en muerte cerebral o con lesión neurológica irreversible secundaria a traumatismo o a tumor cerebral, al que, de acuerdo con la familia, se le retira la ventilación mecánica y/o el soporte terapéutico, casi siempre en el quirófano. Estos donantes se denominan “controlados”: el tiempo de isquemia es muy corto y permite la extracción de varios órganos. Es un tipo de donante muy escaso.
- iv. **Donante en muerte cerebral que sufre una parada cardiaca.** Es el tipo de donante más frecuente en nuestro medio. Aproximadamente un 9% de donantes presentan una parada cardiaca antes de la extracción. Debido a la inestabilidad hemodinámica previa del donante, se puede prever la parada con antelación.

Criterios de selección

Los criterios de selección para considerar a un paciente fallecido como donante potencial de órganos a corazón parado incluyen: edad inferior a sesenta y cinco años, tiempo de isquemia caliente inferior a 30 minutos, sin contabilizar el tiempo transcurrido durante las maniobras de resucitación cardiopulmonar efectivas, pudiendo ser el tiempo total antes de la perfusión fría de hasta 2 horas (D'Alessandro et al., 1995), así como el resto de criterios de selección habituales para los donantes en muerte cerebral como ausencia de historia de enfermedad renal, hipertensión no controlada, enfermedad maligna, adicción a drogas parenterales, o sepsis (Kimber et al., 2001).

Procedimientos de extracción de órganos

El procedimiento de extracción de órganos a corazón parado se inicia tras el diagnóstico de muerte por parte del equipo médico que ha atendido al paciente, en cuyo caso el cadáver es considerado como donante potencial. Es preciso valorar con exactitud el tiempo de isquemia caliente y el tiempo transcurrido desde el inicio de las maniobras hasta el comienzo de la recirculación fría. Con la finalidad de mantener la mejor perfusión posible de los órganos, se mantiene la ventilación artificial y masaje cardíaco y se procede a la heparinización del donante. A continuación, se cateterizan la arteria y vena femoral por disección quirúrgica y se inicia la perfusión fría de los órganos (Humar and Dunn, 2005).

Otro factor que se ha relacionado con una mejoría en la función renal postrasplante ha sido la presión de perfusión del líquido de preservación. Una presión de perfusión baja aumentaría la liberación de renina-angiotensina, lo que ocasionaría un aumento de las resistencias vasculares renales, circunstancia que condicionaría una disminución del flujo renal y una mala hipotermia (Anaise et al., 1988).

Se han ensayado diferentes líquidos de perfusión (Muhlbacher et al., 1999) :

- i. Histidina-triptófano-ketoglutarato (HTK)
- ii. Universidad de Wisconsin (UW)
- iii. Ringer lactato
- iv. Euro-Collins

La solución UW contiene adenosina, necesaria para la síntesis de ATP, que mejora la microcirculación, inhibe la agregación plaquetar y protege las células endoteliales (Southard et al., 1990). La HTK es una excelente solución de perfusión, debido a su baja viscosidad. La solución de Euro-Collins aumenta las resistencias vasculares por su elevada concentración de potasio que da lugar a una deficiente perfusión por vasoconstricción de los capilares glomerulares (Sakagami et al., 1990). La solución de UW ha probado ser mejor en la prevención de DGF que la Euro-Collins, mientras que presenta similares valores que la HTK (Perico et al., 2004).

Varios estudios están devolviendo protagonismo a la preservación de los órganos mediante la utilización de máquinas de perfusión pulsátil hasta el implante (St Peter et al., 2002). Estos estudios han demostrado una mejoría en el funcionamiento renal

postrasplante en aquellos riñones afectados por daño isquémico. Asimismo, reducen la incidencia de retraso inicial en la función del injerto y regeneran el ATP en riñones sometidos a isquemia caliente (Daemen et al., 1997; Kwiatkowski et al., 2007).

Experiencia tras la utilización de órganos de donante a corazón parado

El principal problema que se deriva de la utilización de los riñones de donantes a corazón parado es una mayor incidencia histológica de necrosis tubular aguda (NTA) y de su manifestación clínica, el retraso de la función del injerto (DGF), así como una elevada incidencia de riñones con fallo primario del injerto (Weber et al., 2002).

Algunas medidas como *i)* la utilización de diversos líquidos de preservación con reductores de los radicales libres (McLaren and Friend, 2003), *ii)* el acortamiento del tiempo de isquemia fría, *iii)* la utilización de máquinas de perfusión y *iv)* la utilización de pequeñas dosis de ciclosporina, son algunas de las medidas que se recomiendan para mejorar el funcionalismo de estos órganos (Perico et al., 2004).

El trasplante renal acumula la mayor parte de órganos con donantes a corazón parado. A pesar de tener una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo se aproxima a la obtenida con riñones de donantes con corazón latiente (Sanchez-Fructuoso et al., 2003; Sanchez-Fructuoso et al., 2006).

El problema principal de los riñones así obtenidos es la elevada incidencia de DGF, que según las series oscila entre el 48 y el 78% y el elevado porcentaje de riñones que nunca llegan a funcionar entre 4 y el 19% (Brook et al., 2003).

Es por tanto importante conocer con detalle lo que ocurre en un riñón después de un período de isquemia caliente —durante la parada cardiaca— y su posterior reperfusion con el objetivo de actuar sobre el potencial injerto.

Función retrasada del injerto y Síndrome de isquemia-reperfusión (IR)

Un riñón trasplantado sufre un periodo de isquemia que, en el inmediato postrasplante, puede afectar temporalmente a la función renal. A este suceso se le denomina retraso de la función del injerto siendo la manifestación clínica de la NTA causada por la isquemia-reperfusión.

La isquemia durante el trasplante renal se localiza invariablemente en tres puntos:

- i. Isquemia normotérmica durante la extracción y la posterior perfusión con el líquido de preservación del riñón donante. Este periodo es corto si el donante es HBD o puede alargarse si es un donante NHBD.
- ii. La isquemia fría durante el almacenaje del órgano.
- iii. La isquemia caliente durante la revascularización del tejido.

El primer cambio fisiológico detectable causado por un fallo renal agudo es la caída de la tasa de filtración glomerular (GFR).

Este descenso de la GFR viene mediado por:

- i. el desequilibrio entre sustancias vasoactivas (Conger and Weil, 1995)
- ii. por la obstrucción vascular provocada por la interacción entre leucocitos y endotelio (Rabb et al., 2000)
- iii. por el *feed back* tubuloglomerular (Devarajan, 2005)
- iv. por la obstrucción tubular, causada por la separación de las células epiteliales de la membrana basal y por la extravasación del filtrado glomerular como consecuencia de la pérdida de la barrera epitelial (Bonventre, 1988; Bonventre, 1993)

Disfunción endotelial vascular en la isquemia renal

Después del periodo isquémico, el flujo sanguíneo renal vuelve a la normalidad a excepción de ciertas áreas. La región corticomedular tras la reperfusión presenta un flujo sanguíneo del 10% de su valor normal asociado a edema intersticial, adherencia de leucocitos y extravasación (Vetterlein et al., 1994). Las células endoteliales se

congestionan, se activan y sufren disfunción por reordenamiento de los filamentos de F-actina.

Disfunción tubular en la isquemia renal

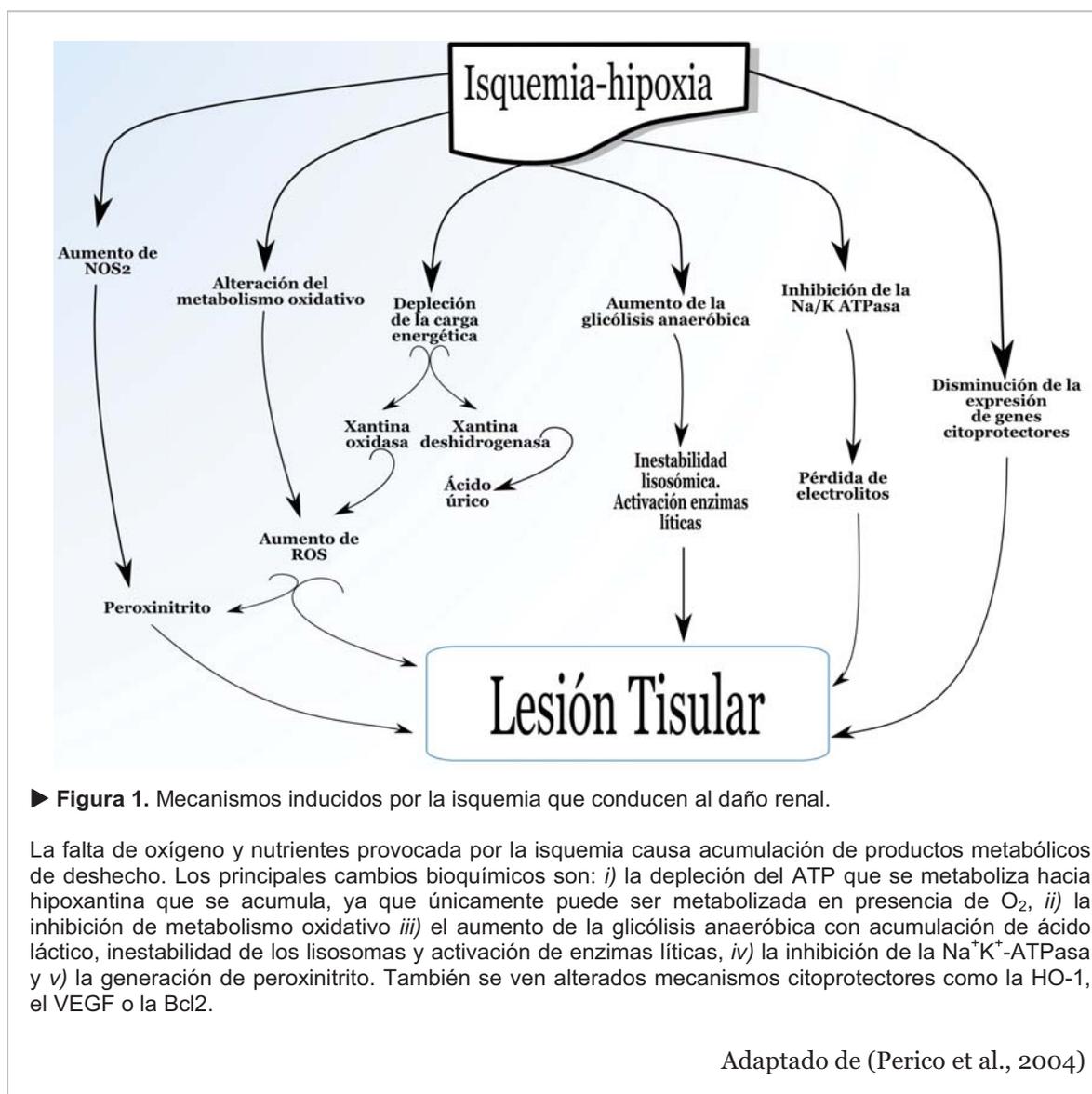
Durante el periodo isquémico, la carga energética celular se ve comprometida por la falta de oxígeno que impide la fosforilación oxidativa; estimulándose en su lugar la glicólisis, que provocará acidosis intracelular por acumulación de ácido láctico. El segmento S3 del túbulo proximal es extremadamente sensible a la lesión por isquemia debido a su baja capacidad glicolítica para generar ATP. Esta depleción de ATP lleva a muerte celular por necrosis. Las células epiteliales del brazo ascendente del asa de Henle —aunque situadas en la misma región— experimentan únicamente lesiones subletales por su mayor respuesta glicolítica en la generación de ATP en condiciones de isquemia (Bonventre, 1993). Estas células responden con la síntesis o liberación de distintas citoquinas y quimioquinas que mediarán, de manera autocrina o paracrina, la lesión postisquémica (Padanilam, 2003). Se ha considerado durante mucho tiempo que la muerte celular tras la isquemia se producía por necrosis, sin embargo, la necrosis y la apoptosis pueden ocurrir de forma simultánea. La contribución de cada una de ellas en la lesión por isquemia-reperfusión depende de la intensidad de la lesión y del tipo celular (Lieberthal and Levine, 1996).

Mecanismos de muerte celular en la isquemia renal

La tolerancia a la hipoxia depende en gran medida de tiempo de anoxia —falta total de oxígeno— y del tiempo de hipoxia, entendido como la falta de oxígeno relativa a la demanda metabólica del tejido. Otros factores son la temperatura y los mecanismos adaptativos específicos de cada tejido. En función de estas variables, las células pueden responder de varios modos (Padanilam, 2003):

- i.* La gran mayoría de ellas experimentan disfunciones reversibles relacionadas con el citoesqueleto, el volumen celular, el transporte de solutos o la polaridad, no viéndose afectada su supervivencia.
- ii.* La hipoxia persistente causa NTA. Las interacciones integrina-matriz extracelular se ven afectadas, provocando que las células epiteliales tubulares se despeguen dejando áreas de membrana basal desnudas.

- iii. Finalmente, muerte celular programada o apoptosis por la producción deficiente de factores de crecimiento de origen autocrino o paracrino.



La hipoxia tiene múltiples consecuencias como (Figura 1): el fallo en el metabolismo celular, la disfunción endotelial y tubular, el hinchamiento celular, la generación de radicales libres de oxígeno (RLO), el aumento del Ca²⁺ intracelular y la activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas. La lesión por isquemia lleva a la depleción de los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) que se degradan a los nucleósidos adenosina, inosina e hipoxantina. El colapso de los niveles de ATP lleva a la ruptura de los filamentos de actina de los microvilli y del citoesqueleto de la célula epitelial. Este efecto provoca la redistribución de la Na⁺K⁺-ATPasa desde la membrana cortical a la apical, provocando a su vez un aumento de Na⁺ en la mácula densa que tendrá como

consecuencia un aumento de la vasoconstricción. Si la isquemia continua por más tiempo, la actividad $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ fracasa, produciéndose un aumento intracelular de Na^+ , Cl^- y agua con muerte celular por hinchamiento u oncosis (Padanilam, 2003).

Las células proximales también experimentan un aumento de Ca^{2+} por el descenso de actividad de la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$, que resultará en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, con parada en la generación de ATP y producción de superóxidos. Asimismo, se activan proteasas, fosfolipasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} . Entre estas proteasas se encuentran la calpaina y la meprina. La calpaina se expresa constitutivamente en las células proximales, activándose en condiciones de hipoxia. La meprina es una metalopeptidasa que se localiza en el borde en cepillo de las células tubulares. Tras la isquemia se moviliza hacia la membrana basal, digiriendo uno de sus componentes, el nidógeno (Carmago et al., 2002).

La lesión necrótica por isquemia también viene mediada por la activación de fosfolipasas —que fragmentan los fosfolípidos de membrana— y por endonucleasas, como las endonucleasas de 15- y 30-kDa. Se supone que estas últimas se activan por las roturas en las cadenas de DNA generadas por los RLO (Ueda and Shah, 2000). Los RLO en el riñón isquémico se producen por células proximales tubulares, endoteliales y por la actividad de los neutrófilos. Vienen generados por el desacoplamiento de la cadena de electrones en la mitocondria y por sistemas enzimáticos como ciclooxigenasas, lipoxigenasas o la xantina oxidasa.

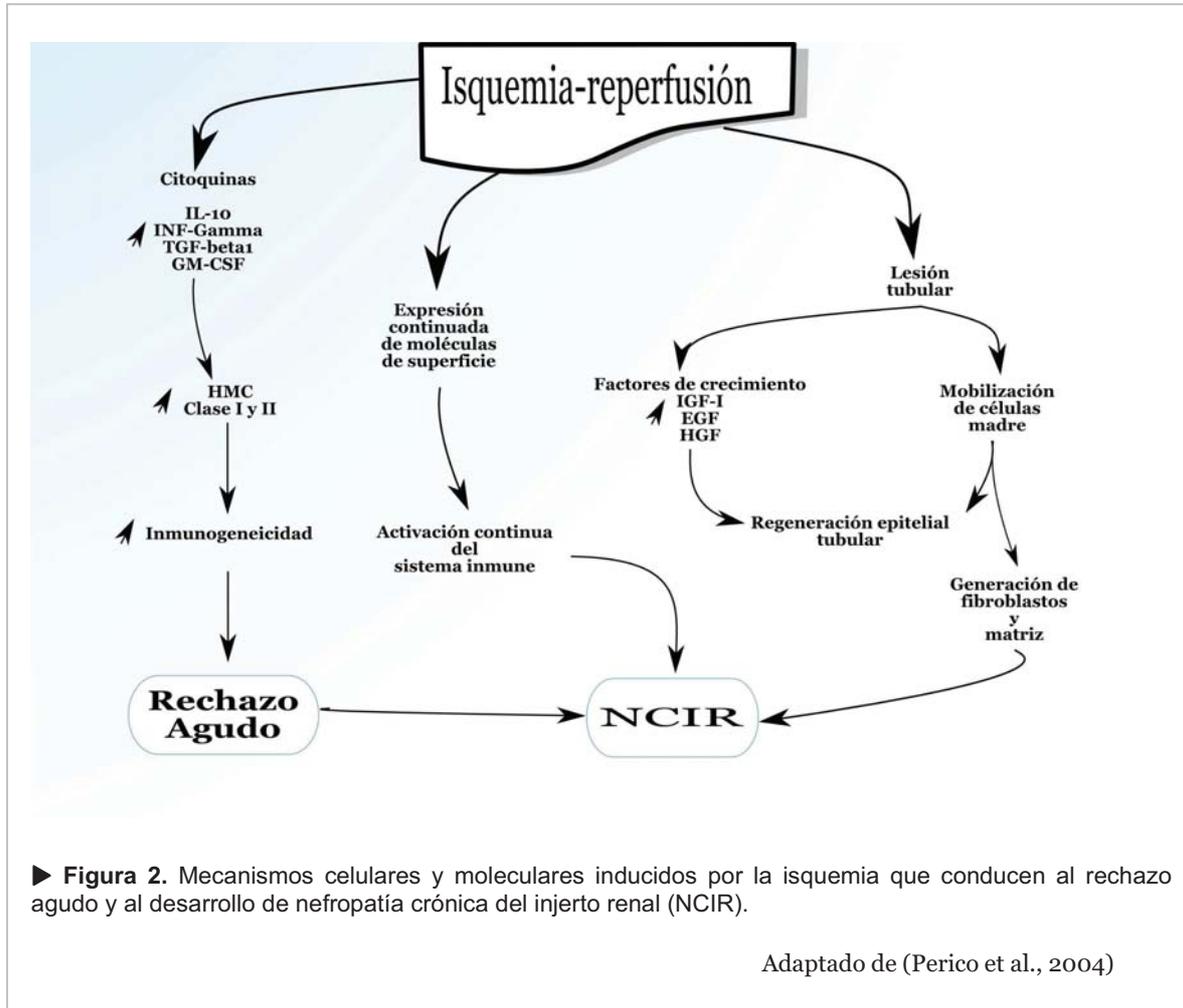
Los superóxidos reaccionan con las membranas, generando peroxidación lipídica, y con el óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito. Asimismo, desnaturalizan proteínas y provocan lesiones al DNA. Una de las consecuencias del daño al DNA es la activación de la proteína poli-(ADP) ribosa polimerasa (PARP). PARP añade polímeros de ribosa a varias proteínas consumiendo NAD^+ . La célula intenta mantener los niveles de NAD^+ con gran utilización de ATP que acelera la muerte celular por necrosis (Ha and Snyder, 1999). Los sistemas de transporte activo transmembrana como la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$ funcionan más lentamente, llevando a la acumulación intracelular de iones y agua que desemboca en un aumento del volumen celular. La pérdida del fluido extracelular es causa de aumento del hematocrito y de la viscosidad de la sangre. Todos estos efectos comprometen aún más el restablecimiento del flujo sanguíneo, su consecuencia es la obstrucción final de los capilares y alargamiento del periodo de isquemia (Eckardt et al., 2005).

Los efectos de la isquemia se ven agravados, por otra parte, por la posterior reperusión del órgano. Es la *reflow paradox*: aunque la reperusión es vital para la supervivencia del órgano, tiene una serie de efectos deletéreos sobre la microvasculatura.

Éstos se resumen a continuación siendo, en su conjunto, una respuesta inflamatoria:

- i. Expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales (molécula de adhesión intercelular-1 [ICAM-1] y molécula de adhesión a la célula vascular [VCAM-1]) y de sus ligandos (integrinas- β 1 y - β 2) en los leucocitos. ICAM-1 está regulado al alza durante la isquemia-reperusión y se ha comprobado que anticuerpos anti ICAM-1 tienen funciones protectoras (Kelly et al., 1994).
- ii. Adhesión de leucocitos a las células endoteliales.
- iii. Aumento de la permeabilidad vascular.
- iv. Infiltración del tejido. Durante la reperusión los leucocitos pueden obturar los capilares, generando enzimas proteolíticas y liberando citoquinas y RLO. La perfusión peritubular se ve, de esta manera, comprometida (Bonventre and Colvin, 1996).
- v. Liberación de factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina- 1β (IL- 1β).
- vi. Perturbación del balance de sustancias vasoactivas (NO, prostaciclina, endotelina-1 (ET-1), tromboxano A₂) hacia un ambiente vasoconstrictor. Algunos de los efectos citoprotectores del NO vienen mediados por su capacidad de contrarrestar estos efectos por sus propiedades vasodilatadoras (Perico et al., 2004).
- vii. Generación de radicales libres de oxígeno (RLO).
- viii. Acentuación de la inmunogeneicidad del órgano por un aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II. El MHC de clase I se regula sobretodo en las células tubulares y el de clase II en las intersticiales. Este aumento en la expresión del MHC viene inducido por el interferón- γ (INF- γ) regulándose asimismo varias moléculas coestimuladoras. El MHC puede inducir la respuesta inmune directamente o bien por la exposición de péptidos por las células presentadoras de antígeno. (Klein and Sato, 2000a; Klein and Sato, 2000b).

Estas perturbaciones inciden sobre los episodios de rechazo agudo y, eventualmente, sobre el desarrollo de nefropatía crónica del injerto renal (NCIR) (Figura 2).



La isquemia afecta a la microcirculación y, especialmente, a la célula endotelial, responsable de la distribución de nutrientes y oxígeno a las células epiteliales tubulares contiguas. En el riñón, las estructuras que más se ven afectadas por la isquemia son el segmento S3 de los túbulos proximales y el asa ascendente de Henle poco oxigenada en condiciones fisiológicas siendo, además, la región en la que el flujo sanguíneo se reestablece más tardíamente durante la reperusión (Shanley et al., 1986).

El riñón reperfundido muestra entonces resistencias vasculares aumentadas, con aumento en la resistencia vascular aferente, y reducción de GFR por la pérdida del gradiente de presión hidráulica transcáptilar. Una parte de estos cambios fisiológicos vienen mediados por la lesión de los túbulos renales, con obturación por restos celulares y pérdida de capacidad en la reabsorción de sodio.

Tabla 1. Estrategias para prevenir la lesión por isquemia-reperfusión

Adaptado de (Perico et al., 2004)

<p style="text-align: center;"><u>Soluciones de preservación</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Wisconsin • HTK • Celsior 	<p style="text-align: center;"><u>Antioxidantes</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de la NOS2 • N-acetil-cisteína
<p style="text-align: center;"><u>Sustancias vasoactivas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Prostaciclina • Péptido natriurético atrial • Antagonistas de la ET-1 	<p style="text-align: center;"><u>Manipulación del sistema HO</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adición de sustratos (CO, bilirrubina) • Inducción de la enzima
<p style="text-align: center;"><u>Antiinflamatorios</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • TNFα mAb • Inhibidores P-selectina • Inhibidores citoquinas (IL-1, IL-10, IL-13, MCP-1) 	<p style="text-align: center;"><u>Factores de crecimiento</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IGF-1 • HGF

Existen varias estrategias para minimizar el síndrome de isquemia-reperfusión. Se recogen en la Tabla 1. En conjunto entran en las siguientes categorías: mejora de soluciones de perfusión, la minimización de los tiempos de almacenaje de los órganos, y otras, de momento experimentales, como el precondicionamiento isquémico o la administración de factores de crecimiento o agentes antiinflamatorios.

Respuesta celular a la hipoxia: Factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1)

La hipoxia actúa como señal de varios activadores transcripcionales como el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activadora-1 (AP-1) o la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), entre otras (D'Angio and Finkelstein, 2000).

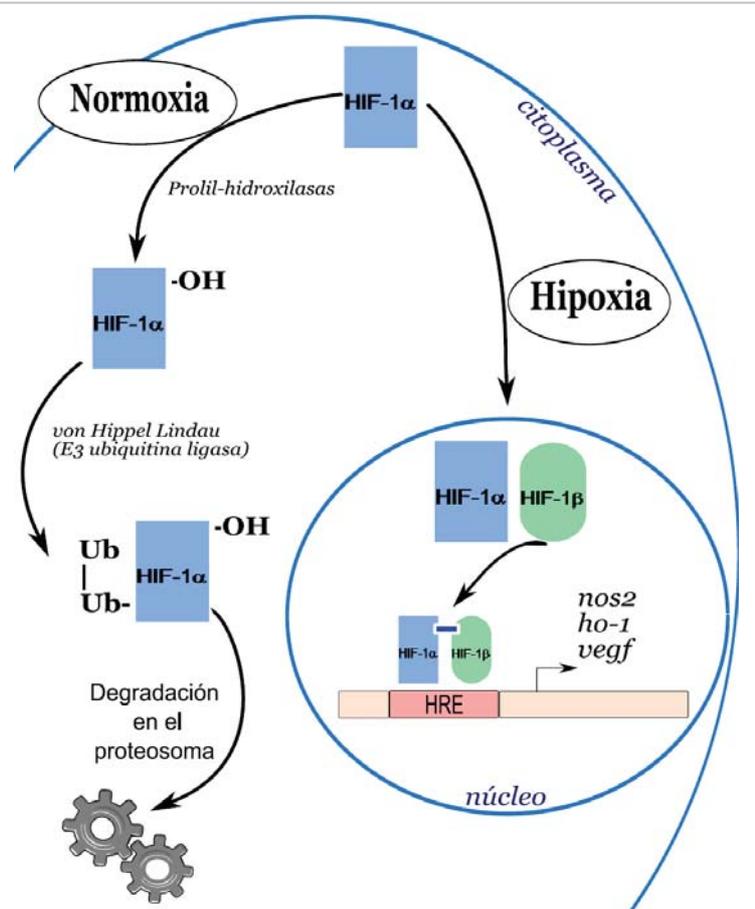
Nos centraremos a continuación en HIF-1.

HIF-1 es un activador transcripcional implicado en la homeostasis del O_2 . Es una proteína heterodimérica constituida por una subunidad- α (HIF-1 α o HIF-2 α) regulada por oxígeno y una subunidad constitutiva HIF-1 β . La subunidad HIF-1 α se expresa constitucionalmente y es rápidamente degradada en presencia de oxígeno, funcionando realmente como un sensor (Figura 3).

► **Figura 3.** Activación de HIF-1 por hipoxia.

En condiciones de normoxia, HIF-1 es ubiquitinada y degradada en el proteosoma. En hipoxia, HIF-1 α es estabilizada y translocada al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β (ARNT). El heterodímero se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), promoviendo la transcripción de sus genes diana.

Adaptado de
(D'Angio and Finkelstein, 2000)



En presencia de oxígeno, HIF-1 α es hidroxilada en dos residuos prolina (Pro402 y Pro564) por las hidroxilasas prolil-4-hidroxilasa y asparaginil hidroxilasa. La HIF hidroxilada se une al complejo ubiquitina-ligasa por la proteína adaptadora von Hippel-Lindau y es degradada vía ubiquitina-proteosoma. Cuando la tensión de oxígeno es insuficiente para las reacciones de hidroxilación, HIF-1 α no entra en la vía de hidrólisis, sino que se acopla a la subunidad HIF-1 β . El heterodímero se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) de sus promotores o estimuladores activando la transcripción de una serie de genes implicados en el metabolismo energético y del hierro, matriz extracelular, homeostasis vascular y supervivencia celular. Una representación de ellos se recoge en la Tabla 2 y en la Figura 9.

Varios de estos genes están implicados en la regeneración renal tras el síndrome de isquemia-reperfusión, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y uno de sus receptores (VEGFR1), la isoforma β 3 de la familia del TGF- β , la hemoxigenasa-1 (HO-1), la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (NOS2), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la p21 entre otros. Como se verá más adelante, la importancia del NO generado tanto por la isoforma inducible NOS2 como por la isoforma endotelial NOS3 y las sustancias derivadas del metabolismo de los grupos hemo por la HO-1 (monóxido de carbono, biliverdina) ha sido reconocida en el ámbito del trasplante renal.

HIF en la fisiopatología renal

En condiciones de normoxia no se detecta al factor de transcripción HIF en ninguna área del riñón, incluida la médula renal, donde las tensiones de oxígeno son particularmente bajas. La exposición de animales de experimentación a hipoxia sistémica, origina la acumulación de HIF-1 α e HIF-2 α en prácticamente todos los tipos celulares renales. HIF-1 α se acumula en las células epiteliales tubulares, mientras que HIF-2 α lo hace en las células endoteliales de los capilares peritubulares, en los fibroblastos y en el glomérulo (Rosenberger et al., 2002).

Se ha comprobado experimentalmente que otros insultos, como la hipoxia renal aguda por isquemia-reperfusión (Rosenberger et al., 2002; Tanaka et al., 2004), el infarto renal o el radiocontraste (Rosenberger et al., 2005) son inductores de HIF.

Tabla 2. Genes regulados por HIF

Adaptado de (Maxwell, 2003)

Producción de eritrocitos	Eritropoyetina
Metabolismo del hierro	Transferrina Receptor para transferrina Ceruloplasmina
Tono y arquitectura vascular	VEGF VEGFR1 Endogлина Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) Adrenomedulina Endotelina-1 Óxido nítrico sintasa-2 (NOS2) Hemoxigenasa-1 (HO-1) Receptor adrenérgico-1 β
Metabolismo energético	Transportadores de glucosa 1 y 3 Hexoquinasa 1 y 2 Isofructoquinasa L Aldolasa A y C Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa Fosfoglicerato quinasa 1 Enolasa 1 Piruvato quinasa M Lactato deshidrogenasa A 6-fosfofructo-2-quinasa Fructosa 2,6 bifosfatasa 3
Proliferación, diferenciación y viabilidad celular	Proteínas de unión a IGF 1 y 3 IGF-2 TGF β -3 p21 Nip3 Ciclina G2 Caspasa 9 Regulated in development and DNA damage responses 1(RTP801) Supresor del tumor de Wilms (Wt1) Differentiated embryo chondrocyte 1 y 2 (DEC1 y -2)
Regulación del pH	Anhidrasa carbónica 9
Matriz extracelular	Proil-4-hidroxilasa- α 1
Autorregulación	CITED2
Eliminación de xenobióticos	multidrug-resistance transporter-1 (MDR1)

La mayoría de efectos de HIF pertenecen a la adaptación y protección celular frente a la hipoxia, por lo que se ha sugerido que la inducción de HIF podría ser una potencial estrategia de cara a la nefroprotección. No obstante, la hipoxia es un potente estímulo para la síntesis de colágeno, de inhibidores de metaloproteasas y de TGF- β (Basile, 1999). Se ha descrito en este sentido, que uno de los estímulos en la síntesis de TGF- β , el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) está, en parte, controlado por el

sistema HIF (Higgins et al., 2004) por lo que las estrategias de inducción de HIF —los inhibidores de las prolin-hidroxilasas (Warnecke et al., 2003), cloruro de cobalto (Matsumoto et al., 2003), o transferencia génica (Manotham et al., 2005)— deberían controlar este proceso.

Un papel adicional del sistema HIF es el reclutamiento y mantenimiento de células madre en el riñón adulto. La médula renal es un nicho para células madre adultas renales que pueden ser movilizadas a diferentes zonas del riñón tras la lesión de las células tubulares (Oliver et al., 2004).

A continuación nos centraremos en tres factores regulados parcialmente por el sistema HIF y que se han implicado en la fisiopatología del trasplante renal.

Estos factores son: el VEGF, la HO-1 y las isoformas de la NOS.

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF o VEGF-A) pertenece a una familia de citoquinas multipotentes que incluyen a VEGF-B, -C, -D, -E y al factor de crecimiento placentario (Ferrara et al., 2003). VEGF promueve la proliferación y diferenciación endotelial, aumenta la permeabilidad vascular, media la vasodilatación dependiente de endotelio y, actuando como antiapoptótico, favorece supervivencia del endotelio vascular. Asimismo, promueve la expresión de moléculas de adhesión y quimiotaxis de monocitos (Takahashi and Shibuya, 2005b).

VEGF-A (o VEGF) presenta al menos nueve subtipos que se generan por *splicing* alternativo — VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. De entre estas isoformas, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉ son las que principalmente se expresan. VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son isoformas excretadas, mientras que VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ se presentan asociadas a las células.

Las acciones de VEGF vienen mediadas por los receptores transmembrana tirosina quinasa VEGFR-1 y VEGFR-2 (antes denominados Flt-1 y Flk-1/KDR). VEGFR-2 presenta menor afinidad y mayor actividad quinasa por VEGF que VEGFR-1. La mayoría de acciones de VEGF vienen mediadas por VEGFR-2, que activa la fosfatidil 3-quinasa y Akt, dando lugar a un aumento en la actividad de NOS₃. VEGFR-1 actúa principalmente como coreceptor. VEGFR-1 posee una variante soluble (sVEGFR-1) que regula la disponibilidad del VEGF circulante (Schrijvers et al., 2004).

Uno de los principales mecanismos de acción de VEGF es la inducción de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (NOS₃) en las células endoteliales (Hood et al., 1998). Del mismo modo, VEGF participa en el remodelado de matriz intersticial —por medio de la inducción de la expresión del activador del plasminógeno y de PAI-1— y en la quimiotaxis de monocitos (Takahashi and Shibuya, 2005a).

La expresión de VEGF viene estimulada por agentes ambientales como la hipoxia, el estrés mecánico, los RLO y por un importante número de factores de crecimiento y citoquinas como: TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), la angiotensina II (ANGII), o las interleuquinas (IL) -1 y -6 (Johnson, 2000).

VEGF en la fisiología renal

En el riñón, VEGF se expresa principalmente en los podocitos glomerulares y en los túbulos distales y colectores, mientras que la expresión de VEGFR-1 y -2 es predominante en áreas preglomerulares, glomerulares y capilares peritubulares (Schrijvers et al., 2004). La función de VEGF en la fisiología renal es poco conocida. Estudios en modelos animales, en los que se ha suprimido el gen para VEGF, indican que podría estar participando en el mantenimiento tanto de las fenestraciones de las células endoteliales capilares glomerulares, como en la regulación de la permeabilidad glomerular (Eremina et al., 2003).

VEGF participa de manera significativa en la progresión de la patología renal. En ésta hay una pérdida progresiva de los capilares glomerulares y peritubulares encargados de suministrar nutrientes. Tras la lesión por isquemia o hipoxia se produce una respuesta ineficiente en la proliferación de las células endoteliales, debida a la activación del sistema de coagulación, que daría lugar a un colapso de los capilares provocando glomerulosclerosis (Kitamura et al., 1998). Otros mediadores de muerte endotelial serían la generación de RLO y la ANGII. En el modelo de nefrectomía 5/6 se produce un aumento en la proliferación endotelial tanto peritubular como glomerular en las dos primeras semanas, para en las siguientes ocho semanas disminuir por debajo de los niveles basales con pérdida de capilares peritubulares y glomerulares.

La respuesta angiogénica inicial se debe a la liberación de factores plaquetarios por estrés de cizallamiento sobre las células endoteliales (que estimulan la producción de TGF- β 1), por la secreción de TGF- β 1 y PDGF por las células mesangiales y de VEGF por los podocitos que posteriormente difunde a través de la membrana basal glomerular (Kang et al., 2001c; Lee et al., 1995; Wu et al., 1997).

La falta de reparación endotelial, en un escenario de pérdida de endotelio, amplificaría la patología microvascular. En este sentido, la posterior disminución de VEGF se acompaña —como se verá más adelante— de la aparición de un factor antiangiogénico, la trombospondina-1 (TSP-1) (Kang et al., 2001b). En ese mismo modelo experimental, la administración de VEGF₁₂₁ en el momento de pérdida de células endoteliales: i) protege al endotelio capilar, por aumento en la proliferación y preservación endotelial, ii) reduce la fibrosis tubulointersticial (medida por deposición de colágeno III y osteopontina), y iii) se incrementa la expresión de NOS₃, un importante mediador de

los efectos angiogénicos de VEGF (Ziche et al., 1997). No obstante, no se observan mejoras en cuanto a la glomerulosclerosis, el infiltrado por macrófagos o la expresión de TSP-1, posiblemente por la presencia de otros factores liberados por la ablación renal.

La regulación de VEGF y TSP-1 inducida por TGF- β en el túbulo proximal parece estar mediada por el sistema de señalización de las Smads (Figura 9) (Nakagawa et al., 2004b; Woolf, 2004). En una serie de experimentos *in vitro* se ha comprobado que TGF- β estimula la síntesis de VEGFR-1 y TSP-1 a través de Smad2. El receptor soluble VEGFR-1 actúa como factor antiangiogénico puesto que no trasduce la señal de VEGF. De la misma manera, TGF- β modularía la expresión de VEGF a través de Smad3.

VEGF en el trasplante renal

En un modelo de isquemia-reperfusión únicamente se observaron aumentos de expresión de VEGFR-2 en capilares peritubulares y en células endoteliales glomerulares. En las células tubulares se distinguió, sin embargo, una redistribución de VEGF desde el citoplasma hacia la membrana basolateral. Los autores de este estudio sugieren que el VEGF, sintetizado previamente por las células epiteliales tubulares, sería excretado hacia las células endoteliales peritubulares —que expresan VEGFR-2— con el objetivo de mantener el flujo sanguíneo capilar y asegurarse así el aporte de nutrientes y oxígeno (Kanellis et al., 2002).

Se ha relacionado el riesgo de sufrir episodios de rechazo agudo con la presencia de ciertos polimorfismos en el gen que codifica para VEGF (Shahbazi et al., 2002).

El papel de VEGF en el rechazo crónico o la nefrotoxicidad por ciclosporina ha sido más estudiado. En modelos experimentales de nefrotoxicidad por ciclosporina, tanto el mRNA como la proteína para VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 se mostraron aumentadas en los túbulos proximales y distales y en algunos podocitos glomerulares. El tratamiento con losartán —un antagonista del receptor para ANGII— mejoró la fibrosis intersticial, disminuyendo la expresión de VEGF (Shihab et al., 2002). En el rechazo crónico, el aumento de expresión de VEGF se produce en los podocitos, en áreas tubulointersticiales —seguramente por macrófagos— y en células mesangiales y endoteliales. Esta respuesta es consecuencia de la hipoxia generada por la reducción del flujo sanguíneo renal (Schrijvers et al., 2004).

Hemoxigenasa-1 (HO)

La hemoxigenasa es la enzima encargada de degradar los grupos hemo provenientes del metabolismo de citocromos, peroxidasas, catalasas, o hemoglobina. El grupo hemo es prooxidante, la toxicidad mediada por los grupos hemo es especialmente relevante para el riñón, ya que se pueden acumular importantes cantidades tras lesiones isquémicas o nefrotóxicas. Asimismo, el riñón puede sufrir los efectos de hemo generado durante la rabiomolisis o la hemólisis (Gonzalez-Michaca et al., 2004). El grupo hemo es liposoluble, atraviesa las membranas celulares atacando la membrana lipídica, el citoesqueleto y el DNA (Hebbel and Eaton, 1989).

Se han descrito tres isoformas de HO: la isoforma inducible (HO-1, ~32-kDa) es de localización en los microsomal; la isoforma constitutiva (HO-2, ~36-kDa) más abundante en condiciones fisiológicas y que se localiza en la mitocondria; y una tercera isoforma más elusiva (HO-3, ~33-kDa), que comparte 90% de identidad con HO-2. HO-1 se distribuye de forma ubicua en todos los tejidos, mientras que HO-2 se expresa fundamentalmente en cerebro, riñón, hígado, y endotelio (Agarwal and Nick, 2000).

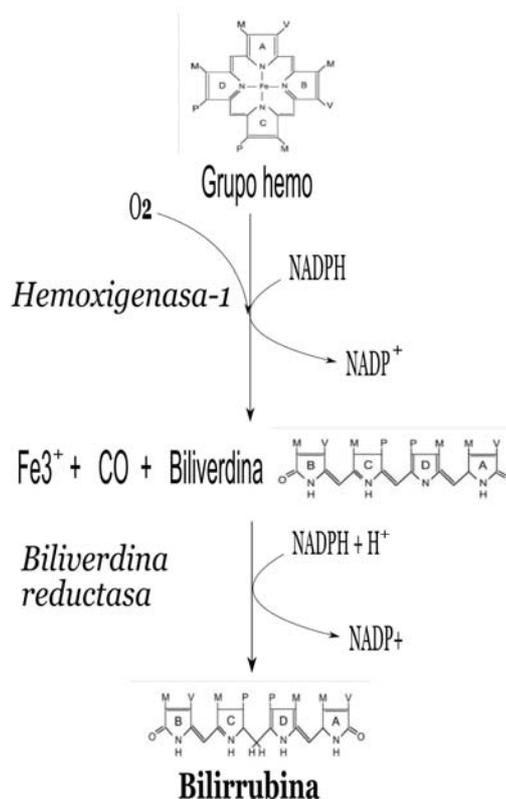
La actividad de la enzima se muestra en la Figura 4. HO-1 libera cantidades equimolares de Fe^{3+} , biliverdina y monóxido de carbono (CO) cada uno de ellos con propiedades citoprotectoras. Se enumeran a continuación (Katori et al., 2002):

- i. El CO es vasodilatador, antiapoptótico y antiinflamatorio.
- ii. La biliverdina, y su producto de degradación por la biliverdina reductasa, la bilirrubina, poseen propiedades antioxidantes y citoprotectoras anulando a los radicales peroxi e inhibiendo la peroxidación lipídica.
- iii. La ferritina es coestimulada conjuntamente con la HO-1 con tal de secuestrar al hierro libre.

Cada uno de estos productos pueden ser nocivos si se generan por una sobreactividad de la HO-1. El CO en exceso estimula la generación de radicales libres por las mitocondrias, mientras que el hierro puede catalizar la generación de nuevos radicales libres (Sikorski et al., 2004), por lo que se ha sugerido que una actividad óptima de HO-1 sería citoprotectora, mientras que su sobreexpresión acrecentaría la lesión tisular.

► **Figura 4.** Reacción catalizada por la HO-1.

El grupo hemo es hidrolizado por la HO-1 generando cantidades equimolares de hierro (Fe^{3+}), monóxido de carbono (CO) y biliverdina. La biliverdina es metabolizada hacia bilirrubina por la biliverdina reductasa.



Adaptado de (Agarwal and Nick, 2000)

La inducción de la HO-1 es un proceso complejo, dependiente del tipo celular y de factores de crecimiento. Igualmente son estímulos: la hipoxia, la isquemia-reperusión y el estrés por temperatura (Ryter et al., 2006).

HO-1 en la fisiopatología renal

La importancia de la HO-1 en la fisiología renal se ha estudiado básicamente en animales *knockout*. Los ratones HO-1^{-/-}, aunque viables, presentan deposiciones de hierro en los túbulos corticales renales y en el hígado. Asimismo, muestran síntomas de inflamación crónica como esplenomegalia, linfadenopatía, inflamación periportal hepática y, en algunos casos, glomerulonefritis (Poss and Tonegawa, 1997).

Este modelo experimental se ha aplicado al estudio del fallo renal agudo por administración de glicerol —con una mortalidad del 100% de los animales knockout (Nath et al., 2000)— y por inducción con cisplatino, en el que se observó una mayor frecuencia de apoptosis y necrosis comparado tanto con los animales heterocigotos como con los salvajes tratados con cisplatino (Shiraishi et al., 2000).

Existe un caso clínico de deficiencia de HO-1 (Yachie et al., 1999). El paciente presentaba anemia, niveles aumentados de ferritina, deposición tisular de hierro, linfadenopatía y leucocitosis. Se detectaron, de manera equivalente al ratón knockout, deposiciones de hierro en el epitelio de los túbulos proximales.

Muchos de los estímulos celulares de la HO-1 juegan un papel primordial como mediadores del fallo renal agudo —hemo, NO, factores de crecimiento, citoquinas, ANGII— por lo que se ha propuesto que estos factores estimularían la actividad de HO-1 en respuesta a la lesión renal (Figura 5). En estudios de inducción de HO-1 en células renales proximales humanas, los grupos hemo y el NO fueron los inductores transcripcionales más potentes de HO-1. El grupo hemo, no es únicamente el sustrato de la enzima HO-1, sino que también promueve su transcripción tanto *in vitro* como *in vivo* (Sikorski et al., 2004).

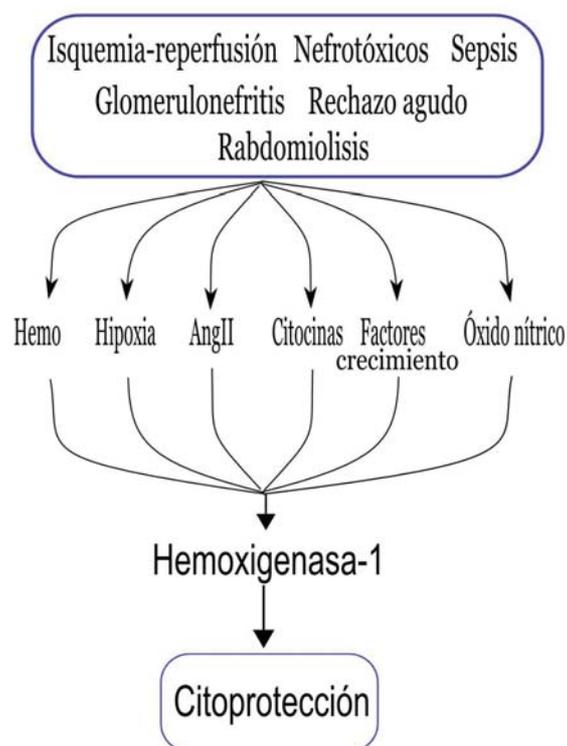
El NO, como se verá más adelante, juega un papel dual en la patología renal ya que puede aliviar o acentuar la lesión en función de su localización y de la cantidad generada. NO induce a la enzima HO-1 (Bouton and Demple, 2000) en múltiples tipos celulares que abarcan desde endoteliales y vasculares musculares lisas (VSMC) (Durante et al., 1997), hasta renales, tanto tubulares (Liang et al., 2000) como mesangiales (Datta and Lianos, 1999). La inducción de la HO-1 por los donadores de NO parece venir mediada por mecanismos transcripcionales (Durante et al., 1997) y de estabilidad de su mRNA (Bouton and Demple, 2000).

El TGF- β también está implicado en la regulación de la HO-1. Como se expone posteriormente, TGF- β participa en la fisiopatología renal, por un lado ejerciendo como proinflamatorio y estimulando la deposición de matriz extracelular, y por otro lado, atenuando la lesión por sus propiedades antiinflamatorias y de inducción de genes citoprotectores como la HO-1. Esta inducción ha sido descrita en células epiteliales humanas pulmonares y renales proximales (Hill-Kapturczak et al., 2000). Se considera que el aumento de HO-1 podría contrarrestar los efectos nocivos de TGF- β . En células epiteliales renales humanas vendría mediada por la vía de señalización de las Smads (Figura 9) (Hill-Kapturczak et al., 2000). Otras vías de señalización de TGF- β , como la p38 MAPK, inducirían la expresión de HO-1 por TGF- β en células epiteliales pulmonares (Ning et al., 2002).

Otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) —que promueve la regeneración de células epiteliales renales— podría estar estimulando la síntesis de HO-1 a través de HIF-1 (Tacchini et al., 2001).

► **Figura 5.** Inductores de la HO-1.

Estímulos como los grupos hemo, el NO, citoquinas, factores de crecimiento, ANGII o la hipoxia están implicados en la patología renal inducida por isquemia-reperfusión, rechazo del injerto, glomerulonefritis o nefrotóxicos. Todos ellos inducen a la HO-1 dando lugar a una respuesta adaptativa y favorable.



Adaptado de (Sikorski et al., 2004).

La ANGII es de igual forma una potente inductora de HO-1 tanto *in vitro* (células epiteliales proximales tubulares y mesangiales) como *in vivo* (Aizawa et al., 2000; Haugen et al., 2000). Aparte de su relevancia en el control de la presión arterial, la ANGII activa diversas cascadas de citoquinas, factores de crecimiento y estimula la generación de RLO (Wolf et al., 2003). El aumento de HO-1 inducido por la ANGII no parece estar relacionado con la elevación de la presión arterial, ya que la HO-1 no se induce ni por infusión de norepinefrina (Aizawa et al., 2000), ni en modelos animales de hipertensión arterial (Haugen et al., 2000). La proteinuria y la disminución de la GFR inducidas por ANGII pueden ser revertidas por la estimulación de la HO-1 con hemina, mientras que la inhibición de HO-1 promueve un empeoramiento de la GFR y de la proteinuria (Abraham and Kappas, 2005).

Citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10, IL-13) inducen la expresión de HO-1 dependiendo del tipo celular (Sikorski et al., 2004).

HO-1 en el trasplante renal

La isquemia-reperfusión no únicamente puede provocar disfunción en el inmediato postrasplante, sino que puede afectar al desarrollo de NCIR. La sobreexpresión de HO-1 inducida por un adenovirus conteniendo el cDNA para HO-1 en un modelo de trasplante isogénico, mejoró los índices de NTA y glomerulosclerosis, así como la normalización de los niveles de creatinina (Blydt-Hansen et al., 2003). Igualmente, se ha descrito una mejora en la función y supervivencia del injerto en modelos de trasplante renal alogénico tratados con protoporfirina de cobalto, un inhibidor de la degradación de HIF (Tullius et al., 2002).

Los efectos citoprotectores de la HO-1 en el ámbito del trasplante renal se extienden desde su función antioxidante hasta el control del ciclo celular:

- i. Antioxidante: durante la reperfusión, la mayoría de células se dañan por la generación de RLO, generando respuesta proinflamatoria. La actividad de la HO-1, catabolizando los grupos hemo, estaría participando en la prevención de lesión por isquemia-reperfusión ya que durante este proceso la enzima consume tres moléculas de oxígeno y siete electrones, reduciendo el stress oxidativo (Maines, 1997). La bileverdina y la bilirrubina, asimismo, actúan secuestrando otros radicales como el hidroxilo o los peróxidos lipídicos.
- ii. Mantenimiento de la microcirculación: el CO es un regulador del tono vascular de manera similar a como lo hace el NO, difundiendo desde el endotelio hacia las VSMC y aumentando sus niveles intracelulares de cGMP. La HO-1 estaría contrarrestando la vasoconstricción que ocurre durante la reperfusión (Duckers et al., 2001) e inhibiendo la trombosis microvascular, pues el CO posee propiedades antiagregantes (Brune and Ullrich, 1987).
- iii. Descenso en la apoptosis mediada por la expresión de genes antiaoptóticos —Bcl-2 y Bag-1 (Brouard et al., 2000)— y citoprotectores —VEGF, eritropoyetina, Glut-1 (Matsumoto et al., 2003).
- iv. La hipoxia prolongada, que se puede presentar por vasoconstricción mediada por CsA, promueve el remodelado vascular, potenciando la proliferación de las VSMC y la deposición de matriz extracelular. Se ha comprobado experimentalmente que

HO-1 inhibe la proliferación de estas células mediante la regulación de p21 (Duckers et al., 2001), un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK).

- v. Función antiinflamatoria: reduciendo el infiltrado de leucocitos al injerto renal (Tullius et al., 2002) e inactivando NOS2 (Coito et al., 2002).

Óxido nítrico sintasa (NOS)

El óxido nítrico (NO) es un regulador clave de las funciones vasculares, que juega un papel crucial en la fisiopatología renal.

En 1980, Furchgott y Zawadzki, usando tiras de aorta en un baño de órganos, descubrieron que el endotelio de los vasos era esencial para el efecto vasodilatador de la acetilcolina. Evidenciaron que este efecto era debido a una sustancia a la que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980). En 1987, Moncada y colaboradores demostraron que este factor era el NO (Palmer et al., 1987).

El NO es un gas incoloro, escasamente soluble en agua y fácilmente oxidable (Bachmann and Mundel, 1994). La molécula de NO contiene un electrón no apareado en su capa exterior, por lo que posee características de radical. Esto explica su elevada reactividad y su tendencia a la unión a hemoproteínas reducidas. El NO es inestable y se oxida, en presencia de oxígeno y agua, hacia nitrito y nitrato, que son sus metabolitos estables. Su vida media es de 3 a 6 segundos, siendo el nitrito el producto más abundante de su descomposición.

En respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, el NO es sintetizado desde la L-arginina en varios tipos celulares. Su síntesis viene catalizada por varias enzimas, que en conjunto, se denominan sintasas del óxido nítrico (NOS). Se han caracterizado tres isoformas de la enzima: la neuronal (NOS₁ o nNOS), la inducible (NOS₂ o iNOS) y la endotelial (NOS₃ o eNOS). Comparten un alto grado de homología, unos dominios muy similares y las mismas propiedades catalíticas (Marletta, 1993).

Todas las NOS exhiben un dominio oxigenasa N-terminal unido a un dominio reductasa C-terminal a través del dominio de unión a calcio-calmodulina. El dominio reductasa contiene sitios para NADPH, mononucleótidos de flavina (FMN), dinucleótidos flavina-adenina (FAD) y calmodulina, mientras que el dominio oxidasa contiene un grupo hemo y sitios de unión para tetrahidrobiopterina (BH₄) y L-arginina. Para la síntesis de NO, los electrones derivados del NADPH son transferidos desde las flavinas del dominio reductasa al hierro del grupo hemo del dominio oxigenasa. Esto provoca la reducción del hierro, permitiendo la activación del oxígeno.

Este oxígeno activado se inserta entonces en la L-arginina para formar un intermediario, el N^o-hidroxil L-arginina, a partir del cual se generan L-citrulina y el NO por medio de una reacción de oxigenación (Marletta, 1993).

Las isoformas de la NOS presentan distinta distribución y mecanismos de regulación dependiendo del tipo celular y del estímulo:

- i. NOS1 (~160-kDa) se expresa en neuronas del sistema nervioso y en el músculo cardíaco y esquelético. Posee un dominio de unión a otras proteínas citosólicas que no está presente en NOS2 o en NOS3. Viene regulada por activación neuronal e hipoxia (Forstermann et al., 1995).
- ii. NOS2 es una proteína de ~130-kDa, ubicua y de localización citosólica. En células en reposo, su expresión basal es ausente o a muy bajo nivel, pero su expresión se estimula en gran medida cuando la célula es inducida por citoquinas y endotoxinas. La NOS2 presenta una gran actividad por su gran afinidad al calcio-calmodulina. Así, a diferencia de NOS3 o NOS1, la actividad de NOS2 viene regulada básicamente a nivel transcripcional. La región reguladora del gen que codifica para NOS2 presenta elementos reguladores para INF- γ , varias citoquinas y lipopolisacárido bacteriano. NOS2 se estimula pues por estos factores y por estímulos como la hipoxia y los RLO. Su inducción es muy intensa, el NO generado por la NOS2 está tres órdenes de magnitud por encima de la generada por NOS3 (Figura 6). Esta elevada expresión de NO, que permite matar microorganismos invasores, puede causar de lesión tisular (Forstermann et al., 1995).
- iii. NOS3 es una proteína de ~130-kDa que se expresa constitutivamente en las células endoteliales vasculares. Es la única NOS presente en la membrana celular. Se localiza en caveolas, donde está unida a las caveolinas-1 y -3. La NOS3 unida a caveolina es catalíticamente inactiva. Se activa por el aumento de Ca²⁺ intracelular que se une a la calmodulina para desplazar a la caveolina y activar a la NOS3. La expresión de NOS3 viene regulada por el ejercicio físico continuado, el estrés por cizallamiento, los estrógenos y la lipofosfatidilcolina (Wu, 2002).

NO ejerce una multiplicidad de acciones (Marletta, 1993):

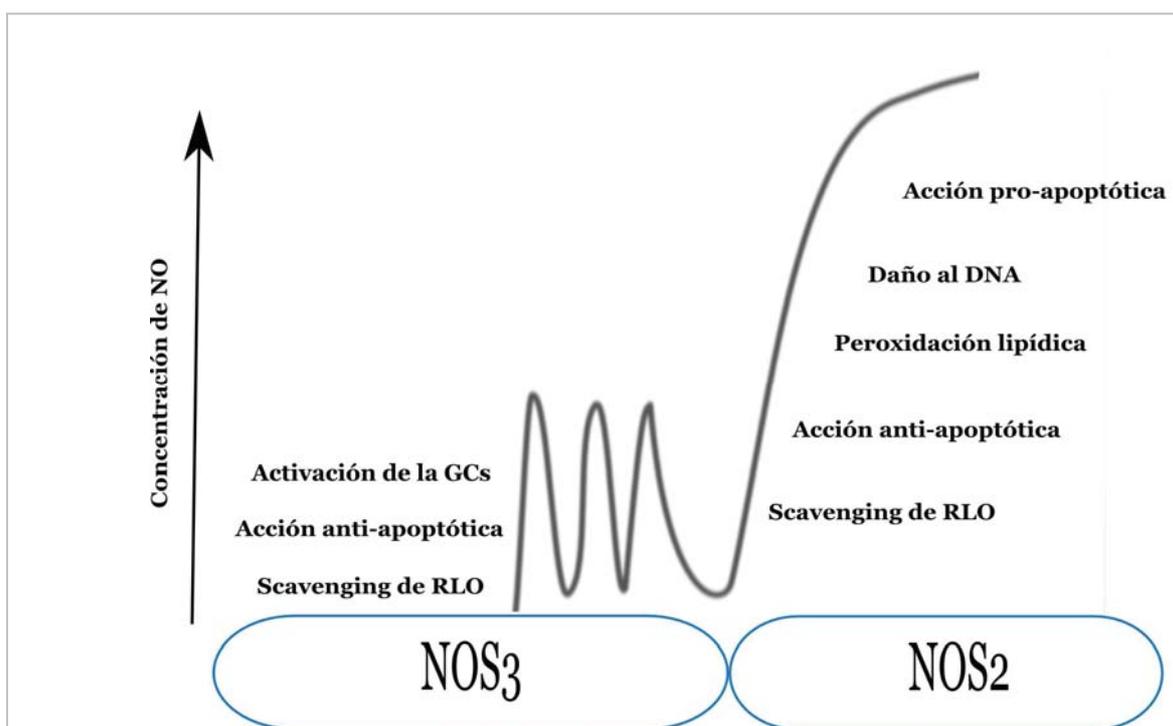
- i.* Inhibe la proliferación de las VSMC.
- ii.* Induce vasorelajación.
- iii.* Aumenta el flujo sanguíneo tisular.
- iv.* Inhibe la activación plaquetaria.
- v.* Inhibe la activación leucocitaria.
- vi.* Modula la secreción de hormonas.
- vii.* Modula la transmisión sináptica.
- viii.* Estimula la inmunidad inespecífica contra microorganismos y células cancerosas.

Todas estas acciones vienen mediadas por la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) en las células diana. El NO se une al grupo hemo de la sGC activándola y catalizando la conversión de GTP a GMPc que se acumula en el citosol. El GMPc activa una serie de protein-quinazas dependientes de GMPc, y otras quinazas, responsables de los efectos del NO.

NO en la fisiopatología renal

NOS₃ se localiza en la mácula densa, en los vasos preglomerulares, en los túbulos colectores, en el asa de Henle y en los glomérulos mientras que NOS₂ lo hace en túbulos colectores, proximales y distales, asa de Henle y glomérulos (Bachmann and Mundel, 1994).

En el riñón, el NO interviene en la regulación de las funciones hemodinámicas y excretoras. Es un importante regulador del tono vascular glomerular y del coeficiente de ultrafiltración de los capilares glomerulares. La reducción de la síntesis de NO provoca un aumento de reabsorción tubular de sodio y agua. El descenso de NO provoca un aumento de la actividad renina plasmática y de los niveles intrarrenales de ANGII. La actividad de la NOS₃ es mucho mayor en la médula que en la corteza. La disminución de su síntesis provocaría una caída del flujo medular que llevaría a un mayor gradiente osmótico en la médula con aumento en la reabsorción de sodio y agua (Bachmann and Mundel, 1994; King and Brenner, 1991).



► **Figura 6. Efectos del NO.**

Los efectos del NO dependen de su concentración, del lugar de localización y de la duración de la acción. La generación de NO por la NOS3 es pulsátil. NOS2 presenta una gran actividad, la producción de NO es además sostenida. NOS2, dependiendo del contexto celular, puede provocar una gran cantidad de efectos.

Adaptado de (Goligorsky et al., 2002)

Al tener un electrón no apareado en su estructura química, puede aceptar electrones y actuar como aceptor del anión superóxido generando peroxinitrito. El peroxinitrito es causante de lesiones por su actividad oxidante y de nitración en residuos tirosina de las proteínas (Radi et al., 2001). La generación de peroxinitrito en el riñón se ha implicado en la lesión por isquemia-reperfusión (Lieberthal, 1998; Walker et al., 2000). Su generación impide la adhesión de la membrana celular tubular a la membrana basal, colaborando, en consecuencia, en la obstrucción tubular (Wangsiripaisan et al., 1999). La inhibición de la expresión o de la actividad de NOS2, puede mejorar la lesión por isquemia-reperfusión, lo que apunta al NO generado por NOS2 como agente pernicioso en la isquemia renal (Chatterjee et al., 2002; Ling et al., 1999; Noiri et al., 1996). Este NO generado por NOS2, conjuntamente con la formación de sustancias proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) por el endotelio y los neutrófilos, de sustancias vasoactivas y RLO contribuyen a la NTA (Lieberthal, 1998; Nath and Norby, 2000; Weight et al., 1996).

Prevalece, sin embargo, una gran controversia sobre el papel del NO en el daño por isquemia-reperfusión. Los primeros estudios sugerían que la inhibición de todas las isoformas de la NOS con agentes no selectivos (como la N^G-monometil-L-arginina, L-NMMA) causaba excesiva vasoconstricción —empeorando la lesión— por inhibición de simultánea de la NOS₃ (Chintala et al., 1993). En el riñón, L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil ester) un inhibidor de las tres isoformas de NOS, incrementa la presión arterial sistémica y provoca cambios en la hemodinámica renal y en la función tubular. La administración crónica de L-NAME produce fibrosis y glomerulosclerosis (Baylis et al., 1992). La administración de donadores de NO, o sobreexpresión de NOS₃, protege al tejido frente a la isquemia-reperfusión (Albrecht et al., 2003). Sorprendentemente, NOS₂ es uno de los componentes responsables del pre-acondicionamiento isquémico: treinta minutos de isquemia previa inducen a NOS₂ y NOS₃ participando en los efectos beneficiosos a largo plazo de esta maniobra quirúrgica (Park et al., 2003).

En consecuencia, se ha sugerido que el NO generado en grandes cantidades por la NOS₂ sería un agente tóxico, mientras que el NO generado por la NOS₃ tendría propiedades citoprotectoras (Figura 6)(Albrecht et al., 2003).

El ratón knockout para NOS₃ se desarrolló inicialmente para el estudio de NOS₃ en la hipertensión. Estos ratones, además de ser hipertensos, tienen alterada su capacidad vasorelajadora, con proliferación de la neointima. Presentan asimismo poca capacidad cicatrizante e insuficiente respuesta a estímulos angiogénicos (Lee et al., 1999). Los injertos aórticos de ratones NOS₃ ^{-/-} muestran engrosamiento intimal, deposición de lípidos y un mayor infiltrado mononuclear (Lee et al., 2000). Del mismo modo, la inducción de glomerulonefritis en este modelo comporta un mayor infiltrado por neutrófilos y trombosis capilar (Heeringa et al., 2000).

En la nefropatía diabética, la hiperglicemia contribuye al aumento de TGF-β₁ que se observa en estos pacientes. Uno de los mecanismos propuestos por los que la glucosa participaría en la regulación de la actividad de TGF-β₁ es modulando su principal activador, la trombospondina-1 (TSP-1). La hiperglicemia inhibe la biodisponibilidad de NO, y niveles subóptimos de NO provocan aumentos en TGF-β₁ (Wang et al., 2002).

NO en el trasplante renal

Como hemos ido viendo, la lesión endotelial postrasplante (o post-isquemia) induce una respuesta inflamatoria por neutrófilos, macrófagos, plaquetas y células T aloactivadas.

El reclutamiento de estas células T y de células efectoras, viene mediada por la liberación de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión de los leucocitos al endotelio. Las alteraciones en las uniones endoteliales están mediadas por factores leucocitarios como la trombina, la bradiquinina, la histamina, el VEGF y otras citoquinas. Uno de los reguladores es el NO. Se ha comprobado que el pretratamiento con inhibidores de las NOS inhibe la respuesta a VEGF, alterando la permeabilidad vascular (Fukumura et al., 2001). El NO generado por NOS2 estimula la síntesis de VEGF por las VSMC y las células T. La inhibición de la expresión de la NOS2 mejora o previene las lesiones por isquemia-reperfusión de los túbulos proximales. El inhibidor selectivo GW244150, reduce el grado de disfunción renal y de generación de peroxinitrito tras la isquemia-reperfusión (Walker et al., 2000).

Son muy comunes los cambios vasculares parecidos a aterosclerosis en los pacientes con NCIR. Se ha encontrado expresión de NOS2 en VSMC, macrófagos y linfocitos de estos pacientes (Albrecht et al., 2002). Se ha reportado una disminución en la expresión en de NOS3 en episodios de rechazo agudo (Albrecht et al., 2000). Una expresión declinada y prolongada de NOS3, por disfunción endotelial, podría ayudar a explicar la fuerte relación que existe entre los episodios de rechazo agudo y el sucesivo desarrollo de NCIR (Albrecht et al., 2003).

Regeneración epitelial tubular: Factor transformante del crecimiento- β 1

Las células epiteliales tienen una gran capacidad de recuperarse completamente de una lesión grave. La regeneración de las células epiteliales perdidas viene mediada por una compleja red de factores de crecimiento como IGF-I, EGF y HGF. Sus efectos se expanden desde el rescate de la muerte celular, a la inducción de proliferación (Johnson, 2000).

En pocos días tras la lesión, una serie de células inmaduras progenitoras que se hallan en el riñón son las responsables de multiplicarse y diferenciarse a células tubulares durante la regeneración. En modelos animales, las áreas de mayor reparación se observan en los túbulos proximales de la médula externa, donde la lesión es más aparente. Inicialmente, estas áreas se repoblan de células poco diferenciadas que tienen propiedades de precursores epiteliales: borde en cepillo poco diferenciado, expresión de vimentina y escasa regulación del factor de transcripción *kid-1* (Witzgall et al., 1998). Estas células tienen dos orígenes: células madre mesenquimales y dediferenciación de las epiteliales existentes. Se ha descartado una movilización de células madre de la médula ósea (BMSC), corroborando el origen intrínseco de la reparación renal (Duffield et al., 2005). Se piensa que, en esta reepitelización, algunas células precursoras se pueden diferenciar a fibroblastos y que otras alterarían sus capacidades de proliferación y se síntesis de matriz alteradas, iniciando cambios fibróticos en el injerto (Figura 8) (Azuma et al., 1997). Estos cambios, asociados a la lesión endotelial, pueden hacer perder un número variable de nefronas que activaría a su vez los mecanismos de pérdida acelerada de nefronas iniciada por la pérdida de masa renal impuesta por el trasplante. Esto apoya al hecho que la DGF tras el trasplante es un factor de riesgo para la pérdida del injerto a largo plazo (Perico et al., 2004).

El factor transformante del crecimiento- β 1 (TGF- β 1) es un factor de crecimiento que media muchos de los eventos que ocurren en las fases de reparación renal (Border et al., 1995; Sharma and Ziyadeh, 1993). Posee gran importancia en la homeostasis de la matriz extracelular (Border et al., 1994; Riser et al., 1992), actuando como sustancia pro y antiinflamatoria en función del sitio y periodo de expresión (Ashcroft, 1999; Cerwenka and Swain, 1999; Lebman and Edmiston, 1999). Está, asimismo, implicado

en el desarrollo de patología renal fibrótica como la glomeruloesclerosis (Border et al., 1990), la nefropatía diabética (Yamamoto et al., 1993) y, en el ámbito del trasplante renal, en el desarrollo de NCIR (Sharma et al., 1996), siendo esta última la principal causa de pérdida del injerto a largo plazo (Chapman et al., 2005).

Es, sin embargo, un sistema de gran importancia en la restauración de la función renal tras la isquemia-reperfusión. Se ha sugerido que TGF- β participaría en la reparación renal regenerando la matriz extracelular, un paso crucial para la reepitelización tubular (Basile et al., 1996; Basile et al., 1998).

La superfamilia del TGF- β está formada por un gran grupo de proteínas extracelulares que participan en el crecimiento, diferenciación y homeostasis celular y que incluyen a TGF- β , a las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y a las activinas (Prieto et al., 2002; Sporn and Roberts, 1992). La subfamilia de TGF- β está compuesta por cinco miembros, tres de los cuales se encuentran en mamíferos y que comparten un 70% de homología. Estas tres isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 vienen codificadas en las regiones cromosómicas humanas 19q13, 14q1 y 14q24, respectivamente. Las diferencias entre las tres isoformas se deben a su función y a su control transcripcional. Mientras que TGF- β 1 se involucra en respuesta celular a la lesión tisular, las isoformas TGF- β 2 y - β 3 participan en procesos fisiológicos como el control hormonal o el desarrollo (Jerkic et al., 2004). El promotor de TGF- β 1 carece de caja TATAA, aunque posee otros sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, Egr-1 o Sp-1 (Shi and Massague, 2003). Estas propiedades hacen que TGF- β 1 se exprese principalmente durante los procesos de reparación, estrés o carcinogénesis.

El TGF- β 1 (~25-kD) deriva de un precursor largo, que se escinde para producir un péptido carboxi-terminal. El homodímero de este péptido está asociado de manera no covalente con un dímero del propéptido amino terminal procesado denominado LAP (Massague, 1990). El complejo latente de TGF- β excretado, es incapaz de unirse a los receptores de TGF- β hasta que el péptido biológicamente activo se disocia de LAP. Varios factores, entre los que se encuentran las alteraciones en el pH y diversas enzimas como la furina y la trombospondina, son capaces de liberar el TGF- β de este complejo (Khalil, 1999). El TGF- β activo también puede ser inhibido por factores locales, tales como el proteoglicano decorina, al que se asocia de modo reversible (Massague, 1990). El complejo latente del TGF- β , que está compuesto por el LAP-TGF- β y por la proteína

de unión al TGF- β latente (LTBP) fue identificado en los glomérulos renales (Border et al., 1992).

Los receptores para TGF- β son glicoproteínas transmembrana con un dominio serina-treonina quinasa, un dominio transmembrana y un último dominio extracelular. Se distinguen tres subgrupos: los receptores de tipo I (TGF β RI), de tipo II (TGF β RII) y de tipo III (TGF β RII) que heterodimerizan para la transducción de la señal. Los TGF β RI presentan un dominio con residuos glicina y serina repetidos (dominio GS). Es en este dominio donde se produce la fosforilación de TGF β RI dependiente de ligando. Esta fosforilación la lleva a cabo TGF β RII, que es un receptor con actividad quinasa. En ausencia de TGF- β , los receptores se encuentran en la membrana como homómeros independientes. Cuando TGF- β se une a TGF β RII, se produce el reclutamiento de TGF β RI formándose el complejo TGF- β -TGF β RI-TGF β RII. En este complejo, TGF β RII fosforila al TGF β RI en el dominio GS, lo que desencadena una serie de fosforilaciones en cadena que producirán la respuesta a TGF- β (Massague, 1998).

El tercer tipo, el TGF β RIII, comprende dos proteínas relacionadas, el betaglicano y la endoglina. El betaglicano es un proteoglicano que se encuentra en la membrana y que tiene gran afinidad por las distintas isoformas de TGF- β , pero es incapaz de activar la señalización. El betaglicano presenta TGF- β a TGF β RII. En ausencia de betaglicano, los TGF β RII muestran mayor afinidad por TGF- β 1 y TGF- β 3 y menor para TGF- β 2. En presencia de betaglicano, las tres isoformas presentan una alta afinidad para el TGF β RII (Massague, 1998). La endoglina se expresa en el endotelio vascular actuando como TGF β RIII, esta proteína está sobreexpresada en la enfermedad renal crónica y en fibrosis renal. El aumento de expresión de endoglina en estas situaciones podría relacionarse con un potencial mecanismo defensivo de los efectos fibrogénicos de TGF- β 1 (Rodríguez-Pena et al., 2001).

La propagación de la señal se realiza a través de las proteínas Smads (drosophila gene mothers against decapentaplegic), que se activan por fosforilación (Massague, 1998). Las Smads se clasifican en Smads reguladas por receptor (R-Smads), mediadoras comunes (Co-Smads) e inhibidoras (I-Smads). Las R-Smads proporcionan la especificidad de la respuesta biológica. TGF- β activa, a través del TGF β RI, a Smad-2 y -3. Una vez fosforiladas, las R-Smads forman un heterodímero con las Co-Smads en el

citoplasma celular, este grupo está representado por Smad-4. El heterodímero se trasloca al núcleo, donde actúan como factores de transcripción (Miyazono, 2000) :

- i. Uniéndose directamente a secuencias diana de DNA.
- ii. Mediante la interacción con otras proteínas de unión al DNA, provocando un aumento en su especificidad (son ejemplos FAST1, AP-1, TFE-3, el receptor de glucocorticoides y el de la vitamina D).
- iii. Reclutando co-activadores (p300/CBF) o co-represores (c-ski, SnoN) que se unen simultáneamente a varios factores de transcripción integrando señales.

Por último, las I-Smads (Smad-6 y -7), de localización nuclear, se trastocan al citoplasma tras la activación de la vía. Smad-7 antagoniza la acción de TGF- β , evitando la fosforilación de las R-Smads por los TGF β RI.

TGF- β se sintetiza y secreta en una forma latente inactiva. Más adelante se describirá como uno de los principales activadores de TGF- β 1 *in vivo* en el ámbito renal es la trombospondina-1 (TSP-1). TSP-1 es una proteína matricelular presente en plaquetas, macrófagos y células mesangiales con múltiples funciones como, aparte de la activación no proteolítica de TGF- β , las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular participando en el fenotipo celular. Asimismo, la TSP-1 actúa como sustancia proapoptótica. En este sentido, se ha descrito a nivel renal correlación entre la pérdida de capilares peritubulares, la presencia de TSP-1 y la pérdida de VEGF en modelos de patología renal crónica como la nefrectomía 5/6 o en el riñón añoso (Kang et al., 2002). No hay, sin embargo, datos respecto al patrón de expresión de TSP-1 en el inmediato postrasplante renal.

TGF- β en la fisiopatología renal

TGF- β tiene propiedades hipertróficas, proliferativas y antiproliferativas. Es hipertrófico para la célula mesangial, las VSMC y las epiteliales tubulares (Choi et al., 1993; Owens et al., 1988). La hipertrofia de las células mesangiales —entendida como un aumento en el volumen celular, pero no en su número— ocurre durante la nefropatía diabética y es anterior a la glomerulosclerosis. Los efectos hipertróficos, pero no los antiproliferativos de TGF- β 1 están mediados por p21 y p27 (Monkawa et al., 2002). En cuanto a la proliferación celular, tiene un efecto bifásico sobre el crecimiento

mesangial ya que lo potencia a bajas concentraciones y lo inhibe a altas (Branton and Kopp, 1999). TGF- β 1 es un potente mitógeno para los fibroblastos (Kothapalli et al., 1997).

TGF- β reprime la adhesión y transmigración de neutrófilos al endotelio (Gamble and Vadas, 1988). También inhibe la proliferación de monocitos y linfocitos (Ashcroft, 1999; Lebman and Edmiston, 1999). De hecho, actuando como antiinflamatorio prepara la reparación tisular. Esto se relaciona con el papel que juega en el recambio de la matriz extracelular. Los fibroblastos son estimulados por TGF- β para sintetizar proteínas de matriz extracelular (como colágeno, fibronectina, proteoglicanos) e inhibiendo la degradación de la matriz por inducción de enzimas proteolíticas o por aumento de los niveles locales de sus inhibidores específicos (como el inhibidor tisular de metaloproteasas-1 (TIMP-1) y PAI-1) (Branton and Kopp, 1999).

La mayoría de las células mesangiales derivan de células de la musculatura lisa y el mesangio se comporta, en muchos aspectos, como la musculatura lisa vascular. Dentro de las interacciones del TGF- β con la musculatura lisa vascular se encuentra la inhibición de la expresión de NOS2 (Vodovotz et al., 1996).

Por otro lado, este péptido también actúa mediante una regulación funcional preventiva en el riñón. TGF- β presenta actividad en la inhibición de la citotoxicidad renal por las células T. De hecho, la expresión aumentada del TGF- β en algunas enfermedades renales puede proteger frente a una posible infiltración linfocítica que pudiera ocurrir como respuesta a la agresión (Kanamaru et al., 2001)

Se ha probado que la hiperglicemia promueve la síntesis y expresión del TGF- β contribuyendo al desarrollo y progresión de la nefropatía diabética (Ziyadeh, 2004).

A continuación se recapitulan algunas de las principales funciones de TGF- β :

- i. En función del sitio y momento de expresión, actúa como agente proliferativo o antiproliferativo, ejerciendo en nuestro ámbito como inmunosupresor (Ashcroft, 1999; Cerwenka and Swain, 1999; Lebman and Edmiston, 1999) .

-
- ii. En cuanto a la matriz extracelular (Branton and Kopp, 1999):
 1. Estimula síntesis de matriz extracelular, por la síntesis de colágenos (I, III, V y VI), fibronectina, tenascina, osteonectina, osteopontina, TSP-1 y glucosaminoglicanos.
 2. Reprime la degradación de matriz extracelular, por la inhibición de proteasas. Inhibe la transcripción de colagenasas y estimula a TIMP-1 y PAI-1.
 3. Favorece el ensamblaje de las fibras de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina y proteoglicanos para producir estroma intersticial.

 - iii. Favorece los procesos de adhesión celular estimulando a las integrinas- β 1 (Kumar et al., 1995).

 - iv. TGF- β se opone a la acción de determinados mitógenos tales como el EGF o ciertas interleuquinas (IL-1, IL-2 IL-3, GM-CSF) en células progenitoras hematopoyéticas.

 - v. Modula la producción de sustancias vasoactivas como la ET-1 o el NO (Chen et al., 2001; Horie et al., 1991).

 - vi. Modula la producción de factores de supervivencia celular como el VEGF (Nakagawa et al., 2004a)

TGF- β exhibe numerosos efectos que, en la patología renal, se presentan como dos facetas parcialmente contrapuestas: el efecto fibrogénico y el inmunomodulador. Por un lado, su mediación como agente antiproliferativo, es decir, inmunosupresor, y por otro lado como notable agente profibrótico. Todavía está por esclarecer cuándo TGF- β ejerce cada uno de estos diferentes efectos.

TGF- β 1 se expresa en todos los segmentos de la nefrona (Ando et al., 1995; Gobe et al., 1999). Se ha localizado en riñones normales utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Yoshioka et al., 1993). El TGF- β parece ser un mediador entre diferentes eventos fisiopatológicos que eventualmente llevan a la acumulación de matriz extracelular en el glomérulo y que establecerán el fallo renal progresivo en el intersticio renal. TGF- β

parece ser una molécula clave y núcleo de muchos procesos celulares, entre ellos la reparación tisular (Bitzer et al., 1998; Docherty et al., 2002). En este sentido, TGF- β se expresa transitoriamente durante la organogénesis renal. Una considerable cantidad de eventos de la tubulogénesis embriológica parecen repetirse durante la recuperación tubular renal después de una lesión aguda (Zeisberg et al., 2001).

El TGF- β 1 en la fibrosis renal

Experimentos *in vitro* han demostrado que la administración de TGF- β 1 a células mesangiales, desencadena su proliferación y estimula la síntesis de proteínas de matriz (Border et al., 1994). Otros tipos celulares, como las células epiteliales glomerulares en cultivo también producen proteínas de matriz, como fibronectina y colágeno, en respuesta a TGF- β 1 (Branton and Kopp, 1999). *In vivo*, la transfección del gen TGF- β 1 a riñones de rata produce un claro aumento de la producción mesangial de la matriz (Isaka et al., 1993). Posteriormente, el mismo grupo logró introducir oligonucleótidos antisentido contra TGF- β 1 en ratas con glomerulonefritis (Akagi et al., 1996), que neutralizaron la acción de TGF- β 1, con reducción significativa de la expansión de la matriz.

Yamamoto y colaboradores (Yamamoto et al., 1994) investigaron el mecanismo por el que TGF- β 1 causa fibrosis en un modelo experimental por administración de suero antitimocito. Una única dosis causó lesiones mesangiales que coincidieron, una semana después, con un nivel máximo de TGF- β 1 a nivel transcripcional y traduccional y a la síntesis de matriz extracelular. Tras la resolución de la lesión, descendió la expresión de TGF- β 1 y los glomérulos recuperaron la normalidad. Sin embargo, si antes de la resolución se aplicaba una segunda inyección de suero antitimocito, los niveles de TGF- β 1 se mantenían elevados. Este hecho conducía al desarrollo de glomerulosclerosis severa y fibrosis intersticial. Los autores describieron este proceso como un modelo de fibrosis “de dos dosis”: la continuidad de la lesión desencadenaría la pérdida en la regulación del TGF- β 1.

Otros modelos experimentales de lesión renal asociados con una expresión incrementada del TGF- β 1 incluyen: diabetes inducida por estreptozotocina, uropatía obstructiva y fibrosis inducida por suministro de adriamina (Branton and Kopp, 1999; Yamamoto et al., 1993).

Participación del TGF- β 1 en el trasplante renal

El papel del TGF- β 1 en el trasplante renal ha sido estudiado principalmente en los escenarios del rechazo agudo y en el desarrollo de NCIR:

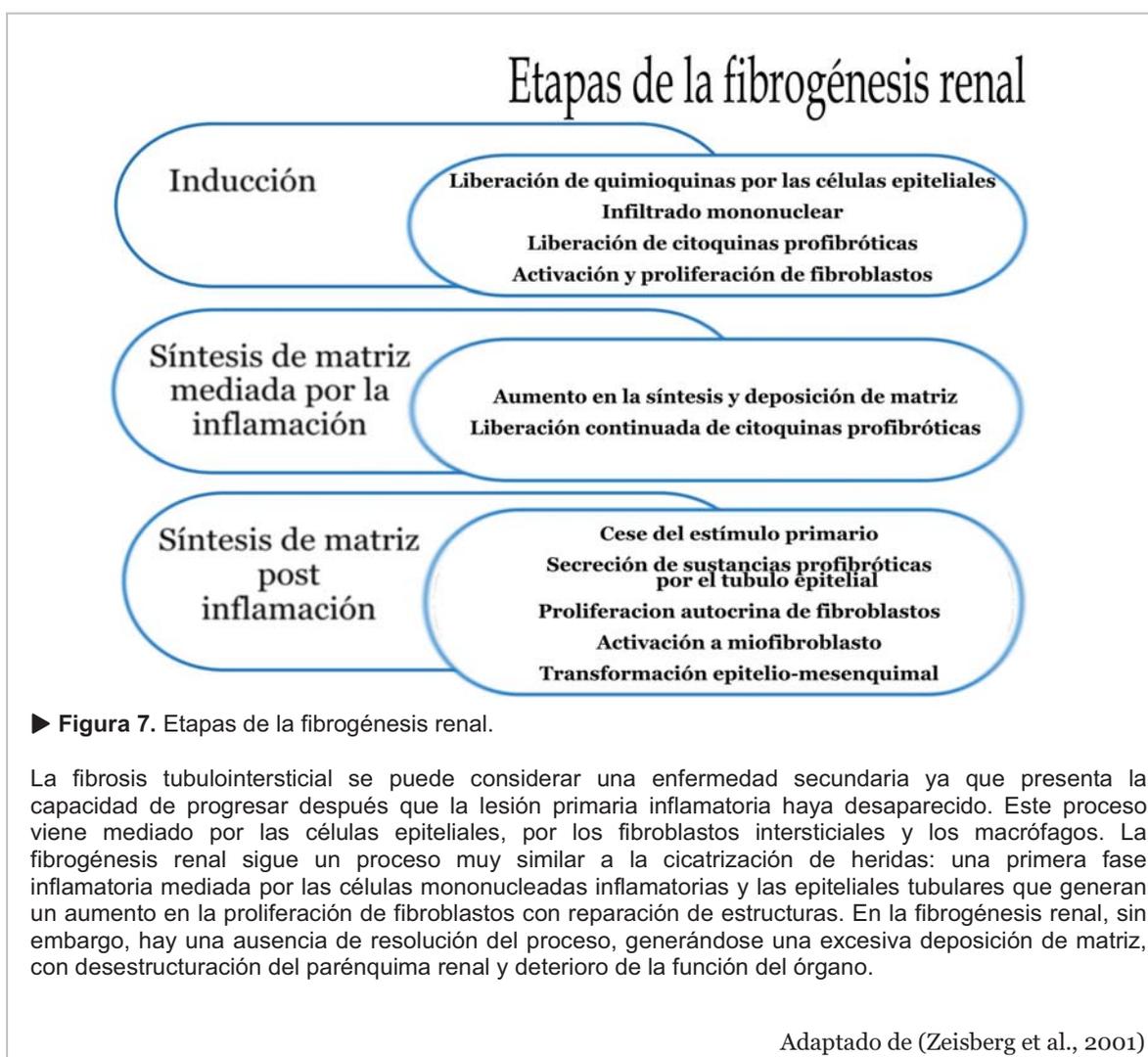
TGF- β 1 y la lesión inmunológica aguda

La tubulitis renal se define por la presencia de infiltrado renal compuesto por células mononucleares que han atravesado la membrana basal tubular e infiltran las células epiteliales tubulares. La vasculitis, junto con la extensión de la tubulitis, son utilizadas en el protocolo de puntuación de Banff para definir la severidad de las lesiones histológicas en el rechazo agudo del injerto renal (Racusen et al., 1999). Las lesiones en la membrana basal y en el epitelio tubular, por sí mismas, pueden contribuir a su eventual mala evolución durante un episodio de rechazo renal.

Se ha publicado que, en muestras de biopsias renales con rechazo celular agudo, la expresión del TGF- β 1 estaba concentrada principalmente en el epitelio tubular, donde habitualmente se distribuye difusamente; no obstante, en algunos casos, se detectó en la superficie basolateral del túbulo o en el citoplasma celular. Una distribución focal se observa, algunas veces, en grupos tubulares aislados. En algunas preparaciones, la expresión más significativa de TGF- β 1 se encontró en células del infiltrado inflamatorio (Robertson et al., 2001). Por otro lado, la distribución del TGF- β 1 dentro del aloinjerto renal durante el rechazo agudo está concentrada en los túbulos yuxtacorticales.

TGF- β 1 y la nefropatía crónica del trasplante renal

Existen varios factores de riesgo demostrados que se asocian con el desarrollo de NCIR. De hecho, hay una explicación ampliamente aceptada según la cual la NCIR representa una respuesta estereotípica ante la lesión de un injerto renal, independientemente del agente o agentes iniciales (Joosten et al., 2005; Libby and Pober, 2001; Pascual et al., 2002; Waaga et al., 2000). La Figura 7 resume las etapas de la fibrogenesis renal.



Los principales estímulos de la síntesis del TGF- β 1 se resumen en:

- i. Hipertensión arterial
- ii. Inhibidores de la calcineurina
- iii. Dislipidemias
- iv. Hiperglucemia

Estos factores coinciden, en su mayor parte, con los factores de riesgo no-inmunológico para el desarrollo de NCIR (Figura 10).

Paul y colaboradores (Paul et al., 1996) y Shihab y colaboradores (Shihab et al., 1996) examinaron la expresión TGF- β 1 en modelos experimentales Fisher-Lewis de trasplante en ratas, demostrando un aumento en la expresión de TGF- β 1 en los aloinjertos cuando se comparaban con riñones normales o con isoinjertos. Este hecho,

vinculado a fibrosis marcada, indujo a los autores a sugerir que el TGF- β 1 tiene un papel causativo en la expansión de matriz que sucede en la NCIR.

En un foco de lesión crónica hay gran cantidad de células inflamatorias que producen citoquinas y factores de crecimiento, sobre todo macrófagos y células T. También se dan cambios fenotípicos en poblaciones de células residentes, tanto las células mesangiales como las tubulares epiteliales que contribuyen al proceso fibrótico. Los fibroblastos residentes se caracterizan por la expresión *de novo* de α -actina del músculo liso (α -SMA) y adoptan propiedades de VSMC, lo que hace que se las refiera como miofibroblastos (Boukhalifa et al., 1996). En un estudio de cicatrización renal, el citoplasma de los miofibroblastos mostró inmunopositividad para TGF- β 1, lo cual sugiere un importante papel en el desarrollo de la fibrosis. En biopsias humanas, los miofibroblastos han sido vinculados al desarrollo de NCIR (Pedagogos et al., 1997).

Tabla 3. Factores profibróticos en el riñón

Adaptado de (Waller and Nicholson, 2001)

IL-1	Regula al alza de moléculas de adhesión en las células endoteliales. Induce la proliferación de VSMC y fibroblastos. Estimula la síntesis de PDGF.
IL-6	Mitógeno para las células mesangiales y las VSMC.
TNF-α	Estimula la síntesis de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales. Estimula la deposición de matriz por regulación de proteasas y sus TIMPs.
Moléculas de adhesión	Regulan al alza ICAM-1 y VCAM-1 en las células tubulares y en el endotelio glomerular, mediando la infiltración mononuclear.
PDGF	Induce el crecimiento de las VSMC. Quimiotáctico para macrófagos. Inductor del cambio fenotípico hacia miofibroblasto.
bFGF	Induce el crecimiento de las VSMC.
ANGII	Induce la deposición de matriz vía TGF- β 1.
ET-1	Induce la proliferación de fibroblastos.

Existen varios factores de crecimiento y citoquinas cuyas interacciones con TGF- β 1 en la fibrosis aún han de ser plenamente esclarecidas (Tabla 3).

El PDGF desempeña un destacado papel en la fibrosis renal, ya que es un activo mitógeno de miofibroblastos y células mesangiales (Johnson, 2000). La acción del

TGF- β 1 sobre el crecimiento de las células mesangiales está mediada parcialmente por PDGF. TGF- β 1 y PDGF actúan en el desarrollo de glomerulosclerosis estimulando la síntesis de matriz y la proliferación celular, respectivamente (Isaka et al., 1993).

Los FGF son una familia de proteínas expresadas en macrófagos, células endoteliales y VSMC que estimulan la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular. La expresión de FGF está incrementada en el modelo Fisher-Lewis de NCIR (Paul et al., 1996). VEGF se encuentra en niveles elevados en el intersticio de biopsias de riñón procedentes de pacientes con NCIR (Pilmore et al., 1999). IL-1 *in vitro* induce proliferación de fibroblastos, y el factor activador de las plaquetas (PAF) estimula la deposición de matriz por parte de las células mesangiales, probablemente mediante un mecanismo dependiente del TGF- β 1 que estimula la síntesis de VEGF (Ruiz-Ortega et al., 1997).

Trombospondina-1

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína heterotrimérica multifuncional, miembro de la familia de proteínas de matriz extracelulares que participan en la comunicación célula-célula y célula-matriz (Frazier, 1987). TSP-1 fue el primer miembro de una familia de cinco proteínas, que se purificó por primera vez de plaquetas humanas (Lawler, 2000). Las TSPs funcionan en la superficie celular reuniendo proteínas de membrana y citoquinas que regulan la estructura de la matriz y el fenotipo celular. Estas proteínas incluyen integrinas, proteínas asociadas a integrinas, CD36, proteoglicanos y factores de crecimiento como TGF- β y PDGF.

Cada célula expresa un complejo multiprotéico, que modulará la respuesta celular. Como ejemplo, TSP-1 ejerce como estimulador de la migración de las VSMC, pero como inhibidor para la migración de las células endoteliales.

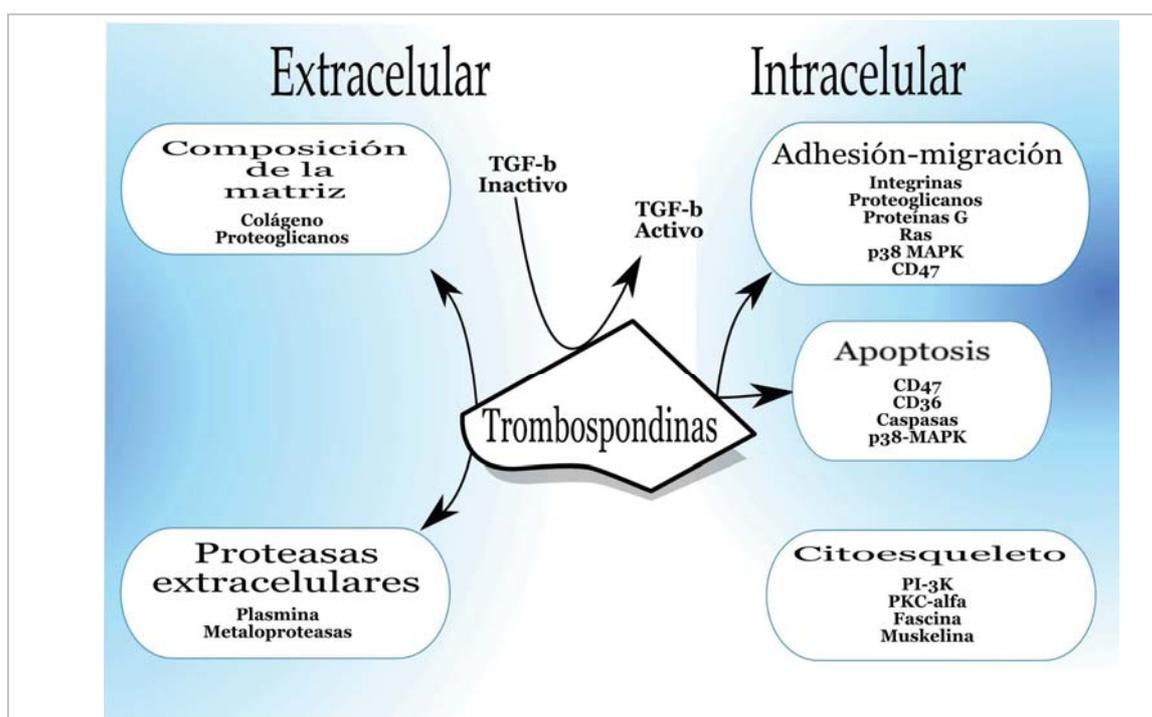
TSP-1 se sintetiza en múltiples tipos celulares que incluyen plaquetas, queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos (Mumby et al., 1984). Una de sus principales acciones es la de servir como agente antiangiogénico. De hecho, TSP-1 inhibe la quimiotaxis de las células endoteliales, así como la adhesión y crecimiento capilar tanto *in vitro* como *in vivo* (Rastinejad et al., 1989). TSP-1 se expresa en múltiples sitios donde la angiogénesis es, sin embargo, uno de los procesos clave, como en tumores e inflamación crónica (DiPietro et al., 1996). En estos sitios, el principal productor de TSP-1 parece ser el macrófago, un potente tipo celular angiogénico (DiPietro and Polverini, 1993).

En conjunto, TSP-1 es una proteína multifactorial involucrada en procesos de regeneración y reparación tisular así como en restablecimiento del tejido tras heridas (DiPietro et al., 1996). Otras funciones de TSP-1 se enumeran a continuación y se recogen en la Figura 8:

- i. Modula la agregación plaquetaria (Lawler, 2000).
- ii. TSP-1 inhibe la actividad de varias proteasas como la elastasa de los neutrófilos y la catepsina G y otras enzimas proteolíticas del eje fibrinolítico, como la plasmina

y el activador del plasminógeno uroquinasa (Hogg et al., 1993; Mosher et al., 1992).

- iii. TSP-1 regula la actividad de proteasas extracelulares como la MMP-9 (Qian et al., 1997).
- iv. TSP-1 igualmente colabora en la eliminación de neutrófilos senescentes por parte de los macrófagos (Savill et al., 1992).
- v. Una de las funciones más relevantes de TSP-1 es la de activar a TGF- β 1.



► **Figura 8.** Las trombospondinas median el flujo de información desde la matriz extracelular a la célula.

Adaptado de (Lawler, 2000)

Activación de TGF- β 1 por TSP-1

En 1992, se reportó la activación de TGF- β 1 por TSP-1 en tejidos epiteliales (Murphy-Ullrich et al., 1992). Como se ha visto, TGF- β 1 se sintetiza como un único polipéptido antes de ser procesado a TGF- β 1 maduro y LAP. Uno de los dominios de TSP-1 posee una secuencia peptídica RFK, que interacciona con la secuencia LSKL del extremo

amino-terminal de LAP. Esta interacción desplaza LAP de TGF- β 1, haciéndolo accesible a los TGF β R (Ribeiro et al., 1999). Este no es, sin embargo, el mecanismo de activación en las plaquetas ya que TGF- β 1 y TSP-1 se almacenan juntos en los gránulos- α plaquetarios. Se ha sugerido que alguna modificación postraduccional, o proteína de unión a las secuencias RFK, inhibiría la activación de TGF- β 1 por TSP-1 (Abdelouahed et al., 2000).

Los ratones deficientes para TSP-1 presentan anormalidades similares a los deficientes para TGF- β 1 (Crawford et al., 1998). Aparte de presentar mayor vascularización en los tejidos y mayor susceptibilidad a carcinogénesis, los ratones deficientes para TSP-1 reclutan una gran cantidad de neutrófilos y monocitos en el pulmón con el posterior desarrollo de hiperplasia epitelial y reclutamiento de macrófagos. TGF- β 1 reduce el reclutamiento de células inflamatorias en el pulmón. La deficiencia de TSP-1 resulta, por tanto, en una respuesta inmune exagerada a las bacterias normalmente presentes en el pulmón. El tratamiento de estos animales con el péptido sintético KRFK reduce el infiltrado celular. El mismo estudio reveló que el complejo TSP-1-TGF- β 1 está unido a la membrana de los macrófagos por medio de la proteína CD36.

TSP-1 en la fisiopatología renal

El papel de TSP-1 en la fisiopatología renal ha sido estudiado *in vitro* en células mesangiales, e *in vivo* en el ámbito de la glomerulonefritis, glomerulosclerosis y fibrosis intersticial.

En células mesangiales en cultivo, TSP-1 se comporta como un gen de respuesta temprana que se induce por PDGF, FGF-2, TGF- β 1 y altas concentraciones de glucosa. La inducción de TSP-1 va acompañada de marcadores de deposición de matriz extracelular como la fibronectina, la osteopontina y el PAI-1 (Yevdokimova et al., 2001). Posteriormente, se evidenció que la inducción de TSP-1 por glucosa podía ser inhibida por donadores de NO, inhibidores de la guanilato ciclasa, o el cofactor BH₄, indicando que el NO interviene en la activación de TGF- β 1 por TSP-1 inducida por glucosa (Wang et al., 2002)

En los modelos experimentales de glomerulonefritis, se observa un aumento transitorio de TSP-1 en áreas de lesión tubulointersticial a partir del quinto día de inducción. Los

tipos celulares implicados son las células tubulares, los miofibroblastos y algunos macrófagos. Es significativo que el aumento de TSP-1 es previo a la aparición de fibrosis intersticial y que correlaciona positiva y cuantitativamente con las áreas de fibrosis y los niveles de TGF- β 1, e inversamente con los niveles de LAP, sugiriendo que TSP-1 podría ser el principal activador de TGF- β 1 en modelos de fibrosis intersticial (Hugo et al., 1998). Se demostró *in vivo* que TSP-1 es el principal activador de TGF- β 1 en un modelo de glomerulonefritis mesangial proliferativa anti-Thy1 utilizando péptidos sintéticos que interfieren en la activación de TGF- β 1 por TSP-1. Así, la infusión continuada de los péptidos sintéticos LSKL reduce la expresión de TGF- β 1, de Smad2/3 y va asociada a la reducción de la acumulación de matriz extracelular y proteinuria (Daniel et al., 2004). Al mismo tiempo, en un modelo de glomerulonefritis anti-membrana basal, los ratones deficientes para TSP-1 desarrollan menor grado de proteinuria y creatinina sérica que los ratones salvajes. También se vieron reducidos otros índices, como la deposición de fibrina o el reclutamiento de macrófagos (Hochegger et al., 2004).

En humanos, TSP-1 se encuentra sobreexpresada en áreas glomerulares y tubulointersticiales de pacientes con glomerulonefritis, pero no se detecta en riñones sanos o con glomerulonefritis de cambios mínimos (McGregor et al., 1994).

TSP-1 y VEGF en la patología renal crónica

Independientemente de la causa inicial, la enfermedad crónica renal desemboca en glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial. En este proceso la microvasculatura renal es muy relevante. La pérdida de capilares peritubulares asociada a fibrosis intersticial se ha visto tanto en humanos como en modelos experimentales (Kang et al., 2002). Esta pérdida de capilares ocasiona hipoxia crónica por el empeoramiento en el reparto de nutrientes y oxígeno a las células tubulares e intersticiales.

Para el estudio de TSP-1 en la glomerulosclerosis y fibrosis intersticial se ha utilizado el modelo de nefrectomía 5/6, pero no por ligación de las arterias renales, sino por nefrectomía subcapsular con tal de minimizar el efecto del aumento de la presión arterial sobre la microvasculatura (Kang et al., 2001c). Tras la cirugía, se observa una respuesta angiogénica de las células endoteliales, tanto glomerulares como peritubulares, que posteriormente se reduce por debajo de los niveles basales. Esta

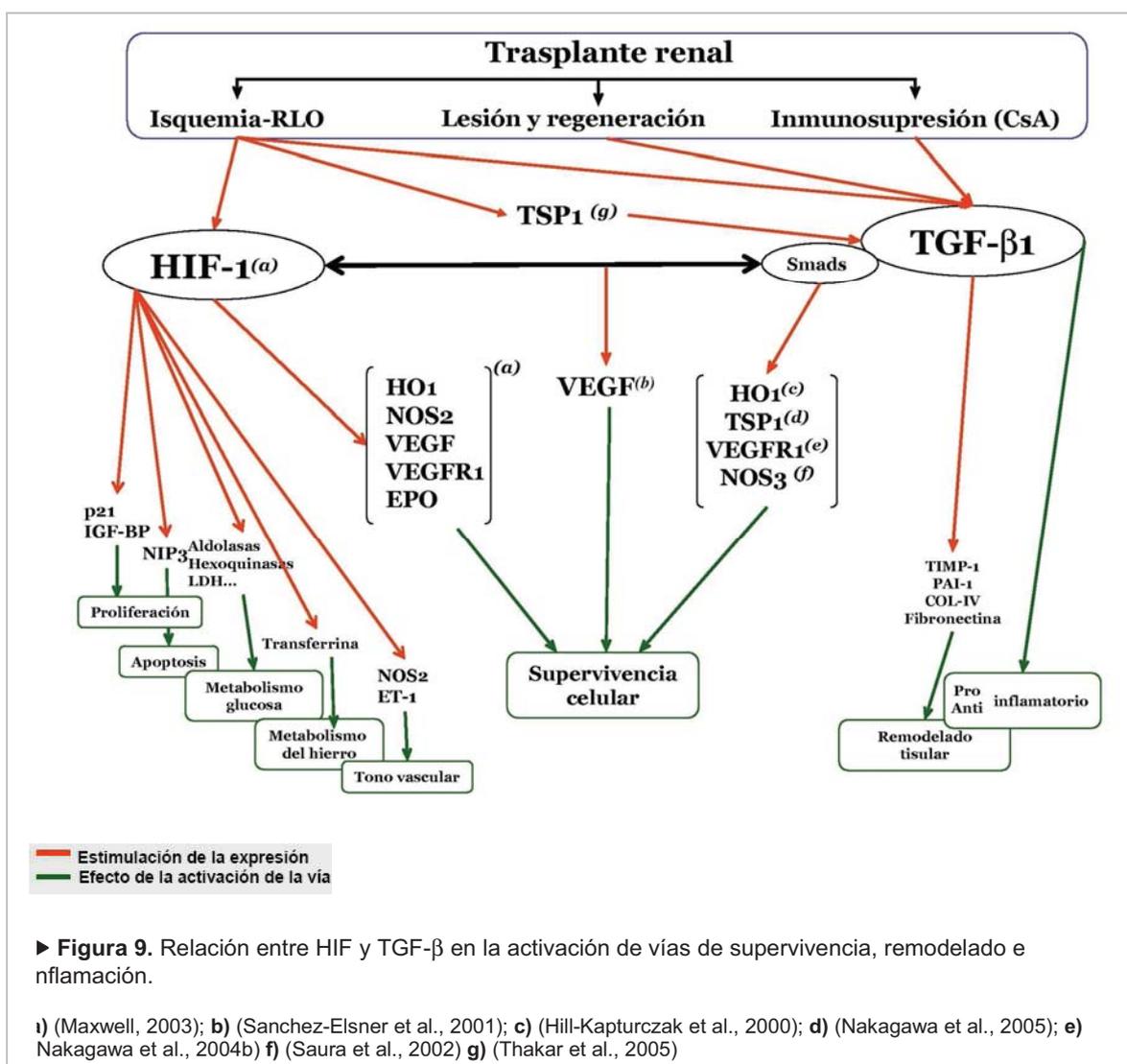
disminución en la proliferación endotelial, se acompaña de la expresión intersticial de TSP-1 y de la desaparición de VEGF, estableciéndose finalmente la pérdida progresiva de capilares peritubulares y aparición de glomerulosclerosis y fibrosis intersticial. La disminuida expresión de VEGF correlaciona asimismo con un aumento en el infiltrado por macrófagos (Kang et al., 2001c; Kang et al., 2002). La pérdida de capilares peritubulares se atribuye al balance entre factores proangiogénicos (VEGF, bFGF, TGF- β , HGF, prostaglandina-E₂) y antiangiogénicos (TSP-1, SPARC, angiostatina, endostatina) (Kang et al., 2002)

Otros autores observan un aumento continuo de TSP-1 en áreas glomerulares y tubulares a lo largo de las 10 semanas durante las que se prolongó el estudio (Hugo et al., 2002). Los tipos celulares implicados fueron las células mesangiales y endoteliales glomerulares, así como túbulos y macrófagos. Aunque a los macrófagos se les ha considerado proangiogénicos (Sunderkotter et al., 1994), pueden presentarse bajo múltiples fenotipos (Erwig et al., 2000), siendo uno de ellos el de producir factores antiangiogénicos como la TSP-1 (DiPietro and Polverini, 1993). Los sitios de expresión de TSP-1 correlacionaron igualmente con la expresión de TGF- β 1 (Hugo et al., 2002).

Conexiones entre los sistemas HIF-1 y TGF-β

La vía de señalización de TGF-β1 viene regulada por el complejo sistema de las proteínas Smads que controlan la transcripción génica cooperando con otras proteínas de unión al DNA.

En este sentido (Figura 9), se ha demostrado que la respuesta celular a la hipoxia viene mediada por Smads (Zhang et al., 2003) y que Smad3 coopera con HIF-1 en la inducción de VEGF (Sanchez-Elsner et al., 2001). De igual forma, la hipoxia tiene un efecto aditivo, ya que se potencia la estimulación de VEGF en células proximales *in vitro* (Nakagawa et al., 2004a).



Igualmente, TGF- β 1 estimula la expresión de HO-1 a través de Smad7 (Hill-Kapturczak et al., 2000), siendo HO-1 uno de los genes regulados por HIF-1 (Yang and Zou, 2001). Otro sistema en el que participan ambas vías es el del NO. NOS2 es inducida por hipoxia a través de HIF (Melillo et al., 1997) mientras que TGF- β 1 bloquea el aumento de NOS2 y la disminución de NOS3 en cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusión (Chen et al., 2001). TSP-1 es inducida fuertemente por TGF- β 1 a través de Smad2 (Nakagawa et al., 2004b) y por hipoxia (Phelan et al., 1998).

Mecanismo de acción de la ciclosporina y la azatioprina

La activación de las células B o T a través de sus receptores inicia una serie de eventos que desencadenan en una respuesta inmune. La activación de las células T corresponde a un proceso de maduración y de diferenciación, más que a una activación propiamente dicha. Así, una gran cantidad de genes se inducen para pasar de un estado de reposo a un estado de preparación de entrada a ciclo celular. El objetivo de la activación de las células T es coordinar las acciones de varios tipos celulares que de por sí no expresan receptores de antígeno, aunque deban responder a él.

Esta regulación viene mediada por la secreción de citoquinas y por la expresión de moléculas de membrana que mediarán el contacto intercelular directo. El tipo de respuesta inmune que se desencadene dependerá en gran medida del subtipo de célula T que se active. Así, la IL-3 y el granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) se han implicado en la activación de macrófagos y granulocitos, que no tienen receptores de antígeno propios. El interferón- γ (IFN- γ), uno de los productos específicos liberado por los linfocitos T, induce la síntesis del receptor de alta afinidad Fc y del complejo II del MHC en macrófagos, mientras que IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, el ligando CD40 y el TGF- β liberado por las células T median la activación de las células B (Delves and Roitt, 2000a; Delves and Roitt, 2000b).

Azatioprina

La primera generación de fármacos inmunosupresores en el área del trasplante se desarrolló como antiproliferativo en la lucha contra el cáncer en la década de los sesenta. Azatioprina (Aza) previene la proliferación de los linfocitos por la inhibición de la síntesis de purinas y, por tanto, la inhibición de la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos. Aza se metaboliza a 6-mercaptopurina en el hígado, que posteriormente se convierte en 6-inosina monofosfato. Esta molécula inhibe las enzimas responsables de la síntesis de adenosina (AMP) y guanosina (GMP) monofosfato (Stepkowski, 2000).

La 6-mercaptopurina evitó el rechazo de injertos en estudios experimentales y, posteriormente, Aza se mostró con menor toxicidad por lo que fue utilizada en el trasplante renal (Murray et al., 1963). A pesar de su menor toxicidad, Aza causa una

gran depresión de la actividad de la médula ósea (leucopenia, trombocitopenia, anemia) lo que desemboca en una tasa superior de infecciones. Además, es incapaz de bloquear los linfocitos T pre-sensibilizados. Asimismo, uno de los metabolitos de Aza, el ácido 6-tioinosínico, puede ser motivo de rotura cromosómica en varios tipos celulares.

La segunda generación de inmunosupresores selectivos para las células T incluye la ciclosporina, el tacrolimus y el sirolimus.

Ciclosporina

La ciclosporina (CsA) es un undecapéptido cíclico que se purificó por primera vez de extractos del hongo *Tolypocladium inflatum* en 1976. Su uso clínico fue aprobado en 1983. La CsA sido el primer fármaco selectivo para las células T, hecho que revitalizó el campo del trasplante paralizado en aquel tiempo por los efectos mielosupresores de Aza (Borel et al., 1976; Kahan et al., 1985). La CsA se une a la inmunofilina ciclofilina para inhibir la fosfatasa calcineurina y prevenir la generación del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT). NF-AT media la regulación al alza de varias citoquinas, entre ellas la IL-2, imprescindible para la proliferación y maduración de las células T (Liu et al., 1991). Asimismo, media la síntesis de INF- γ , que como se ha comentado, es crítico para la activación de macrófagos.

Los primeros estudios de selectividad y eficacia de la CsA, comparada con Aza, mostraron un aumento del 80% frente a un 51% en la tasa de supervivencia del injerto al año en injertos de donantes a corazón parado (Calne et al., 1978). Asimismo, los regimenes CsA-prednisolona permitieron el éxito de otros trasplantes, como el de corazón, hígado, pulmones y simultáneo de corazón y pulmón. La terapia basada en CsA ha reducido la morbilidad de los pacientes y ha superado algunos de los efectos adversos y factores de riesgo del tratamiento con Aza (transfusiones pre-trasplante, posibilidad de re-trasplante y el requerimiento de correspondencia perfecta entre alelos del sistema HLA) (Kahan et al., 1985).

Las mayores limitaciones del tratamiento con CsA son su toxicidad, especialmente la renal. Ninguno de los análogos de la CsA está libre de efectos nefrotóxicos. La nefrotoxicidad por CsA se asocia a depósitos mucoides en las arteriolas, fibrosis focal

potenciada por la vasoconstricción, alteraciones en el metabolismo del calcio y en el balance prostaciclina-tromboxano y activación de la pro-renina (Mihatsch et al., 1998).

El tratamiento con CsA puede desencadenar en dislipidemias, intolerancia a la glucosa, hipertensión secundaria, hipertrofia gingival o hirsutismo (Stepkowski, 2000).

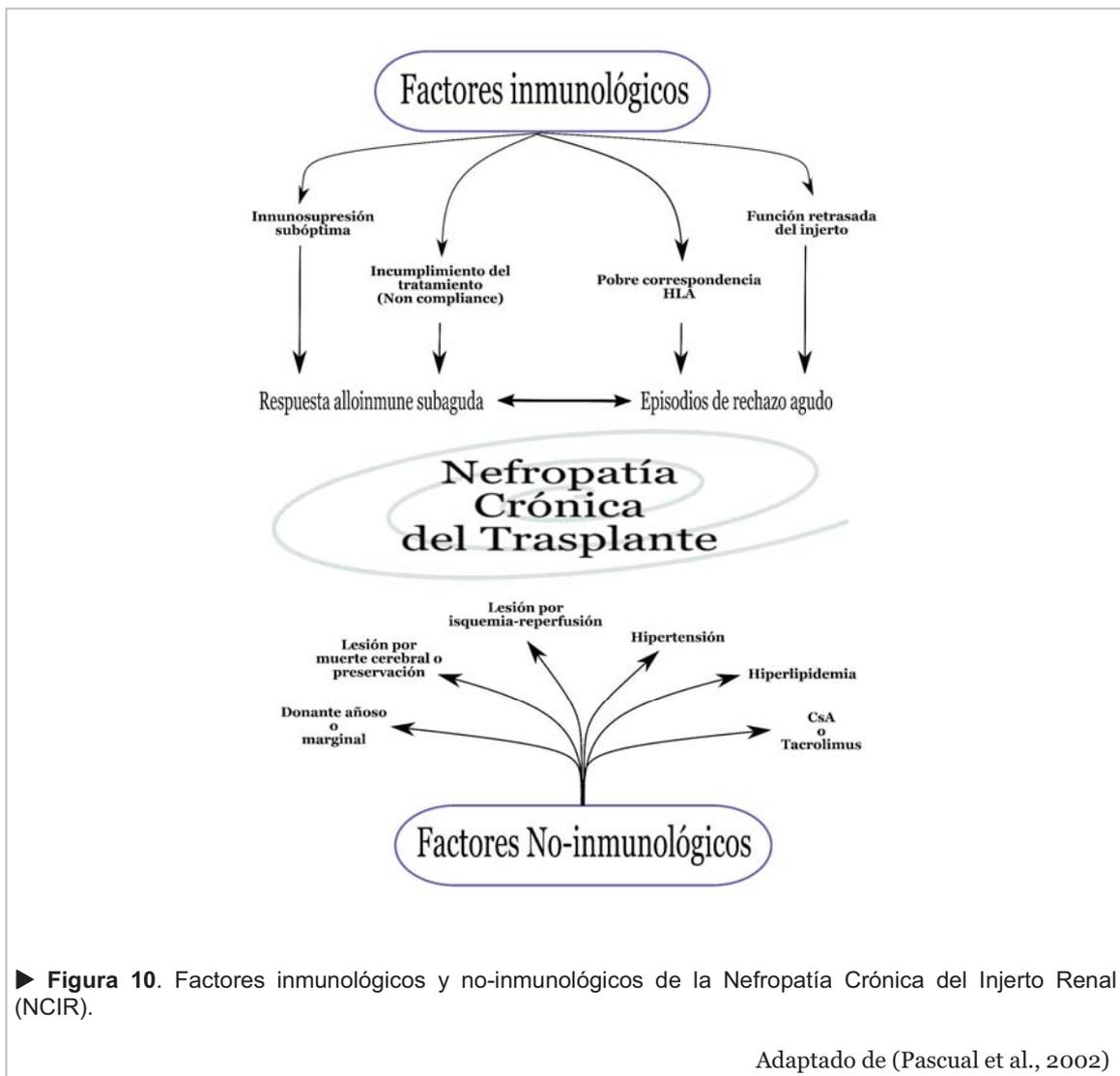
Por último, el tratamiento con CsA se ha relacionado con la nefropatía crónica del injerto renal (NCIR). Ésta se basa en que:

1. La CsA es más efectiva bloqueando la función de las células T que las B. Su inhibición sobre la producción de anticuerpos es escasa, creándose anticuerpos contra el injerto que se han visto implicados en la NCIR (O'Garra et al., 1986).
2. La CsA inhibe eficazmente la síntesis de IL-2 e IFN- γ por las células Th1 (T-helper 1), pero no inhibe del todo la producción de IL-4, IL-5 e IL-7 por las Th2 (Tian et al., 1997).
3. La CsA regula al alza la síntesis de TGF- β 1, uno de los mediadores más notables de la actividad fibrogénica del injerto (Khanna et al., 1994; Khanna et al., 1997).
4. La variabilidad intraindividual de las concentraciones de CsA, la edad del donante, o los periodos de isquemia-reperfusión pre-trasplante, son factores de riesgo para la NCIR asociada al tratamiento por CsA.

Complicaciones a largo plazo del trasplante renal, la NCIR

La NCIR se presenta como la pérdida progresiva de la función del injerto asociada a proteinuria e hipertensión arterial, caracterizándose por la proliferación de VSMC de los vasos que provocan un estrechamiento de arterias y arteriolas acompañadas de deposición de matriz extracelular intersticial y glomerulosclerosis. Otros tipos celulares están implicados en este proceso, como las células endoteliales y macrófagos/monocitos capaces de producir también factores profibróticos como TGF- β 1, IL-1 o IL-6.

Los factores de riesgo de la NCIR clasifican en inmunológicos y no-inmunológicos (Figura 10) (Pascual et al., 2002).



► **Figura 10.** Factores inmunológicos y no-inmunológicos de la Nefropatía Crónica del Injerto Renal (NCIR).

Adaptado de (Pascual et al., 2002)

Entre los inmunológicos destacan los episodios de rechazo agudo, y de entre los no-inmunológicos, la lesión por isquemia-reperfusión, la hipertensión, las anomalías lipídicas, la nefrotoxicidad por CsA o la edad avanzada del donante (Campistol and Grinyo, 2001). Se ha prestado especial interés en los últimos años a TGF- β 1, ya que es el principal responsable de la reparación tisular, regulando la expresión de genes directamente relacionados en la síntesis y degradación de la matriz extracelular como el PAI-1, las metaloproteasas (MMP) y sus inhibidores (TIMPs), o colágenos de varios tipos (Border and Noble, 1994; Branton and Kopp, 1999). Es de gran importancia el papel que juegan tanto los inhibidores de la calcineurina (CsA, FK506) como la activación del sistema renina-angiotensina en la inducción de TGF- β 1 en el contexto de la NCIR. TGF- β 1 presenta asimismo efectos opuestos en la proliferación celular, siendo un estímulo para la proliferación de fibroblastos y células mesangiales e inhibiendo la proliferación de las células tubulares epiteliales (Campistol et al., 2001).

Se ha prestado gran interés a otros factores de crecimiento como PDGF, IGF-I, EGF, CTGF o el VEGF que ven alterada su expresión por varios estímulos que acontecen durante (hipoxia, lesión por isquemia/reperfusión) o tras el trasplante (rechazo, muerte celular, inhibidores de la calcineurina, hipertensión). La complejidad en la interacción de estos factores aumenta con la composición de la matriz extracelular. Muchas de las acciones de estos factores de crecimiento vienen reguladas por ciertas proteínas como la TSP-1, la decorina, o el *serin protein acidic and rich in cystein* (SPARC) presentes en la matriz extracelular (Johnson, 2000).

El origen de la activación o inhibición de estos factores de crecimiento es desconocido, se postula que la pérdida de masa renal da lugar a un aumento de la tasa de filtración glomerular, que desemboca en estrés por cizallamiento que a su vez provoca el aumento de ciertos factores de crecimiento –como TGF- β 1 o PDGF– responsables de la proliferación de las células mesangiales y de deposición de matriz extracelular (Johnson, 2000).

► **Hipótesis**

Hipótesis

De la revisión bibliográfica se deducen las siguientes premisas:

- i. El trasplante renal es el tratamiento de elección para la enfermedad renal terminal. La gran demanda de órganos hace que se esté actualmente aumentado el pool de donantes, admitiendo los donantes a corazón parado.
- ii. La isquemia caliente en estos órganos tiene como consecuencia una mayor frecuencia de retraso de la función del órgano en los pacientes receptores, aunque la supervivencia del órgano a largo plazo parece ser muy similar.
- iii. Los periodos de isquemia caliente, fría y reperfusión del órgano afectan a la recuperación del órgano en el inmediato postrasplante.
- iv. El factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1, participa en la homeostasis renal y en la regulación de importantes sistemas citoprotectores renales como el VEGF, la NOS2 o la HO-1 entre otros.
- v. Las propiedades pro y antiinflamatorias, así como la capacidad de regeneración de la matriz extracelular, hacen de TGF- β 1 una molécula esencial en la recuperación del órgano en modelos de isquemia-reperfusión.
- vi. TSP-1, el principal activador de TGF- β 1 en el riñón, se ha relacionado con la pérdida de capilares peritubulares en modelos de patología renal crónicos, pero se desconoce su patrón de expresión en el ámbito del trasplante renal.

Consiguientemente, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

La isquemia caliente que sufren los donantes a corazón parado altera negativamente la expresión de ciertos genes citoprotectores y de regeneración tisular, con repercusión sobre el retraso en la función del injerto.

Objetivo general

El objetivo general es determinar la expresión de RNAm de genes implicados tanto en la citoprotección frente a la lesión por isquemia-reperfusión como la posterior regeneración renal tras periodos variables de isquemia caliente y fría en un modelo de trasplante renal en cerdo con dos tratamientos inmunosupresores.

Objetivos concretos

Este objetivo general se desglosa en 4 objetivos concretos:

1. Determinar la expresión de genes citoprotectores durante el trasplante renal y a los cinco días postrasplante. Estos marcadores son:
 - i. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF1 α)
 - ii. El factor de crecimiento endothelial vascular (VEGF)
 - iii. La hemoxigenasa-1 (HO1)
 - iv. La óxido nítrico sintasa-2 (NOS2)
 - v. La óxido nítrico sintasa-3 (NOS3)
2. Determinar la expresión de genes implicados en la regeneración tubular durante el trasplante renal y a los cinco días postrasplante. Estos marcadores son:
 - i. El factor transformante del crecimiento- β 1 (TGF- β 1)
 - ii. La trombospondina-1 (TSP-1)
3. Establecer el efecto de diferentes tiempos de isquemia caliente sobre la expresión de los genes analizados en los puntos 1 y 2.
4. Establecer el efecto del tratamiento inmunosupresor (CsA y Aza) sobre la expresión de los genes analizados en los puntos 1 y 2.

► Resultados

Artículo 1**Expression of transforming growth factor- β 1 and hypoxia-inducible factor-1 α in an experimental model of kidney transplantation****Resumen**

Antecedentes: El síndrome de isquemia-reperfusión es uno de los factores patogénicos importantes en el trasplante renal, tanto en el desarrollo del retraso de función del injerto, como en el desarrollo de rechazo agudo y crónico. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), activa la transcripción de varios genes implicados en la supervivencia celular, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en la reparación tisular, como el factor transformante del crecimiento- β . El objetivo de este estudio fue caracterizar los perfiles de expresión de TGF- β 1, VEGF y HIF-1 α durante el trasplante renal en un modelo experimental en cerdos con donantes a corazón latiente (HBD) y parado (NHBD).

Material y Métodos: el modelo experimental de trasplante renal incluyó cuarenta pares de cerdos Large White/Landrace en dos grupos de HBD y NHBD. El período de seis horas de isquemia fría fue el mismo para todos los grupos. Se estudiaron tres tiempos de isquemia caliente: 30, 45 y 90 minutos. La terapia inmunosupresora consistió en ciclosporina, excepto en un grupo HBD que fue tratado con azatioprina. Los perfiles de expresión de TGF- β 1, VEGF y HIF-1 α se determinaron por PCR cuantitativa en RNA total extraído de biopsias corticales, recogidas tras la inducción anestésica, tras 30, 45 o 90 minutos de isquemia caliente, una hora tras la reperfusión en el receptor y al quinto día posterior al trasplante.

Resultados: La expresión de TGF- β 1 aumentó tras la isquemia fría en el grupo HBD, mientras que permaneció sin cambios durante el trasplante en los grupos NHBD. La expresión de HIF-1 α y VEGF no se modificó durante la cirugía en ambos grupos. Todos los grupos presentaron un aumento significativo en la expresión de TGF- β 1 y HIF-1 α , así como una disminución de VEGF al quinto día postrasplante. Estos efectos fueron independientes del tratamiento inmunosupresor. El mayor aumento en la expresión de

TGF- β 1 se produjo en los grupos HBD, especialmente en el grupo tratado con azatioprina, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística.

Conclusiones: la regulación al alza inicial de TGF- β 1 que se observa en los grupos HBD inmediatamente después de la isquemia fría, podría tener un efecto beneficioso sobre la regeneración epitelial tubular. La isquemia caliente tuvo un efecto negativo sobre la expresión de TGF- β 1 en las primeras fases del trasplante renal, mientras que no se observó efecto sobre la expresión de VEGF o HIF-1 α . La regulación al alza de TGF- β 1 y HIF-1 α tras el trasplante, podría tener un efecto positivo en la reparación tubular. La expresión de TGF- β 1 fue inferior en los animales tratados con ciclosporina respecto a azatioprina, probablemente a causa de su toxicidad celular.

0041-1337/03/7510-1647/0
TRANSPLANTATION
Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins, Inc.

Vol. 75, 1647-1654, No. 10, May 27, 2003
Printed in U.S.A.

EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 AND HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-1 α IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF KIDNEY TRANSPLANTATION

SERGIO LARIO,¹ DIOGO MENDES,² MÓNICA BESCÓS,¹ PABLO INIGO,¹ BEGONA CAMPOS,³ RICARDO ALVAREZ,² ANTONIO ALCARAZ,² FRANCISCA RIVERA-FILLAT,⁴ AND JOSEP M. CAMPISTOL^{1,5}

Background. Ischemia-reperfusion syndrome has been recognized as an important pathogenic factor in renal transplantation, not only in the development of delayed graft function but also in the development of acute and chronic rejection. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activates transcription of several genes implicated in cell survival, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), and in tissue repair transform-

ing growth factor (TGF)- β . The purpose of this study was to characterize TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α expression profiles during renal transplantation with heart-beating donors (HBD) and non-heart-beating donors (NHBD).

Methods. An experimental model of renal transplantation using 40 pairs of large, white, Landrace pigs and including HBD and NHBD was used. Cold-ischemia time was the same in all groups (6 hr), and three groups of NHBD (30, 45, and 90 min) were studied. Immunosuppressive therapy consisted of cyclosporine, except in one HBD group, which was treated with azathioprine. TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α expression profiles were performed in renal biopsies obtained at different times: after anesthetic induction (basal); 30, 45, and 90 min after warm ischemia; after cold ischemia; 1 hr after reperfusion; and 5 days after transplantation.

Results. TGF- β 1 expression increased after cold ischemia in HBD and remained unaltered during the surgical process in all NHBD groups. HIF-1 α and VEGF expression were not greatly modified during surgery in the HBD or NHBD groups. All groups showed a significant increase in TGF- β 1 and HIF-1 α

¹ Renal Transplant Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Urology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³ BioStatistic Unit of the Public Health Department, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴ Hormonal Laboratory, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁵ Address correspondence to: Dr. Josep M. Campistol, Renal Transplant Unit, Hospital Clinic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jmcampis@medicina.ub.es.

Received 29 August 2002.

Revision Requested 30 September 2002. Accepted 26 January 2003.

DOI: 10.1097/01.TP.00000653128.86981.B2



expression as well as down-regulation of VEGF 5 days after transplantation, and these effects were independent of immunosuppressive treatment. There were no statistically significant differences among the groups at 5 days after transplantation, although the increase in TGF- β 1 was more pronounced in the HBD groups, especially in azathioprine-treated animals.

Conclusions. The initial up-regulation of TGF- β 1 observed in HBD immediately after cold ischemia could have a positive effect on epithelial-tubular regeneration. Warm ischemia has a detrimental effect on TGF- β 1 expression during the early phases of renal transplantation and has no effect on VEGF and HIF-1 α expression. The up-regulation of TGF- β 1 and HIF-1 α observed after transplantation could have a positive effect on tubular repair. TGF- β 1 expression was lower in animals treated with cyclosporine, probably because of cellular toxicity.

Deprivation of cellular energy caused by ischemia and the acute inflammatory process generated after reperfusion and mediated by oxygen-free radicals, endothelial factors, and leukocytes leads to ischemia-reperfusion (I/R) syndrome. Renal damage and the subsequent recovery of delayed graft function largely depend on the duration of warm and cold ischemia.

Acute rejection recently has been suggested to be mediated not only by the recognition of non-self-alloantigens but also by recognition of the injured kidney cells after I/R (1). This notion has been extended to chronic allograft nephropathy. Antigen-independent factors such as I/R, delayed graft function, and graft mass are thought to be risk factors for the long-term development of glomerulosclerosis, arterial obliteration, and interstitial fibrosis. The "injury response" hypothesis states that during I/R the injured kidney secretes immunogenic substances that increase its antigenicity (2). The acute inflammatory response to I/R has recently been shown to be largely independent of the immunologic background: failure of interstitial and perivascular monocytic infiltrate to disappear after restoration of renal function could contribute to the maintenance of injury, leading to chronic allograft nephropathy (3). Several strategies have been tested to reduce I/R injury such as the administration of exogenous growth factors, optimization of cold-organ storage, and ischemic preconditioning, among others.

Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 is a transcriptional activator involved in tissue-oxygen homeostasis (4). HIF-1 is a heterodimeric protein, formed by inducible HIF-1 α and constitutively expressed HIF-1 β proteins, which binds to hypoxia-responsive elements to activate transcription of genes related to iron, energy and matrix metabolism, vascular regulation, and cell survival. Several of these genes have been implicated in renal repair after I/R including vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 1 (5,6), transforming growth factor (TGF)- β isoforms (7), heme-oxygenase 1 (8), inducible nitric oxide (NO) synthase (9), plasminogen activator inhibitor-1 (10), and p21 (11), among others.

TGF- β 1 plays a major role in extracellular-matrix homeostasis in the kidney (12) and is present at sites of injury in which it acts as both a proinflammatory and an immunosuppressive agent (13). TGF- β 1 also has been implicated in the development of fibrotic renal diseases such as glomeru-

lonephritis, diabetic nephropathy, and chronic allograft nephropathy (14). The possible role of TGF- β 1 in the restoration of renal function after I/R has recently been defined. In an experimental model of acute renal failure, TGF- β 1 showed early up-regulation after renal artery clamping, suggesting that, in this scenario, TGF- β 1 may restore renal function by directly promoting cellular differentiation or by generating new extracellular matrix, in which epithelial cells differentiate (7). Smad proteins regulate the signaling pathways of the TGF- β superfamily by recruiting co-activators and co-repressors. An interaction between Smad3 and HIF-1 α for the induction of the VEGF promoter recently has been reported (15), lending support to the notion that both hypoxia and TGF- β 1 synergistically cooperate to induce VEGF expression, a key survival factor for endothelial cells in the kidney (6).

These data suggest that TGF- β 1 may be a pivotal growth factor involved in both the early and late events that take place after I/R, such as proinflammatory-cell recruitment and tubular-epithelial-cell regeneration. However, the profile of TGF- β 1 expression during renal transplantation has not been assessed, nor have the effects of different warm ischemia times or those of immunosuppressive treatment. In this study, we characterize the expression profile of TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α in different key stages of renal transplantation in an experimental animal model resembling human-kidney transplantation with heart-beating donors (HBD) and non-heart-beating donors (NHBD).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Transplantation Model

The surgical and experimental protocols were performed in accordance with the policy and guidelines of the Ethical Committee for Human and Animal Studies of our institution. Experimental transplantations were performed in 40 pairs of large, white, Landrace pigs weighing 20 to 30 kg (Isoquimen, Barcelona, Spain). After administration of 15 mg/kg of thiopental (Abbott Laboratories Inc., Abbott Park, IL), the animals were intubated and general anesthesia was applied by administration of isoflurane 0.7% to 1.0% (Abbott) and 100% oxygen. The aorta and inferior vena cava were dissected and cannulated. Before infusion of heparin sodium (3 mg/kg) (Rovi, Madrid, Spain), cardiac arrest was provoked by infusion of 20 to 30 mEq of KCl. Warm ischemia was prolonged for 30, 45, or 90 min. The kidneys were then flushed in situ via the aorta with 1 L of ice-cold Wisconsin solution (DuPont Pharma, Bruxelles, Belgium) and removed by isolation of the inferior and infrahepatic vena cava, aorta, and ureters. Cold ischemia was performed for 6 hr in sterile Ringer lactate solution (Fresenius, Bad Homburg, Germany) at 4°C. Bilateral nephrectomy was then performed in the recipient. The donor renal vein and artery were anastomosed with Prolene 6-0 (Arago, Barcelona, Spain) to the recipient vessels. Vascular clamps were removed and the graft was reperfused for 1 hr to assess reperfusion injury. Ureteral reconstruction was performed by ureteroneocystostomy. Meperidine (50–100 mg) was administered as analgesia. Immunosuppression was achieved by administration of methylprednisolone (250 mg) (Pharmacia, Peapack, NJ) and azathioprine (AZA) (1.5 mg/kg) (Medeva Pharma, Madrid, Spain) during anesthetic induction in all animals. A second dose of methylprednisolone (250 mg) was administered before renal reperfusion. Twenty-four hours after experimental transplantation, the animals received AZA or cyclosporine (CsA), as explained in the study design.

Cortical biopsies were collected at five time points: (1) after anesthetic induction (basal); (2) after 30, 45, or 90 min of warm ischemia; (3) after the period of cold ischemia; (4) 1 hr after reperfusion; and (5) 5 days after transplantation. Biopsies were distributed for conven-



tional histology or were snap-frozen and stored in liquid nitrogen immediately after scission.

Study Design

The study design is illustrated in Figure 1. Animals were divided into HBD (n=10) and NHBD (n=30) groups. At the end of the experimental transplantation, HBD animals were treated with CsA (20 mg/kg/day) (Novartis, Barcelona, Spain) (CsA-HBD group, n=5) or AZA (1.5 mg/kg/day) (AZA-HBD group, n=5). The AZA-HBD group was included to assess the effect of CsA on TGF- β 1 expression. NHBD were divided into three distinct warm-ischemia times: 30 min of warm ischemia (30-NHBD group, n=10); 45 min of warm ischemia (45-NHBD group, n=10); and 90 min of warm ischemia (90-NHBD group, n=10). All animals in the NHBD groups received CsA (20 mg/kg/day).

Histologic Studies

Biopsies were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin. Sections were examined for mononuclear infiltrate, acute tubular necrosis (ATN), and the presence or absence of cortical necrosis (CN). The degree of ATN was determined by a semiquantitative scale: 0 = no abnormalities; 1+ = mild; 2+ = moderate; and 3+ = severe.

Quantitative Determination of TGF- β 1, VEGF, HIF-1 α , and 18S Ribosomal RNA by Competitive or Real-time Polymerase Chain Reaction

Table 1 summarizes polymerase chain reaction (PCR) conditions, standard curves, and complementary DNA (cDNA) inputs for the four genes analyzed. TGF- β 1 expression was determined by competitive quantitative PCR. VEGF, HIF-1 α , and 18S ribosomal RNA (rRNA) expression levels were determined by kinetic real-time PCR. Real-time PCR efficiencies were calculated from the slopes provided in LightCycler software. All real-time PCR analyzed genes showed high efficiencies and low interassay coefficients of variation in the investigated expression range. A brief description of protocols is provided below; detailed protocols for both quantitative and real-time PCR can be obtained from the authors on request.

RNA isolation and reverse transcription. Total RNA was isolated by the guanidinium-isothiocyanate method. Integrity was checked by visualization of total RNA in denaturing agarose gels. Total RNA was transcribed into cDNA with random primers and AMV reverse transcriptase (Promega Corp., Madison, WI). Genomic contamination was checked by performing the reverse transcription (RT) without AMV (RT-). RT reagents also were checked for amplicon contamination by the inclusion of a control without RNA (RNA-).

Generation of TGF- β 1 DNA internal standard. A heterologous DNA internal standard (DNA-IS) composed by phage lambda DNA as spacer and primer sequences for TGF- β 1 was constructed using a modification of PCR-MIMICS methodology (16). The cloned DNA-IS was identified by sequencing (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer, Wellesley, MA). The expression range for TGF- β 1 in the kidney was determined and the DNA-IS was aliquoted and stored at -20°C until use in competitive PCR.

Competitive TGF- β 1 quantification. Competitive PCRs were batch-processed with the inclusion of experimental samples obtained at basal, warm ischemia, cold ischemia, 1 hr after reperfusion, and 5 days after experimental transplantation. Twelve PCR tubes were prepared for each experimental sample: seven dilutions of DNA-IS; two positive controls for RT (RT+) and DNA-IS (DNA-IS+); and three negative controls: RT-, RNA-, and PCR blank (PCR-). PCR mix was composed of: 1 \times PCR buffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2.0 mM of dNTPs, 0.9 mM of MgCl₂, 0.25 μ M of TGF- β 1 primers, 0.75 U of Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim), and 1.0 μ L of the corresponding RT or positive or negative controls. Amplification was performed in a PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA). After 2% (w/v) agarose-gel electrophoresis, the PCR intensities for endogenous and DNA-IS products were quantified by densitometry (Phoretix-1D, Nonlinear Dynamics, Durham, NC) and band intensities were corrected by product size. The ratio of endogenous TGF- β 1 to corrected DNA-IS band intensities was calculated for each line and plotted as a function of the amount of initial DNA-IS added to the reaction. The point of equivalence was determined by linear regression using GraphPad Prism 3.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). The results were corrected and expressed as molecules of TGF- β 1/ μ g RNA.

Semiquantitative real-time PCR for HIF-1 α , VEGF, and 18S rRNA with external standard curve. Annealing and acquisition temperatures for each gene were determined empirically. Relative standard curves were constructed by serial dilutions of a cDNA pool from basal biopsies. Mastermix for the LightCycler reaction contained FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 1.0U of uracil N-glycosylase (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 0.5 μ M of each primer, the corresponding MgCl₂ concentration and the respective amounts of cDNA standard curve, unknowns, and positive and negative controls. Capillaries were placed into the Lightcycler rotor and a specific run protocol, consisting of PCR amplification and melting analysis for each gene was performed. Crossing points and the equivalent cDNA concentrations were calculated by LightCycler software, version 3.5. The results are expressed as equivalents of cDNA per capillary.

Statistical Analysis

The normality of the distribution of TGF- β 1, VEGF, HIF-1 α , and 18S rRNA was examined by Q-Q Normal Plots and tested with the Shapiro-Wilk statistic. Deviation from normal distribution was observed for TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α . Values of these genes were normalized applying natural logarithm. The Spearman's rho correlation coefficient (r_s) was used to analyze correlation among the four genes. mRNA expression during surgery was analyzed by multivariate analysis of variance (MANOVA). Gene expression at 5 days after experimental transplantation was analyzed by subtracting the corresponding 5 days after experimental transplantation transformed data from the corresponding transformed basal values and compared by paired-samples *t* test. Statistical analysis was performed using SPSS 10.0 software (SPSS Institute Inc., Cary, NC). Statistical significance was set at $P < 0.05$. The results are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Histologic Classification

Table 2 shows the number of biopsies classified according to normal histology, ATN, or CN. The HBD group (n=10)

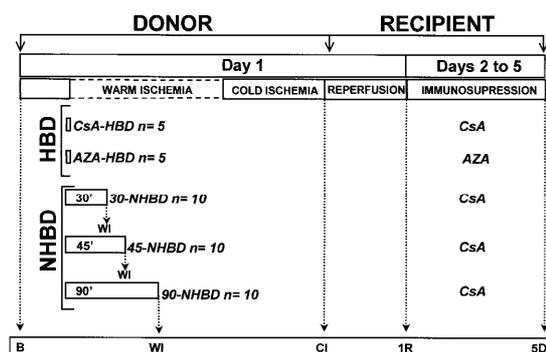


FIGURE 1. Design of the experimental protocol. Time points when cortical biopsies were collected (dotted arrows).

TABLE 1. Primer pairs and PCR conditions

Gene and accession	Primer sequence and amplicon size	Method and standard curve	T _a (°C)	Mg ⁺⁺ (mM)	Cp and cDNA input	Eff (n=8)	%CV _i (n=8)
TGF-β1 M23703	F 5'-GCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGT R 5'-TCATAGATTTGGTTGCCGCTTTC 339bp	Competitive PCR 1.0E5→1.4E2 molecules/tube	57	0.9	—	—	21.2% ^b
VEGF AF461807	F 5'-CAATCGAGACCCTGGTGGACATC R 5'-TTCTTGCTCGCTCTATCTTTCTTTG 260bp	Real-time PCR 100→3.1 ng/capillary	60	2.5	23.8±0.18 ^a 12.5 ng	2.0±0.12 ^a	7.08%
HIF-1α AJ439692	F 5'-TGGCAGCAATGACACAGAAAC R 5'-TGGGTCATGGTAAAAGAAAGT 243bp	Real-time PCR 100→3.1 ng/capillary	60	2.5	23.1±0.23 12.5 ng	1.9±0.03	7.82%
18SrRNA AF179868 AF102857	F 5'-CGTCCCCGCCCTTGCCTCT R 5'-GCTTTCGCTCTGGTCCGCTT 271bp	Real-time PCR 500→0.5 pg/capillary	60	3.0	25.8±0.24 20.0 pg	1.9±0.07	15.0%

^a Data for Cp and Eff are presented as means±SD.

^b %CV represents the combination of RT and PCR.

bp, base pairs; cDNA, complementary DNA; Cp, crossing point; CV_i, inter-assay coefficient of variation; Eff, amplification efficiency; F, forward primer; HIF-1α, hypoxia-inducible factor 1α; PCR, polymerase chain reaction; R, reverse primer; T_a, annealing temperature; TGF-β1, transforming growth factor-β1; VEGF, vascular endothelial growth factor; 18S rRNA, 18S ribosomal RNA.

TABLE 2. Histopathologic findings after cold or warm ischemia at 5 days after experimental transplantation^a

Treatment	n	Normal	ATN			CN	
			+	++	+++	10% and ATN+++	100%
HBD							
CsA	5	3	2	—	—	—	—
AZA	5	—	5	—	—	—	—
NHBD							
30'	10	3	3	2	—	1	1
45'	10	1	6	—	1	—	2
90'	11	1	3	3	—	2	2
Total HBD	10	3	7	—	—	—	—
Total NHBD	31	5	12	5	1	3	5

^a Values are number of cases for each category.

HBD, heart beating donors; NHBD, non-heart beating donors; ATN, acute tubular necrosis; CN, cortical necrosis; CsA, cyclosporine; AZA, azathioprine.

showed minimal histologic changes: three pigs (30%) presented normal histology, and seven (70%) showed ATN+. Among the NHBD groups (n=31), normal histology was found in five pigs (16%), ATN+ in 12 (39%), ATN++ in five (16%), ATN+++ in one (3%), ATN+++ with 10% CN in three (10%), and 100% CN in five (16%). As expected, no cases of CN were observed in the HBD groups, whereas the five cases of CN were in the NHBD groups, distributed as follows: one case in the 30-NHBD group, and two cases for each of the 45- and 90-NHBD groups. Gene expression was not determined in the biopsies with CN. In all biopsies, cellular infiltration was less than 20%, excluding acute rejection.

Statistical Correlations Between Genes

A highly significant correlation was observed between transformed basal values of HIF-1α and VEGF (Fig. 2A, Spearman $r_s=0.796$, $P<0.0001$). In addition, basal HIF-1α correlated with TGF-β1 (Fig. 2B, Spearman $r_s=0.416$, $P<0.05$). No significant correlation was observed between basal TGF-β1 and VEGF. At 5 days after experimental transplantation none of the correlations were significant.

Gene Expression During Surgery

The results of TGF-β1, VEGF, HIF-1α, and 18S rRNA expression for the HBD and NHBD groups are described in Figure 3. TGF-β1 mRNA expression was up-regulated after cold ischemia in the HBD group (Fig. 1A, Basal: $7.9±0.70$ vs. cold ischemia: $8.9±0.89$ molecules TGF-β1/μg RNA, $P<0.05$; note that a 0.98 difference in the natural logarithm-transformed data corresponds to an untransformed value of 2.6-fold). Because there were no differences among 30-, 45-, and 90-NHBD groups with respect to mRNA expression during surgery (data not shown), values from the three NHBD groups were pooled for graphical representation. TGF-β1 mRNA expression was not up-regulated in the NHBD groups. VEGF, HIF-1α, and 18S rRNA levels remained unaltered during the surgical process in both HBD and NHBD groups.

Gene Expression at 5 Days After Experimental Transplantation

Figure 4 shows a graphical comparison of TGF-β1, VEGF, HIF-1α, and 18S rRNA expressions at basal and at 5 days



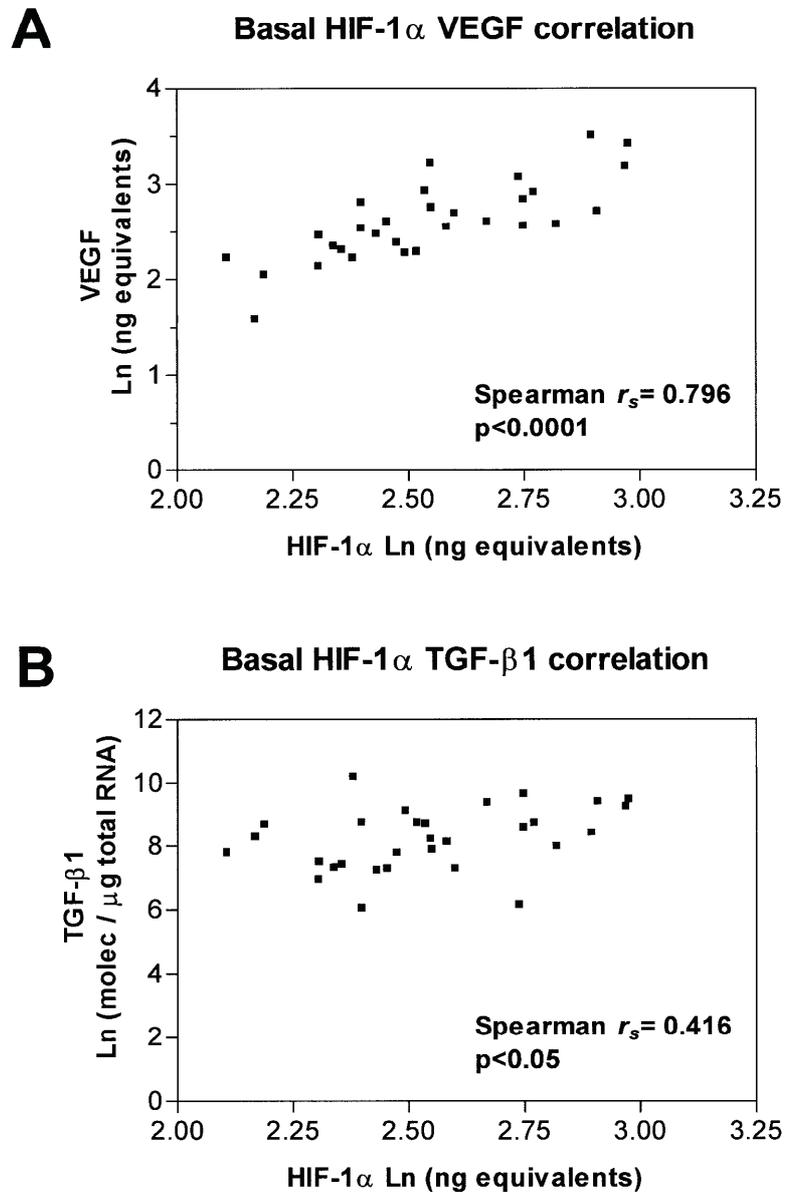


FIGURE 2. Correlation of gene expression in basal biopsies. (A) Correlation between HIF-1 α and VEGF. (B) Correlation between HIF-1 α and TGF- β 1.

after experimental transplantation. All groups showed a significant increase ($P < 0.05$) in TGF- β 1 expression. The natural logarithm of these differences were as follows: CsA-HBD = 1.9 ± 0.72 ; AZA-HBD = 3.0 ± 0.40 ; 30-NHBD = 1.2 ± 0.75 ; 45-NHBD = 1.3 ± 1.03 ; and 90-NHBD = 1.21 ± 1.06 . The untransformed values corresponded to a 6-fold and 20-fold increase for CsA-HBD and AZA-HBD, respectively. In the NHBD groups, the differences represent a 3.2-, 3.6-, and

3.3-fold increase for the 30-, 45-, and 90-NHBD groups, respectively. At 5 days after experimental transplantation, HIF-1 α was 2.5-fold up-regulated ($P < 0.05$) and VEGF 2.5-fold down-regulated ($P < 0.05$) in both HBD and NHBD groups ($P < 0.05$). No statistical differences were observed among groups for any of the analyzed genes at 5 days after experimental transplantation. 18S rRNA levels remained unaltered in both HBD and NHBD groups.

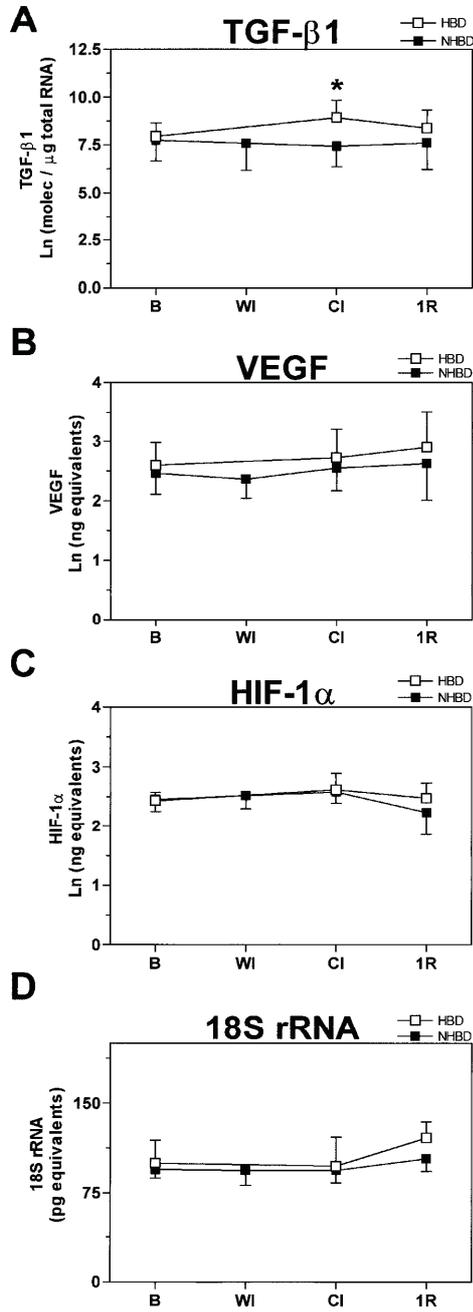


FIGURE 3. Expression profile of TGF-β1 (A), VEGF (B), HIF-1α (C), and 18S rRNA (D) at basal and 5 days after experimental transplantation. Levels at basal (open square) and NHBD (closed square) during surgery. Cortical biopsies were obtained at basal (B), warm ischemia (WI), cold ischemia (CI), and 1 hr after reperfusion (1R). Data are mean±SD. *P<0.05 vs. B.

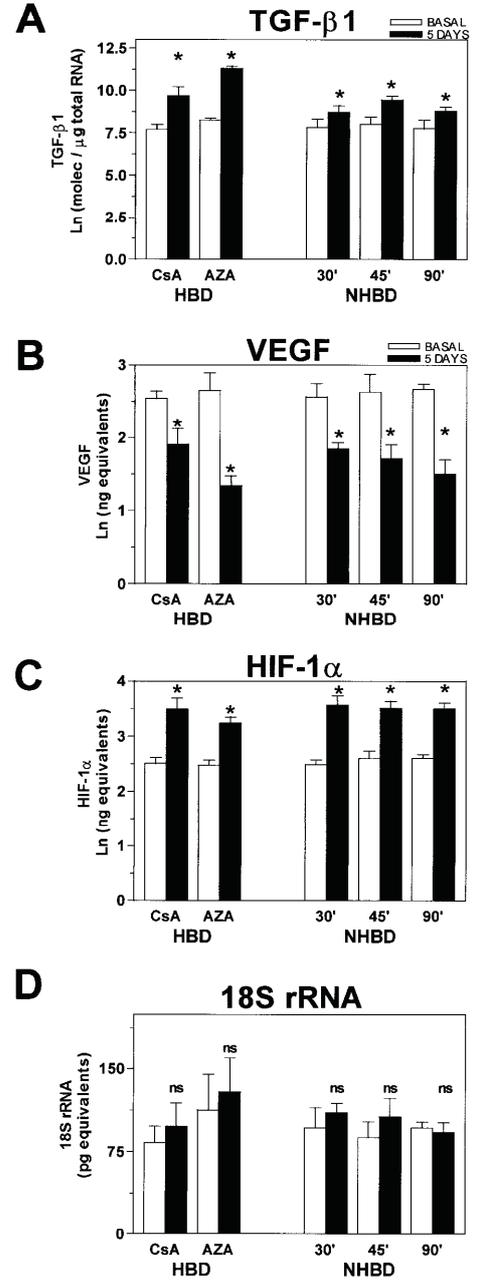


FIGURE 4. Expression of TGF-β1 (A), VEGF (B), HIF-1α (C), and 18S rRNA (D) at 5 days after experimental transplantation. Levels at basal (open bars) and at 5 days after experimental transplantation (solid bars). No differences were observed in gene expression at 5 days after transplantation. All NHBD received CsA. Data are mean±SD. *P<0.05 vs. B.

DISCUSSION

Growth factors play an important role in the repair process after ischemic acute renal failure by stimulating quiescent epithelial cells to dedifferentiate, proliferate, migrate, and redifferentiate into new tubular cells to restore the continuity of the tubular epithelium (17). In this study, we determined the TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α mRNA expression profile during an experimental model of kidney transplantation. Our data shows that TGF- β 1, VEGF, and HIF-1 α expression are not greatly modified in the initial stages of kidney transplantation except for a twofold increment in TGF- β 1 mRNA after cold ischemia in HBD. Moreover, VEGF was down-regulated and HIF-1 α was up-regulated in the days after I/R, and this effect was independent of immunosuppressive treatment. We also confirm the up-regulation of TGF- β 1 expression in the few days after the ischemic insult and report the negative effect of CsA on TGF- β 1 expression. These data support the hypothesis that immunosuppressive treatment may negatively influence the regeneration of the tubular epithelia after I/R by modulating growth-factor expression.

In the HBD group, we observed a twofold up-regulation of TGF- β 1 mRNA 6 hr after cold ischemia. This result is in agreement with a recent study (18) reporting that TGF- β 1 expression in rat-cultured mesangial cells was up-regulated by twofold as early as 2 hr after exposure to hypoxia. In contrast, the HBD time course of TGF- β 1 expression was not observed in NHBD, in which TGF- β 1 mRNA was unaltered. No changes in TGF- β 1 mRNA expression were observed after 30, 45, or 90 min of warm ischemia or 1 hr after reperfusion. Increased TGF- β 1 mRNA expression after an initial cold-ischemic period has previously been described in nephrectomized Lewis rats. In the remnant kidney, macrophage and leukocyte infiltrate were observed at week 40 after cold ischemia and were accompanied by elevated expression of TGF- β 1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α . The expression of these factors was consistently inhibited by initial administration of a soluble form of P-selectin glycoprotein-1, indicating that the long-term function of renal allograft is closely related to the initial events occurring during I/R (19). These observations indicate that warm ischemia could impair the up-regulation of TGF- β 1 mRNA expression by renal epithelial cells after ischemic insult, thus delaying the recovery of tubular epithelial cells. In agreement with previous reports, our results also show that VEGF (5,6) and HIF-1 α mRNA (20) are not increased in renal tissue after I/R or hypoxia. It has been proposed that preexisting VEGF secreted by tubular-epithelial cells preserves the integrity of the adjacent endothelium and consequently the supply of nutrients to the injured tubules (6).

Five days after renal transplantation, all groups showed an increase in both TGF- β 1 and HIF-1 α mRNA and a decrease in VEGF expression. Again, TGF- β 1 expression was more pronounced in the HBD groups (showing a 6- and 20-fold increase in the CsA-HBD and AZA-HBD groups, respectively) than in the NHBD groups in which TGF- β 1 was increased by approximately threefold only. In the latter group, TGF- β 1 expression was not related to the duration of warm ischemia. Basile et al. (7) described the up-regulation of TGF- β 1 expression in a rat model of bilateral renal-artery clamping as early as 12 hr after warm ischemia. TGF- β 1

levels remained elevated for 14 days and its expression returned to normal by day 28. In this model, TGF- β 1 expression correlated with the structural regeneration of renal-proximal epithelia but was not associated with the restoration of renal function. The same group later hypothesized that TGF- β 1 may promote the synthesis of new extracellular matrix where the newly formed tubular cells adhere, migrate, and differentiate (10). If TGF- β 1 participates in renal remodeling after acute renal failure, our results may indicate that even a short warm-ischemia time of 30 min would impair TGF- β 1 mRNA expression, leading to delayed restoration of renal-tubular epithelia.

CsA is known to be a potent inducer of TGF- β 1 expression in both in vitro (21) and in vivo models (22). The AZA-treated group was included in our experimental model to separate the effect of ischemia from that of CsA on TGF- β 1 expression. Surprisingly, the highest TGF- β 1 levels were observed in the AZA-treated group. These results may be explained not only by the detrimental effect of CsA on renal function but also by the direct cellular toxicity of CsA. Apart from its renal hemodynamic effects inducing arteriolar and mesangial vasoconstriction (23), CsA has a negative effect on adenosine 5'-triphosphate metabolism in the mitochondria (24). In addition, CsA promotes cell-cycle arrest and cell death in LLC-PK1 proximal tubule-epithelial cells in culture by increasing p53 expression (25). Conversely, in a test designed to identify genotoxic carcinogens, AZA was unable to increase p53 in NCTC 929 mouse fibroblasts in vitro (26). Altogether, the lower expression of TGF- β 1 mRNA observed in CsA-treated animals may be explained by the cellular renal toxicity promoted by CsA in the CsA-HBD group, because both HBD groups underwent the same cold-ischemia time.

In all groups HIF-1 α mRNA was increased by approximately twofold independently of ischemia time or immunosuppressive treatment. This induction was not caused by CsA-induced arteriolar vasoconstriction because animals treated with AZA, which has no hemodynamic effect, showed similar HIF-1 α expression. The most important HIF-1 regulation is the oxygen-dependent proteolysis of its α subunit (4); consequently the increase in HIF-1 α mRNA may not reflect the actual HIF1-protein level. Other stimuli such as growth factors (epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor) or hormonal stimuli (insulin, thrombin, angiotensin II) have been recently reported (27,28) to stimulate transcription of the HIF-1 α gene under nonhypoxic conditions in vascular smooth-muscle cells. It will be of interest to determine the HIF-1 protein-expression level and the role of growth factors or hormone-induced-HIF1 expression during the recovery and repair stages after I/R.

Although several known stimuli of VEGF transcription were concomitantly present, such as CsA treatment or the up-regulation of HIF-1 α and TGF- β 1, VEGF mRNA was twofold down-regulated in both HBD and NHBD animals. Several explanations could account for this result. An overproduction of NO by inducible NO synthase during I/R has been related to the deleterious injury of I/R by the generation of peroxynitrite (9) and an augmented production of carbon monoxide by hemeoxygenase-1 has been related to the cytoprotective functions of this protein during I/R (8). It has been recently reported that NO and carbon monoxide can inhibit the hypoxic induction of VEGF at the transcriptional level by inhibiting HIF-1 DNA-binding activity (29) and by promoting

HIF-1 α protein destabilization (30). Moreover, during transplantation all animals received two doses (250 mg) of methylprednisolone, and it is well known that steroids inhibit VEGF expression. The induction of VEGF gene transcription by hypoxia, platelet-derived growth factor, or prostaglandin E₂ is inhibited by prednisolone or dexamethasone for in vitro models (31,32). In an experimental model of mesangial proliferative glomerulonephritis, dexamethasone decreased the synthesis of VEGF with no effect on TGF- β 1 expression (33).

CONCLUSION

TGF- β 1 could have a dual action in the immediate post-transplantation period. The initial up-regulation observed just after cold ischemia could have a positive action on tubular-cell regeneration, whereas delayed TGF- β 1 synthesis could contribute to the development of chronic allograft nephropathy. Warm ischemia has a detrimental effect on TGF- β 1 expression during the early phases of renal transplantation and has no effect on VEGF or HIF-1 α mRNA. Finally, TGF- β 1 expression was lower in animals treated with CsA than in those treated with AZA, a finding that was probably related to CsA-cellular toxicity. The down-regulation of VEGF mRNA observed in both HBD and NHBD could have a negative effect on renal regeneration after transplantation by affecting endothelial and tubular survival. This study helps to explain the more frequent and prolonged delayed graft function observed after non-heart-beating renal transplantation in humans, although the long-term results are similar to those in beating donors.

REFERENCES

- Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, et al. Hypothesis: Is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int* 1999; 55: 2157.
- Halloran PF, Homik J, Goes N, et al. The "injury response": A concept linking non-specific injury, acute rejection, and long-term transplant outcome. *Transplant Proc* 1994; 29: 78.
- Dragun D, Hoff U, Park JK, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int* 2000; 58: 2166.
- Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151.
- Kanellis J, Mudge SJ, Fraser S, et al. Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2000; 57: 2445.
- Kanellis J, Paizis K, Cox AJ, et al. Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidney Int* 2002; 61: 1696.
- Basile DP, Rovak JM, Martin DR, et al. Increased TGF- β expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1996; 39: F500.
- Katori M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 905.
- Walker LM, Walker PD, Imam SZ, et al. Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: Studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 417.
- Basile DP, Martin DR, Hammerman MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: Potential role for TGF- β in repair. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1998; 275: F894.
- Mogyesi J, Andrade L, Vieira JM, et al. Positive effect of the induction of p21^{WAF/CIP1} on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2001; 60: 2164.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286.
- Ashcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes Infect* 1999; 1: 1255.
- Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney diseases. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1994; 35: F829.
- Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, et al. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 38527.
- Siebert PD, Larrick JW. PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 1993; 14: 244-249.
- Schena FP. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int* 1998; 66: S11.
- Sahai A, Mei C, Schrier RW, et al. Mechanisms of chronic hypoxia-induced renal cell growth. *Kidney Int* 1999; 56: 1277.
- Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, et al. Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 1997; 64: 1520.
- Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and 2- α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1721.
- Khanna A, Li B, Stenzel KH, et al. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation* 1994; 57: 577.
- Khanna A, Kapur S, Sharma V, et al. In vivo hyperexpression of transforming growth factor β 1 in mice: Stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997; 63: 1037.
- English J, Evan A, Hoghton DC, et al. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat: Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 1987; 44: 135.
- Henke W, Nickel E, Jung K. Cyclosporine A inhibits ATP net uptake of rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1021.
- Lally C, Healy E, Ryan MP. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int* 1999; 56: 1254.
- Yang J, Duerksen-Hughes P. A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1117.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 26765.
- Pagé EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 2002; 277: 48403.
- Liu Y, Christou H, Morita T, et al. Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* 1998; 273: 15257.
- Huang LE, Willmore WG, Gu J, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1999; 274: 9038.
- Nauck M, Karakiulakis G, Perruchoud AP, et al. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1998; 341: 309.
- Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur J Pharmacol* 2001; 411: 231.
- Ha IS, Um EY, Jung HR, et al. Glucocorticoid diminishes vascular endothelial growth factor and exacerbates proteinuria in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 1001.

Artículo 2**Thrombospondin-1 mRNA expression in experimental kidney transplantation with heart- and non-heart beating donors****Resumen**

Antecedentes: El síndrome de isquemia-reperfusión es uno de los factores que pueden comprometer la función del injerto renal en el inmediato postrasplante, siendo más frecuente en las donaciones a corazón parado. Describimos anteriormente que la citoquina transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) presenta una mayor expresión de mRNA en trasplantes experimentales con donantes a corazón latiente (heart beating donors, HBD) que en donantes a corazón parado (non-HBD, NHBD). Este aumento se acompañó de una mayor expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) y de una disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en ambos grupos. Con la finalidad de profundizar en estos resultados, determinamos la expresión en esas mismas biopsias corticales del principal activador de TGF- β 1 *in vivo* como es la trombospondina-1 (TSP-1), de los citoprotectores hemoxigenasa-1 (HO-1) y óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial (NOS3) y de la isoforma inducible NOS2.

Material y Métodos: Se analizaron muestras de un total de 36 trasplantes alogénicos en cerdo divididos en HBD (n=9) y NHBD (n=27). Se recogieron biopsias en basal (B), tras isquemia caliente (IC), tras 6 horas de isquemia fría (IF) y a los 5 días postrasplante (5D). La expresión de los mRNA para NOS2, NOS3, HO-1 y TSP-1 se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real.

Resultados: Durante las fases quirúrgicas de trasplante experimental no se observaron cambios de expresión de NOS2, NOS3 o HO-1. En 5D se observó un aumento muy moderado de NOS2 y HO-1 en los animales HBD, mientras que aumentó específicamente la expresión de TSP-1 en el grupo NHBD.

Conclusiones: El aumento en la expresión de TSP-1 en el grupo NHBD coincide con una menor expresión de TGF- β 1 en ese grupo, siendo seguramente un mecanismo de respuesta compensatoria de activación de TGF- β 1.

Thrombospondin-1 mRNA expression in experimental kidney transplantation with heart-beating and non-heart-beating donors

Sergio Lario¹, Mónica Bescós¹, Begoña Campos², Cristina Mur¹, Pilar Luque³, Ricardo Álvarez³, Josep M. Campistol¹

¹ Renal Transplant Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona - Spain

² Biostatistics Unit of the Public Health Department, University of Barcelona, Barcelona - Spain

³ Urology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona - Spain

ABSTRACT

Background: Ischemia-reperfusion (IR) is a risk factor for delayed graft function, a clinical syndrome more frequently observed in non-heart-beating donors (NHBDs). Previous studies have reported that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene expression increase in the first few days after kidney transplant and that this increase in TGF- β 1 expression is lower in NHBD animals. The purpose of this study was to extend the gene profile analysis by characterizing TGF- β 1 activator thrombospondin-1 (TSP-1) and genes related to HIF-1 α such as heme oxygenase-1 (HO-1), nitric oxide synthase-2 (NOS-2) and NOS-3.

Methods: The experimental pig model of kidney transplantation comprised heart-beating donors (HBDs, n=9) and NHBDs (n=22). Cortical biopsies were collected after anesthetic induction (baseline), after warm ischemia (WI), after cold ischemia (CI), after 1 hour of reperfusion (1R) and 5 days (5D) after transplant. TSP-1, HO-1, NOS-2 and NOS-3 mRNA expression was determined by real-time PCR.

Results: No change in expression of any of the genes analyzed was found during the transplant procedure (WI, CI, 1R) in HBD and NHBD cortical samples. TSP-1 mRNA was significantly increased at 5D in NHBD animals but unchanged in the HBD group. HO-1 was up-regulated in HBD ($p<0.05$) and NOS-2 mRNA was significantly increased in both groups ($p<0.05$). No difference in NOS-3 expression was observed at 5D.

Conclusions: The increased TSP-1 expression in NHBDs may indicate a compensatory response to the reported diminished TGF- β 1 expression. The augmented NOS-2 and HO-1 expression in HBDs could have a positive effect on the recovery of kidney function.

Key words: Experimental transplantation, Heme oxygenase, Ischemia reperfusion, Nitric oxide synthase, Thrombospondin, Transforming growth factor β

INTRODUCTION

Over the past few years, kidneys from non-heart-beating donors (NHBDs) with short warm ischemia (WI) times have been increasingly used with the objective of extending the donor pool. A report comparing kidney transplants from NHBDs and heart-beating donors (HBDs) has shown that, although the former developed delayed graft function (DGF) more frequently, the overall graft function and survival rates were similar in both groups (1).

In this short period of time the organ is not protected against WI, triggering a plethora of events which may lead to tissue injury upon reperfusion. Renal damage and the subsequent recovery of DGF depend on the duration of WI and on other factors including prolonged cold ischemia (CI), preservation solutions, donor age and cyclosporine (CsA) nephrotoxicity (reviewed in (2)). It is less clear, however, whether the events that take place during ischemia-reperfusion (IR) and subsequent tissue repair in the days following transplant are responsible for progression toward chronic allograft nephropathy (3), the leading cause of graft loss and patient morbidity in kidney transplantation (4).

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator involved in tissue oxygen homeostasis (5). HIF-1 regulates the expression of important genes involved in kidney homeostasis and repair after injury (6). These include the survival factor vascular endothelial growth factor (VEGF), heme oxygenase-1 (HO-1), the inducible form of nitric oxide synthase (NOS-2) and components of the transforming growth factor- β (TGF- β) system. While the overproduction of NO by inducible NOS-2 has been related to free radical and peroxynitrite formation upon kidney reperfusion (7), the beneficial cytoprotective effects of NO generated by endothelial NOS (NOS-3) (8) and the heme degradation products (carbon monoxide and biliverdin) catalyzed by

HO-1 (9) have been widely recognized in organ transplantation.

In this context, a recent experimental study (10) showed increased HIF-1 α and decreased VEGF mRNA expression in both HBDs and NHBDs. This effect was also associated with TGF- β 1 up-regulation. NHBDs showed impaired TGF- β 1 expression, indicating that the severity of the ischemic insult has a negative effect on cell viability and tissue repair. TGF- β isoforms are secreted in latent forms that must be activated. In the kidney, the major TGF- β 1 activator is thrombospondin-1 (TSP-1) (11).

TSP-1 is a glycoprotein involved in wound healing and inflammation (12, 13). Growing evidence indicates that TSP-1 contributes to chronic kidney disease by activating latent TGF- β 1 and by promoting endothelial cell apoptosis. Indeed, in aging and remnant rat kidneys after 5/6 nephrectomy, the sites of TSP-1 expression are highly correlated with the loss of VEGF expression and peritubular capillaries (14). Although the role of TSP-1 in chronic renal disease is well established, its role in kidney transplantation remains to be determined.

Therefore, the aim of the present study was to examine the effect of WI, CI and reperfusion on gene expression dynamics for 2 HIF-1-regulated genes (HO-1 and NOS-2), endothelial NOS-3 and TSP-1, in an experimental model of kidney transplantation with HBDs and NHBDs.

MATERIAL AND METHODS

Kidney transplantation and study design

The surgical technique and study design have been previously described (10) and were performed in accordance with the policy and guidelines of the Ethical Committee for Human and Animal Studies of our institution. Briefly, transplants were performed in large white/Landrace pigs (Isoquimen, Barcelona, Spain). After the anesthetic induction, cardiac arrest was provoked by infusion of KCl. WI was prolonged for 30, 45 or 90 minutes. The kidneys were then flushed in situ with ice-cold Wisconsin solution (DuPont Pharma, Brussels, Belgium) and removed, and CI was extended for 6 hours (4°C). Bilateral nephrectomy was then performed in the recipient and donor renal vein, and the artery was anastomosed to the recipient vessels. The graft was reperfused for 1 hour to assess reperfusion injury (1R). Ureteral reconstruction was performed by ureteroneocystostomy. Methylprednisolone (250 mg)

(Pharmacia, Peapack, NJ, USA) and azathioprine (Aza) (1.5 mg/kg) (Medeva Pharma, Madrid, Spain) were administered during anesthetic induction and a second dose of methylprednisolone (250 mg) was administered before reperfusion. The kidney was removed from the recipients 5 days after transplant (5D).

The study included HBDs (n=10) and NHBDs (n=30). Twenty-four hours after experimental transplant, HBD animals were treated with CsA (20 mg/kg per day) (Novartis, Barcelona, Spain) (CsA-HBD group, n=5) or Aza (1.5 mg/kg per day) (Aza-HBD group, n=5). NHBDs were divided into 3 distinct WI times: 30 minutes of WI (30-NHBD group, n=10), 45 minutes of WI (45-NHBD group, n=10) and 90 minutes of WI (90-NHBD group, n=10). Treatment in the NHBD groups consisted of CsA (20 mg/kg per day). Renal cortical samples were collected (i) during surgery after anesthetic induction (baseline), after 30, 45 or 90 minutes of WI, after the period of CI, at 1R and (ii) at 5D. Samples were snap frozen and stored in liquid nitrogen.

Quantitative determination of gene expression by real-time polymerase chain reaction

Thirty-one out of the 40 cortical samples originally included in the study were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). No more frozen sample was available in 9 of the animals. The remaining 3 samples were not suitable for molecular analysis because of complete cortical necrosis.

Total RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate method. Integrity was assessed by both 28S/28S ratios and agarose gel electrophoresis. Total RNA was transcribed into complementary DNA (cDNA) using random primers and AMV retrotranscriptase (Promega, Madison, WI, USA). To rule out genomic and amplicon contamination, controls were run in parallel.

As no porcine (*Sus scrofa*) TSP-1 mRNA sequences were available in the GeneBank database, the human sequence (GeneBank accession number X14787) was used to design and amplify a 528-bp fragment in 5 independent pig cDNA samples. PCR products were sequenced by automated sequence analysis with an Applied Biosystem sequencer (Abi Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA), and sequence alignment was performed using MegAlign software (DNASTar, Madison, WI, USA) with the ClustalW algorithm. The cDNA sequence of *S. scrofa* had 90% identity to human TSP-1 (data not shown).

Lado et al: *TSP-1* in experimental non heart beating donors

Mastermix for the LightCycler reaction contained FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 1.0 U of uracil N-glycosylase (Roche Applied Science), 0.5 μ M of each primer, 3.0 mM MgCl₂ and the respective amounts of cDNA standard curve (50 to 3.1 ng), unknowns (12.5 ng) and positive (12.5 ng) and negative controls. Annealing and acquisition temperatures for each gene were determined empirically. Relative standard curves were constructed by serial dilutions of a cDNA pool from basal biopsies. Capillaries were placed into the LightCycler rotor, and a

specific run protocol for each gene was performed. Crossing points and the equivalent cDNA concentrations were calculated by LightCycler software, version 3.5. The results are expressed as equivalents of cDNA per capillary (ng/cap). Primer sequences, PCR conditions, standard curves and cDNA inputs for genes analyzed are summarized in Table I. RT-PCR efficiencies were calculated from the slopes given in LightCycler software. All RT-PCR analyzed genes showed high efficiencies and low inter-assay coefficients of variation in the investigated expression range (Tab. I).

TABLE I
PRIMER PAIRS AND PCR CONDITIONS

Gene (accession no.)	Primer sequence		T _a (°C)	Cp [†]	Eff (n=8)	CV _i [‡] (n=8)
TSP-1 (X14787)*	F 5'-GGC GGC CTC CCC TAT GCT ATC ACA R 5'-AGG CGT CTT TCT TGC AGG CTT TGG TC	528 bp	60	23.9±0.25	1.8±0.05	9.0%
HO-1 (X60677)	F 5'-CAG CAT GCC CCA GGA TTT GTC AGA R 5'-CCA GCG GGG CCC ATA CCA GA	283 bp	60	25.8±0.12	1.9±0.02	7.2%
NOS2 (U59390)	F 5'-AGC GGA GCG ATG GGA AGC ACG ACT R 5'-CAC GGC GAC ATT GAT CTC CAC GAC AG	521 bp	60	28.7±0.23	2.2±0.18	8.3%
NOS3 (U59924)	F 5'-GCA CCG GCA TCG CCA GAA AGA AGA R 5'-CCG CCG CCA GGA GGA CAC CAG C	425 bp	63	30.0±0.19	2.0±0.07	7.8%
18S rRNA (AF179868, AF102857)	F 5'-CGT CCC CGC CCC TTG CCT CT R 5'-GCT TTC GCT CTG GTC CGT CTT	271 bp	60	25.8±0.24	1.9±0.07	15.0%

Abbreviations: bp = base pairs; Cp = crossing point; CV_i = inter-assay coefficient of variation; Eff = amplification efficiency; 18S rRNA = 18S ribosomal RNA; F = forward primer; HO-1 = heme oxygenase-1; NOS = nitric oxide synthase; PCR = polymerase chain reaction; R = reverse primer; T_a = annealing temperature; TSP-1 = thrombospondin-1.

* Accession number for the human sequence, see "Material and methods".

[†] Data for Cp and Eff are means±SD.

[‡] % CV represents the combination of RT and PCR.

Statistical analysis

The normality of the distribution of TSP-1, HO-1, NOS-2, NOS-3 and 18S rRNA in baseline samples was examined by Q-Q Normal Plots and was tested with the Shapiro-Wilk statistic. NOS-2, NOS-3 and HO-1 were normalized by applying natural logarithm. The Spearman rho correlation coefficient (r_s) was used to analyze correlations among the 5 genes. mRNA expression during surgery was analyzed by multivariate analysis of variance (MANOVA). Gene expression at 5D was analyzed by subtracting the corresponding 5D transformed data from the corresponding transformed baseline values and was compared by the paired-samples *t*-test. Statistical analysis was performed using SPSS 10.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$. The results are expressed as means \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Correlations among genes

A highly significant correlation was observed between basal values of the following pairs of genes: NOS-2 and NOS-3 ($r_s = 0.8045$; $p < 0.0001$), NOS-2 and HO-1 ($r_s = 0.7988$; $p < 0.0001$), NOS-3 and HO-1 ($r_s = 0.7166$; $p < 0.0001$), NOS-3 and TSP-1 ($r_s = 0.6414$; $p < 0.0001$) and NOS-2 and TSP-1 ($r_s = 0.4572$; $p < 0.01$). Significant correlations only for NOS-2 and NOS-3 ($r_s = 0.4132$; $p < 0.05$) and NOS-3 and HO-1 ($r_s = 0.5555$; $p < 0.001$) were preserved in 5D samples (Fig. 1). The genes studied did not correlate with the housekeeping gene 18s rRNA.

Gene expression during surgery

No changes in gene expression were observed for NOS-2, NOS-3, HO-1 mRNA or 18S rRNA during the surgical process (WI, CI, 1R) in either HBD or NHBD groups (Fig. 2). Values were pooled for graphical representation because no differences were found between Aza and CsA HBD groups or among 30-, 45- and 90-minute NHBD groups.

Gene expression at 5D

HO-1 and NOS-2 were up-regulated in HBD (HO-1 baseline: 2.9 ± 0.30 vs. 5D: 3.6 ± 0.37 ng/cap, $n=9$,

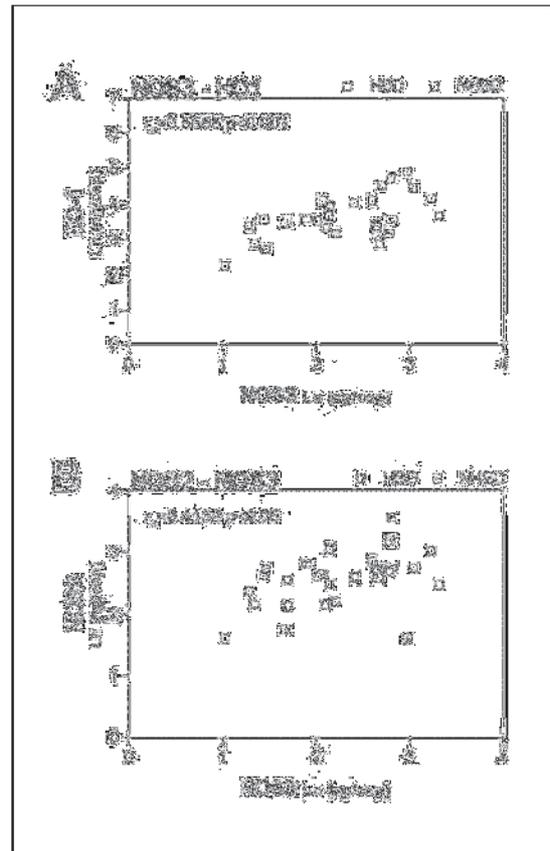


Fig. 1 - Correlation of gene expression in samples collected on day 5 after experimental transplant. A) Correlation between NOS-3 and HO-1. B) Correlation between NOS isoforms NOS-3 and NOS-2; ng/cap = equivalents of cDNA per capillary.

$p < 0.05$; NOS-2 baseline: 2.1 ± 0.31 vs. 5D: 2.6 ± 0.30 ng/cap, $n=9$, $p < 0.05$) whereas no changes were observed in NHBD (HO-1 baseline: 3.5 ± 0.89 vs. 5D: 3.6 ± 0.65 ng/cap, $n=22$, $p=NS$; NOS-2 baseline: 2.4 ± 0.50 vs. 5D: 2.5 ± 0.47 ng/cap, $n=22$, $p=NS$). No statistically significant differences were observed for NOS-3 mRNA expression in either the HBD or the NHBD group. TSP-1 mRNA expression increased in NHBD animals from baseline values: 10.2 ± 3.2 , to 5D: 19.0 ± 6.0 ng/cap ($n=22$, $p < 0.05$; Fig. 3D). This effect was not observed in HBD. Values were also pooled for graphical representation.

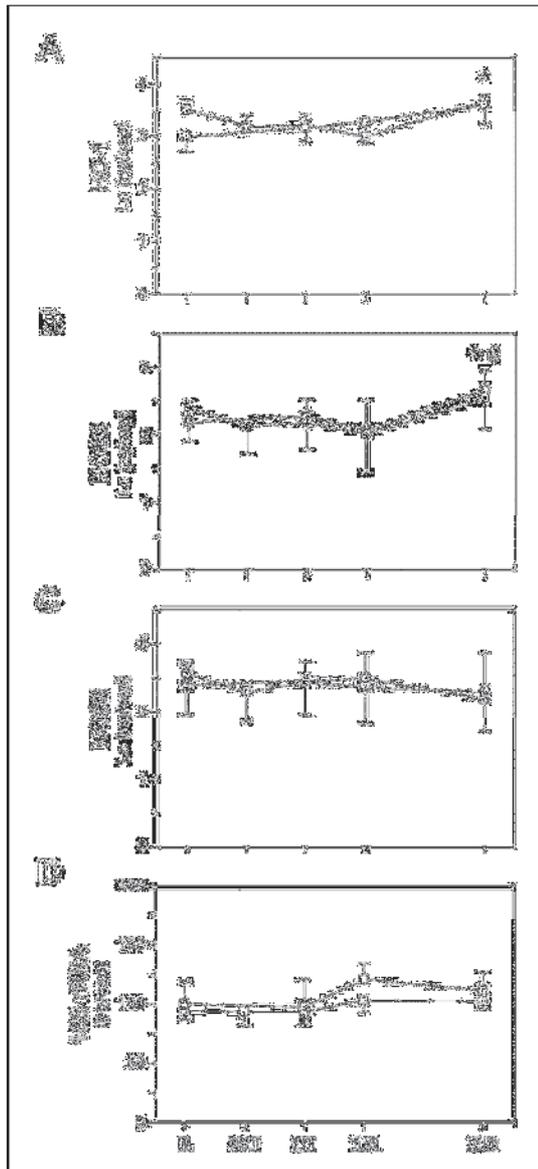


Fig. 2 - Expression profile of HO-1 (A), NOS-2 (B), NOS-3 (C) and 18S rRNA (D) in heart-beating donors (HBDs; n=9) (*) and non-heart-beating donors (NHBDs; n=22) (*). Cortical samples were obtained at baseline (B), after warm ischemia (WI), after 6 hours of cold ischemia (CI), after 1 hour of reperfusion (1R) and 5 days after transplant (5D). The results are expressed as means \pm SD; ng/cap = equivalents of cDNA per capillary; * p <0.05, baseline-HBD vs. 5D-HBD; # p <0.05, baseline-NHBD vs. 5D-NHBD.

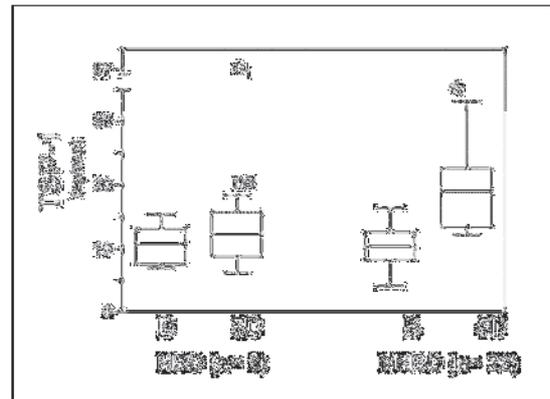


Fig. 3 - TSP-1 mRNA expression at baseline (B) and 5 days after transplant (5D) in heart-beating donors (HBD) and non-heart-beating donors (NHBD). The results are expressed as means \pm SD; ng/cap = equivalents of cDNA per capillary; * p <0.05.

DISCUSSION

In a previous study of TGF- β 1 gene expression we showed that TGF- β 1 was particularly elevated in kidneys from HBDs in the first few days after engraftment, corroborating the hypothesis that this cytokine plays a beneficial role in tissue remodeling and repair after IR injury (10). In the present study, gene expression profiling was extended to TSP-1, the most important TGF- β activator in vivo (15). The main finding was that TSP-1 mRNA was up-regulated in transplanted kidneys from NHBDs, probably to compensate for the impaired TGF- β 1 expression. Furthermore, in the first few days after experimental transplant, mRNA expression of HO-1 was also moderately raised in HBDs, and NOS-2 expression was elevated in both the HBD and NHBD groups.

In this study, no differences were observed in the mRNA levels of HO-1, NOS-2 or NOS-3 across the 4 time points analyzed, regardless of donor type or WI time. Studies of HO-1 mRNA expression in the course of kidney transplant have reported conflicting results. Some investigators have reported that HO-1 expression at the moment of organ retrieval is higher in kidneys from brain dead donors than in those from living donors (16, 17). Others, however, have shown that HO-1 mRNA expression after CI, intraoperative WI and reperfusion is lower in both HB and NHB cadaveric human donors than in their living donor counterparts (18). One explanation for these differ-

ences is that in the present study, CI times were controlled and limited to 6 hours, whereas Lemos et al (18) reported CI times up to 32 hours in cadaveric donors, a prolonged period of time during which HO-1 mRNA steady-state levels could be compromised. In this sense, long cold storage time has been recognized to be a risk factor for the development of DGF (2). Indeed, during cold preservation, free radicals are generated, apoptotic pathways are activated and gene expression is altered (19).

Transcript levels of NOS isoforms in the present animal model were unchanged after WI, CI or reperfusion. Recently, in a porcine model of kidney preservation with NHBDs, the addition of the NO donor S-nitrosoglutathione and the NOS-2 inhibitor L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL) to a kidney preservation solution improved kidney function and recovery (20). In humans, NOS isoforms are down-regulated in tubulointerstitial areas from cadaveric kidneys collected after CI (21), particularly in patients who subsequently developed acute renal failure. Some of the differences in NOS expression between our model and humans could be attributed to species differences or tissue heterogeneity.

In the present study, TSP-1 was specifically up-regulated in the NHBD group. In a 2 year longitudinal study Zhao et al (22) described a transient elevation of TSP-1 within the first few days after cardiac transplant. Only those patients without normalized TSP-1 expression developed chronic allograft vasculopathy. Several reports describe the beneficial role of the TGF- β system in kidney regeneration and repair (23-25), and an impaired TGF- β mRNA expression in CsA-treated NHBD kidneys has also been reported in the first few days after engraftment (10). The results of the present study may point toward a compensatory mechanism triggered by low TGF- β 1 expression, since TSP-1 expression was higher in the NHBD group. Sustained or increased expression of TSP-1 has been associated with acute inflammatory disease (26, 27), kidney senescence (14) and chronic renal disease (28, 29). In chronic allograft nephropathy, a progressive increase in TGF- β 1, TSP-1 and fibronectin within the first months of engraftment has been documented (30). Thus, TSP-1 has been associated with renal fibrogenesis because of its antiangiogenic and antiproliferative properties, its modulation of cell-matrix interactions, and TGF- β activation. The beneficial or detrimental effects of TSP-1 expression on kidney repair in the first few days after transplant remains to be elucidated in experimental longitudinal studies.

HO-1 and NOS isoform mRNA levels at 5D were also assessed. HO-1 was significantly elevated in HBDs, representing an inadequate response to injury in NHBDs. All groups showed NOS-2 up-regulation, whereas NOS-3 mRNA expression was unchanged. Although the deleterious effect of NOS-2 activation and the protective role of NOS-3 during IR has been reported (31, 32), recent data indicate that NOS-2 may be implicated in kidney protection after ischemic preconditioning (33).

In conclusion, this report documents the up-regulation of TSP-1 mRNA in NHBDs. Its beneficial - tissue repair by TGF- β activation - or detrimental - antiangiogenic - effects remain to be determined in time course studies with TSP-1 stimulation or inhibition. Overall, TSP-1 and NOS-2 up-regulation accompanied by decreased levels of HO-1 expression observed in NHBDs may indicate an imbalance in gene expression in the immediate post-transplant period, which might help to explain the higher frequency of DGF in these donors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially financed by grants from Red de Terapia de Trasplante, Cooperativa 442005-BF0005, and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 03.0357), Spain.

Conflict of interest statement: None declared.

Address for correspondence:
Josep M. Campistol, MD, PhD
Renal Transplant Unit
Hospital Clinic
Villarroel 170
08036 Barcelona, Spain
jmcampis@clinic.ub.es

REFERENCES

- Sanchez-Fructuoso AI, de Miguel MM, Prats D, Barrientos A. Non-heart-beating donors: Experience from the Hospital Clinico of Madrid. *J Nephrol* 2003; 16: 387-92.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364: 1814-27.
- Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 2004; 66: 523-7.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
- Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-62.
- Maxwell P. HIF-1: An oxygen response system with special relevance to the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2712-22.
- Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Ali SF, Mayeux PR. Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N(6)-(1-Iminoethyl)lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 417-22.
- Joles JA, Vos IH, Grone HJ, Rabelink TJ. Inducible nitric oxide synthase in renal transplantation. *Kidney Int* 2002; 61: 872-5.
- Katori M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 905-12.
- Lario S, Mendes D, Bescos M, Inigo P, Campos B, Alvarez R, Alcaraz A, Rivera-Fillat F, Campistol JM. Expression of transforming growth factor-beta1 and hypoxia-inducible factor-1alpha in an experimental model of kidney transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1647-54.
- Daniel C, Wiede J, Krutzsch HC, Ribeiro SM, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE, Hugo C. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat *in vivo*. *Kidney Int* 2004; 65: 459-68.
- DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, Koch AE, Pyle JM, Polverini PJ. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am J Pathol* 1996; 148: 1851-60.
- Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol* 2002; 161: 831-9.
- Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 806-16.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Bolvin GR, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 *in vivo*. *Cell* 1998; 93: 1159-70.
- Nijpoer WN, Schuuris TA, van der Hoeven JA, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HG, Hofker S, Homan van der Heide JJ, van Son WJ, Ploeg RJ. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004; 78: 978-86.
- Schuurs TA, Gerbens F, van der Hoeven JA, Ottens PJ, Kooi KA, Leuvenink HG, Hofstra RM, Ploeg RJ. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: Insights in the processes of brain death. *Am J Transplant* 2004; 4: 1972-81.
- Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, van den ES, Mol WM, Weimar W, Baan CC. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3278-87.
- Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F181-7.
- Gage FA, Vodovotz Y. Normalization of nitric oxide flux improves physiological parameters of porcine kidneys maintained on pulsatile perfusion. *Nitric Oxide* 2003; 9: 141-7.
- Mitterbauer C, Schwarz C, Hauser P, Steininger R, Regele HM, Rosenkranz A, Oberbauer R. Impaired tubulointerstitial expression of endothelin-1 and nitric oxide isoforms in donor kidney biopsies with postischemic acute renal failure. *Transplantation* 2003; 76: 715-20.
- Zhao XM, Hu Y, Miller GG, Mitchell RN, Libby P. Association of thrombospondin-1 and cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *Circulation* 2001; 103: 525-31.
- Basile DP, Rovak JM, Martin DR, Hammerman MR. Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol* 1996; 270: F500-9.
- Basile DP, Martin DR, Hammerman MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: Potential role for TGF-beta in repair. *Am J Physiol* 1998; 275: F894-903.
- Spurgeon KR, Donohoe DL, Basile DP. Transforming growth factor-beta in acute renal failure: Receptor expression, effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F568-77.
- Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ. Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int* 1998; 53: 302-11.
- Hochegger K, Knight S, Hugo C, Mayer G, Lawler J, Mayadas TN, Rosenkranz AR. Role of thrombospondin-1 in

- the autologous phase of an accelerated model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 96: e31-8.
28. Hugo C, Kang DH, Johnson RJ. Sustained expression of thrombospondin-1 is associated with the development of glomerular and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney model. *Nephron* 2002; 90: 460-70.
29. Daniel C, Takabatake Y, Mizui M, Isaka Y, Kawashi H, Rupprecht H, Imai E, Hugo C. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-1 inhibit activation of *tgf-beta* in fibrotic renal disease in the rat *in vivo*. *Am J Pathol* 2003; 163: 1185-92.
30. Baboolal K, Jones GA, Janezic A, Griffiths DR, Jurewicz WA. Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 2002; 61: 686-96.
31. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002; 61: 855-61.
32. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
33. Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003; 278: 27256-66.

Received: December 12, 2006

Revised: February 12, 2007

Accepted: March 07, 2007

© Società Italiana di Nefrologia

► **Discusión**

La carencia continuada de órganos para trasplante impulsa a la investigación de recursos alternativos, como la propuesta de utilizar órganos para trasplante a partir de donantes con parada cardíaca. Se estima que el número de donantes potenciales podría aumentar en un 20% (Kootstra et al., 1995). Los trabajos publicados coinciden en que los riñones obtenidos de esta forma son útiles para trasplante y que, a pesar de presentar una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo es similar a los obtenidos de corazón latiente (Sanchez-Fructuoso et al., 2003; Sanchez-Fructuoso et al., 2006).

Un órgano trasplantado experimenta invariablemente lesión por isquemia-reperfusión. Si el riñón se obtiene de un donante a corazón parado el daño al órgano será mayor, ya que el tiempo de isquemia caliente se prolonga por más tiempo.

Tras la lesión por isquemia, ya sea por trasplante renal o por estenosis de la arteria renal, se puede producir una situación de NTA que afectará en mayor o menor grado a la futura función renal. A nivel histológico, el daño irreversible ocasionado por isquemia, origina una necrosis cortical (proporción de glomérulos inviábiles) que tendrá como consecuencia que el órgano no sea viable para el trasplante.

Los factores de crecimiento intervienen de manera fundamental en la reparación tisular después de la lesión por isquemia-reperfusión, estimulando a las células quiescentes epiteliales a desdiferenciarse, proliferar, migrar y rediferenciarse a nuevas células tubulares con tal de restablecer la continuidad del epitelio tubular y restaurar, de esta manera, la función renal. Asimismo, en este contexto, otros factores como los inducibles por hipoxia intervienen de manera significativa.

De entre los diferentes mecanismos de lesión y reparación, se optó por explorar por un lado la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), conjuntamente con una serie de factores de supervivencia celular regulados parcialmente por él (VEGF, HO-1 y NOS). Por otro lado, TGF- β 1, como uno de los principales mediadores de regeneración tubular y TSP-1, una proteína multifuncional que es la principal activadora de TGF- β 1 en el riñón. El estudio pretende ayudar a entender las alteraciones moleculares que se producen durante la lesión por isquemia-reperfusión, para su posible posterior aplicación en la prevención del daño tisular.

Se optó por un modelo experimental con tal de obtener un control satisfactorio de la mayoría de las variables que intervienen en el proceso. Se seleccionó un animal de experimentación grande, como es el cerdo, en un modelo de trasplante renal que guarda la máxima similitud con el humano. Se ha reproducido el síndrome de isquemia-reperfusión, realizando un trasplante renal heterotópico, con donante a corazón parado y con diferentes tiempos de isquemia caliente. Todo ello difiere de la mayoría de los trabajos publicados, en los que el modelo experimental se realiza en roedores por clampaje del pedículo renal. Se ha intentado, por tanto, reproducir la mayoría de procesos del trasplante renal en humanos, incluyendo la inmunosupresión. La fiabilidad de los datos obtenidos en este estudio está comprobada, ya que se transcribió un modelo en el que el escenario del trasplante renal se reprodujo íntegramente (Luque P, 1999).

A continuación, la discusión se desglosa en dos etapas, la primera incluye los resultados obtenidos durante la cirugía del trasplante (isquemias caliente y fría y perfusión). La segunda engloba los resultados a los cinco días postrasplante, con el efecto del tratamiento inmunosupresor.

Así, durante el trasplante, observamos en el grupo HBD un aumento en la expresión del mRNA para TGF- β 1 a las seis horas tras la isquemia fría. Este resultado se relaciona con un estudio en el que hipoxia duplicó la expresión de TGF- β 1 en células mesangiales de rata en cultivo (Sahai et al., 1999). A diferencia del grupo HBD, los NHBD no presentaron cambios en la expresión de TGF- β 1 durante el trasplante, esto es: ni después de isquemia caliente, ni la fría, ni tras la perfusión. En un modelo experimental de nefrectomía unilateral en ratas Lewis, se ha observado un aumento en los infiltrados leucocitarios y de macrófagos después de 40 semanas tras la isquemia fría, que se acompañó de niveles elevados de TGF- β 1, IL-6 y TNF- α . La expresión de estos factores se pudo inhibir con la administración de la forma soluble de la P-selectina, indicando que la función a largo plazo del injerto renal se encuentra estrechamente relacionada con los eventos que ocurren durante el período de isquemia-reperfusión (Takada et al., 1997). En conjunto, estas observaciones indicarían que la isquemia caliente en nuestro modelo experimental podría estar comprometiendo la expresión de TGF- β 1 en las células epiteliales renales retrasando su regeneración.

En concordancia con publicaciones anteriores, nuestros resultados muestran que el mRNA de VEGF (Kanellis et al., 2000; Kanellis et al., 2002) y HIF-1 α (Rosenberger et al., 2002) no está alterados tras la hipoxia o la isquemia-reperfusión. En este sentido, se ha propuesto que VEGF presintetizado y secretado por las células epiteliales tubulares estaría preservando la integridad del epitelio adyacente, manteniendo de esta manera su aporte de nutrientes (Kang et al., 2002).

En nuestro modelo experimental de trasplante en cerdo, no hemos hallado cambios significativos de expresión para HO-1, NOS2 o NOS3 en las biopsias recogidas tras la isquemia caliente o fría o tras la perfusión ni en los grupos HBD ni NHBD. Los estudios que han analizado HO-1 en el trasplante renal han dado lugar a resultados dispares. Algunos investigadores describen valores más elevados de HO-1 o de Hsp70 en riñones de donantes en estado de muerte cerebral, comparado con órganos de donante vivo, tanto en humanos (Nijboer et al., 2004) como en modelos experimentales (Schuurs et al., 2004). Otros, sin embargo, describen niveles de mRNA para HO-1 menores (tras la isquemia fría, tras la isquemia caliente intraquirúrgica en el receptor y tras la perfusión) en injertos de donantes a corazón latiente con muerte cerebral y en injertos donantes a corazón parado, cuando se comparan con trasplantes de donante vivo (Lemos et al., 2003). Los estudios no son por completo comparables, puesto que las biopsias se recogieron a distintos tiempos durante los procedimientos quirúrgicos. Nuestro modelo experimental permitió controlar los tiempos de isquemia fría a seis horas, mientras Lemos y colaboradores reportan tiempos que oscilan entre las dos horas en los donantes vivos a las 14-32 horas en los cadáver. Es este un espacio de tiempo en el que los niveles del mRNA para HO-1 podrían verse comprometidos. Se ha reconocido a los largos periodos de tiempo en preservación fría del órgano como uno de los factores de riesgo para la aparición del retraso en la función del órgano (Perico et al., 2004). Otras consideraciones son las importantes diferencias interespecies que existen en la regulación transcripcional de HO-1. Aunque no se ha estudiado el gen *ho-1* de *Sus scrofa*, existen diferencias en el control de HO-1 en humanos y ratones. Así, por ejemplo la hipoxia y el INF- γ son importantes estímulos de HO-1 células en cultivo de ratón, pero no humanas (Sikorski et al., 2004).

La expresión de las isoformas de la NOS se mantuvo estable a lo largo del trasplante en ambos grupos de estudio. En un modelo porcino de estudio de líquidos de preservación con donantes a corazón parado, la adición del donador de NO S-nitrosoglutatión y del inhibidor de la NOS2 I-N⁶-(1-iminoetil)-lisina al líquido de preservación indujo una

mejora en las resistencias vasculares (Gage and Vodovotz, 2003). Las resistencias vasculares son un índice de predicción de la recuperación de la función del órgano. De hecho, durante la preservación fría se generan RLO e isoprostanos, se activan vías apoptóticas mitocondriales y se altera la expresión génica (Salahudeen, 2004). En humanos, la expresión de NOS2 y NOS3 se presenta regulada a la baja en el tubulointersticio, pero no en las áreas glomerulares en biopsias de donante cadáver recogidas tras la isquemia fría (Mitterbauer et al., 2003). La expresión de ambas isoformas de la NOS estuvieron especialmente reguladas a la baja en los pacientes que posteriormente desarrollaron fallo renal agudo. Las diferencias con nuestro modelo experimental también podrían atribuirse a diferencias entre especies o a la heterogeneidad del tejido renal, puesto que la regulación a la baja de la NOS únicamente se observó en áreas tubulointersticiales.

A los cinco días postrasplante, todos los grupos mostraron un incremento en la expresión de TGF- β 1 y de HIF-1 α , mientras que el mRNA para VEGF se reguló a la baja. La expresión de TGF- β 1 fue consistentemente más alta en los grupos HBD (seis veces para los animales tratados con CsA y veinte veces para los tratados con Aza), mientras que en los donantes a corazón parado el aumento de expresión fue de tres veces y no correlacionó con los tiempos de isquemia caliente. En un modelo de isquemia-reperfusión por clampaje bilateral de la arteria renal, se ha comprobado que la expresión de TGF- β 1 aumenta tras las 12 horas de perfusión y que este aumento se mantiene hasta el día catorce, normalizándose a las cuatro semanas (Basile et al., 1996). En este modelo, los niveles de TGF- β 1 no correlacionaron con la restauración de la función renal, pero se asociaron a la regeneración estructural del epitelio proximal. Así, se sugirió que TGF- β 1 podría estar promoviendo la síntesis de nueva matriz extracelular, donde las nuevas células tubulares pueden adherirse, migrar y diferenciarse (Basile et al., 1998). En nuestro modelo, si TGF- β 1 estuviera participando en el remodelado renal tras el fallo renal agudo, observaríamos que tiempos cortos de isquemia caliente de treinta minutos afectan a la expresión de TGF- β 1, conduciendo a un potencial retraso en la restauración del epitelio tubular.

Recientemente, y en concordancia, estudios de Docherty y colaboradores (Docherty et al., 2006), en un modelo experimental en rata similar, TGF- β exhibió un perfil temporal de expresión bifásico, con un incremento en su expresión a las 12h tras la perfusión, que vuelve a los niveles basales a los dos días, para reaparecer de nuevo

entre los días 3 y 7. El colágeno IV ($\alpha 1$) adoptó un curso similar. La endogлина —un componente del sistema de receptores para TGF- $\beta 1$ — coincidió con el primer máximo para TGF- $\beta 1$, disminuyendo posteriormente a niveles basales. En experimentos adicionales con ratones deficientes para endogлина, los autores muestran que esta proteína juega un papel relevante en la promoción de procesos inflamatorios en el riñón postisquémico. La endogлина viene regulada por dos de los factores analizados en la presente tesis, el TGF- $\beta 1$ y el HIF (Sanchez-Elsner et al., 2002) y modula las respuestas celulares del primero. Smad3 parece ser el adaptador entre HIF y Sp1 que forman un complejo multiprotéico que controla la expresión de la endogлина, pasando de esta manera de un nivel de expresión constitutivo a inducible. La endogлина es capaz de inhibir la inducción de PAI-1 y fibronectina por TGF- $\beta 1$, y de revertir la inhibición de la proliferación de monocitos *in vitro* (Lastres et al., 1996). El ratón knockout para endogлина no es viable. Los haploinsuficientes se distinguen por presentar menor expresión de NOS3 que los genotipos salvajes y a los dos días tras la isquemia-reperfusión una lesión renal atenuada (medida por creatinina, infiltrado celular e histología) asociada a una menor expresión de VCAM-1, TGF- $\beta 1$ y NOS2. Estos eventos coinciden, espacial y temporalmente, con la infiltración del tejido por macrófagos. Es de remarcar que la endogлина está sobreexpresada en modelos experimentales de fibrosis por reducción de masa renal (Rodríguez-Pena et al., 2001) y en pacientes con enfermedad renal crónica (Roy-Chaudhury et al., 1997). Sería de interés, por tanto, conocer el perfil de expresión de esta proteína en nuestro modelo de trasplante renal, para observar el efecto de las isquemias fría y caliente y la inmunosupresión sobre esta proteína proinflamatoria.

La CsA es un potente inductor de TGF- $\beta 1$ tanto *in vitro* (Khanna et al., 1994) como *in vivo* (Khanna et al., 1997). En nuestro modelo incluimos un grupo de tratamiento con Aza con tal de disociar el efecto de la isquemia del efecto de la CsA sobre los niveles de TGF- $\beta 1$. Sorprendentemente, los valores más altos de TGF- $\beta 1$ los observamos en este grupo de tratamiento. Este hecho se explicaría tanto por el efecto perjudicial de la CsA sobre la función renal, como por su efecto tóxico a nivel celular. En efecto, aparte de sus efectos hemodinámicos renales por su influencia en la vasoconstricción arteriolar y mesangial (English et al., 1987), la CsA presenta un efecto negativo sobre el metabolismo del ATP en la mitocondria (Henke et al., 1992) y promueve la síntesis de p53 en células proximales tubulares, con la consiguiente parada del ciclo celular y muerte celular (Lally et al., 1999). En cambio, en un test *in vitro* diseñado para la detección de genotóxicos, Aza no estimuló la síntesis de p53 en fibroblastos de ratón

(Yang and Duerksen-Hughes, 1998). Así, la expresión disminuida de TGF- β 1 que se observa en los animales tratados con CsA podría explicarse por la toxicidad celular promovida por la CsA y no por el tiempo de isquemia, ya que ambos grupos HBD experimentaron el mismo tiempo de isquemia fría.

Uno de los mayores activadores de TGF- β 1 en el riñón es la TSP-1 (Daniel et al., 2004). Nuestro modelo de trasplante experimental muestra que el mRNA de la TSP-1 está específicamente regulado al alza en el grupo de donantes a corazón parado, y que esta regulación es independiente del tiempo de isquemia caliente. En un estudio longitudinal de dos años de duración, Zhao y colaboradores (Zhao et al., 2001) analizaron la expresión de TSP-1 en el trasplante cardíaco. En los días posteriores al trasplante, observaron un aumento transitorio de TSP-1 en todos los pacientes examinados. No obstante, aquellos injertos que no normalizaron sus niveles de TSP-1 desarrollaron vasculopatía crónica del injerto. Varias publicaciones reportan los efectos beneficiosos del sistema del TGF- β en la regeneración y reparación del tejido renal (Basile et al., 1996; Basile et al., 1998; Basile, 1999; Spurgeon et al., 2005), y, como hemos comentado anteriormente, el tratamiento con CsA de animales trasplantados de donantes a corazón parado muestran disminución en la expresión de TGF- β en los días inmediatos al trasplante. Así, la expresión alterada de TSP-1 podría interpretarse como un mecanismo compensatorio, desencadenado por la baja expresión de TGF- β , puesto que los donantes a corazón parado presentan sobreexpresión de TSP-1. La expresión aumentada o mantenida de TSP-1 se ha relacionado con patología renal aguda, como glomerulonefritis (Hochegger et al., 2004) y crónica, como envejecimiento renal (Kang et al., 2001a) o modelos de nefrectomía 5/6 (Daniel et al., 2004; Hugo et al., 2002). De este modo, la TSP-1 se ha implicado en la fibrogénesis renal por sus propiedades antiangiogénicas, de modulación de la matriz extracelular, de inhibición de la proliferación endotelial y activación de TGF- β . En el momento de la realización del presente estudio era desconocido el perfil de expresión de TSP-1 tanto en el fallo renal agudo, como en la lesión por isquemia-reperfusión o en el procedimiento del trasplante renal. TSP-1 participa de manera fundamental en el proceso de cicatrización (Bornstein, 2001) y de reparación tisular por ser una proteína matricelular como la osteopontina, la SPARC o la TSP-2. Un estudio realizado con microarrays reveló un aumento de TSP-1 a las tres horas tras la reperusión en un modelo de clampaje renal en ratas (Thakar et al., 2005). Los túbulos proximales dañados por la IR fueron los sitios predominantes de su expresión y se acompañó de la colocalización de caspasa-3, un marcador de lesión celular en el riñón (Kunduzova et al., 2003). Los autores

muestran el efecto deletéreo de la expresión de TSP-1. Los ratones deficientes en TSP-1 sometidos a 30 minutos de isquemia mostraron menores niveles de creatinina sérica que los salvajes.

Se está dilucidando el papel de TSP-2 en la patología renal (Daniel et al., 2007). TSP-2 se regula al alza en un modelo de glomerulonefritis antimembrana basal. El ratón deficiente para TSP-2 muestra marcadores de inflamación tras la inducción, como infiltrado de CD4+, CD8+ y macrófagos, índices elevados de deposición de matriz (fibrina, colágenos I y IV, MMP-2) y de proliferación celular. En este modelo no se observa un aumento compensatorio en la expresión de TSP-1, de TGF- β 1 o de Smad 2/3 tal y como se había descrito anteriormente (Lawler et al., 1998). Sería de interés determinar tanto el papel de TSP-2 en el síndrome de isquemia-reperfusión como en el trasplante renal puesto que es un factor antiangiogénico independiente de la activación de TGF- β 1.

Todos los grupos, con independencia del tratamiento inmunosupresor o del tiempo de isquemia caliente, presentaron mayores niveles de HIF-1 α . Esta inducción no fue causada por la vasoconstricción arteriolar mediada por la CsA, ya que los animales a los que se les administró Aza, sin efectos hemodinámicos, mostraron similares medidas de mRNA para HIF-1 α . La regulación más importante de HIF es la proteólisis dependiente de oxígeno de la subunidad α (Wenger, 2002), por lo que el aumento observado podría no reflejar los niveles reales de la proteína. Otros estímulos como factores de crecimiento —EGF, PDGF, FGF— o estímulos hormonales —insulina, trombina, ANGII— estimulan la transcripción de HIF-1 α en condiciones de normoxia en VSMC (Page et al., 2002; Richard et al., 2000).

El uso de inmunohistoquímica de alta sensibilidad ha permitido estudiar el patrón de expresión de HIF-1 α en biopsias renales de pacientes trasplantados (Rosenberger et al., 2007). Una disminuida expresión de HIF-1 α correlacionó con tiempos de isquemia fría prolongados (más de 15 horas) y con la edad del donante (más de 50 años) que se asoció con el retraso de la función del órgano. En los injertos funcionantes, sin embargo, se detectó una elevada expresión del factor. En biopsias de protocolo a las dos semanas, HIF-1 α se halló en todos los pacientes estudiados, seguramente reflejo de hipertrofia, hiperfiltración o toxicidad por el tratamiento con anticalcinerurínicos. A los tres meses, únicamente los pacientes con rechazo agudo —clínico y subclínico —

mostraron positividad para HIF-1 α . Estos datos indican que HIF estaría contrarrestando los efectos negativos de la isquemia-reperfusión y que los injertos con niveles no detectables de HIF habrían alcanzado homeostasis para el oxígeno.

Aunque conocidos estímulos para la transcripción de VEGF —como la CsA, la regulación al alza de HIF o de TGF- β — estaban presentes, su expresión se distinguió por estar regulada a la baja tanto en los injertos de donantes a corazón latiente como parado. Los efectos nocivos del exceso de síntesis de NO por la NOS2 durante los episodios de isquemia-reperfusión se han asociado con la producción de peroxinitrito (Walker et al., 2000), mientras que la producción de CO generada por la HO-1 se ha relacionado con las funciones citoprotectoras de esta proteína tras la perfusión (Katori et al., 2002). Ambos gases, NO y CO, frenan la inducción transcripcional de VEGF disminuyendo la capacidad de unión de HIF al DNA y desestabilizando HIF-1 α a nivel proteico (Huang et al., 1999). Por otra parte, durante el trasplante se administran dos dosis de 250 mg de metil-prednisolona. La función de los corticoesteroides en esta fase es actuar como antiinflamatorio e inmunosupresor por el bloqueo transcripcional de IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α e INF- γ en macrófagos, linfocitos y células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas. Los esteroides son, asimismo, potentes inhibidores de la síntesis de VEGF. Se ha comprobado *in vitro* que la prednisolona y la dexametasona inhiben la síntesis de VEGF estimulada por hipoxia, PDGF o prostaglandina-E2 (Fischer et al., 2001; Nauck et al., 1998), mientras que *in vivo* la dexametasona disminuye la síntesis de VEGF en un modelos de glomerulonefritis proliferativa (Ha et al., 2002). Los esteroides en este modelo no modifican la expresión de TGF- β 1.

Al quinto día postrasplante los niveles de HO-1 se mostraron moderadamente elevados en el grupo de donantes a corazón parado, indicando una respuesta inadecuada a la lesión. Asimismo, se observó un discreto aumento en la regulación de la forma inducible NOS2 en todos los grupos, mientras que no hubo alteraciones de la forma endotelial NOS3. Aunque se le ha atribuido un efecto nocivo a la activación de NOS2 y un efecto beneficioso a la activación de NOS3 durante la isquemia y posterior perfusión (Albrecht et al., 2003; Goligorsky et al., 2002), datos posteriores indicarían a NOS2 como uno de los factores importantes en la protección renal en el proceso del preacondicionamiento isquémico (Park et al., 2003).

El análisis sistemático de los genes que se regulan al alza o a la baja durante la isquemia-reperfusión y durante los días posteriores al trasplante nos indican la gran complejidad que tiene el proceso del trasplante a nivel celular y molecular (Mansfield and Sarwal, 2004). La serie de factores estudiada en el presente estudio —aunque limitadas en número— pueden dispensar nueva información que permita el mejor conocimiento de la lesión por isquemia-reperfusión y recuperación de la función renal en los primeros días postrasplante.

► Conclusiones

A partir de los resultados del presente trabajo de investigación, se extraen las siguientes conclusiones:

- 1. La isquemia caliente en el donante no afecta a la expresión génica de HIF-1 α en el injerto renal.**

Ni a la de los genes parcialmente regulados por este sistema: NOS2, HO-1 o VEGF. Asimismo, la expresión de la forma endotelial NOS3 no se ve alterada.

- 2. Tras la isquemia fría, los donantes a corazón latiente regulan al alza al TGF- β 1 a nivel del injerto renal.**

Este efecto no se observa en los donantes a corazón parado en los que se ve afectada la transcripción de TGF- β 1. El efecto negativo de la isquemia caliente es independiente del tiempo de parada cardiaca, puesto que treinta minutos de isquemia caliente son suficientes para descompensar TGF- β 1.

- 3. La reperfusión en el receptor no induce cambios de expresión génica de TGF- β 1 o HIF-1 α , ni de los genes parcialmente regulados por éstos, HO-1 y VEGF.**

- 4. La expresión de las isoformas de la NOS se mantiene estacionaria a lo largo del trasplante en ambos grupos de donantes.**

- 5. A los cinco días postrasplante, la expresión génica de TGF- β 1 es más elevada en los injertos renales de donantes a corazón latiente respecto a los de donantes a corazón parado.**

La respuesta de TGF- β 1 en los receptores de donantes a corazón parado es menor y no correlaciona con el tiempo de permanencia en parada cardiaca. El tratamiento inmunosupresor con ciclosporina podría estar modificando a la baja la expresión de TGF- β 1.

- 6. El mRNA de TSP-1 está aumentado en los receptores de donantes a corazón parado respecto a los injertos de donantes a corazón latiente a los cinco días postrasplante.**

Los niveles de TSP-1 no correlacionan con el tiempo de permanencia en parada cardiaca.

- 7. Se observa en todos los receptores, un aumento en la expresión génica de HIF-1 α al quinto día postrasplante respecto a sus niveles basales.**

La inducción de HIF-1 α es independiente del tiempo de isquemia caliente y del tratamiento inmunosupresor.

- 8. La transcripción de VEGF está regulada a la baja respecto a sus valores basales, tanto en receptores con injertos de donantes a corazón latiente como parado.**

Los niveles de expresión de VEGF son igualmente independientes del tiempo de isquemia caliente y del tratamiento inmunosupresor.

- 9. Los niveles de HO-1 se muestran elevados en los receptores de injertos de donantes a corazón latiente respecto a los de corazón parado.**

Indicaría una respuesta inadecuada a la lesión en el grupo de receptores de donantes a corazón parado.

- 10. El mRNA para la forma inducible NOS2 aumenta de manera moderada en todos los injertos; mientras que NOS3 no altera su transcripción basal.**

Los niveles de expresión de NOS2 son independientes del tiempo de isquemia caliente y del tratamiento inmunosupresor.

————— **Resumen** —————

De manera global, los resultados de la presente tesis muestran que tiempos cortos de isquemia caliente afectan a la expresión génica de factores implicados en la supervivencia celular, así como de factores en parte responsables de la regeneración tisular. Este estudio ayuda a explicar la mayor frecuencia de retraso de la función del injerto renal que se observa en los pacientes trasplantados con órganos de donantes a corazón parado.

► **Apéndices**

«In theory, there is no difference between theory
and practice. But, in practice, there is. »

—Van De Snepscheut

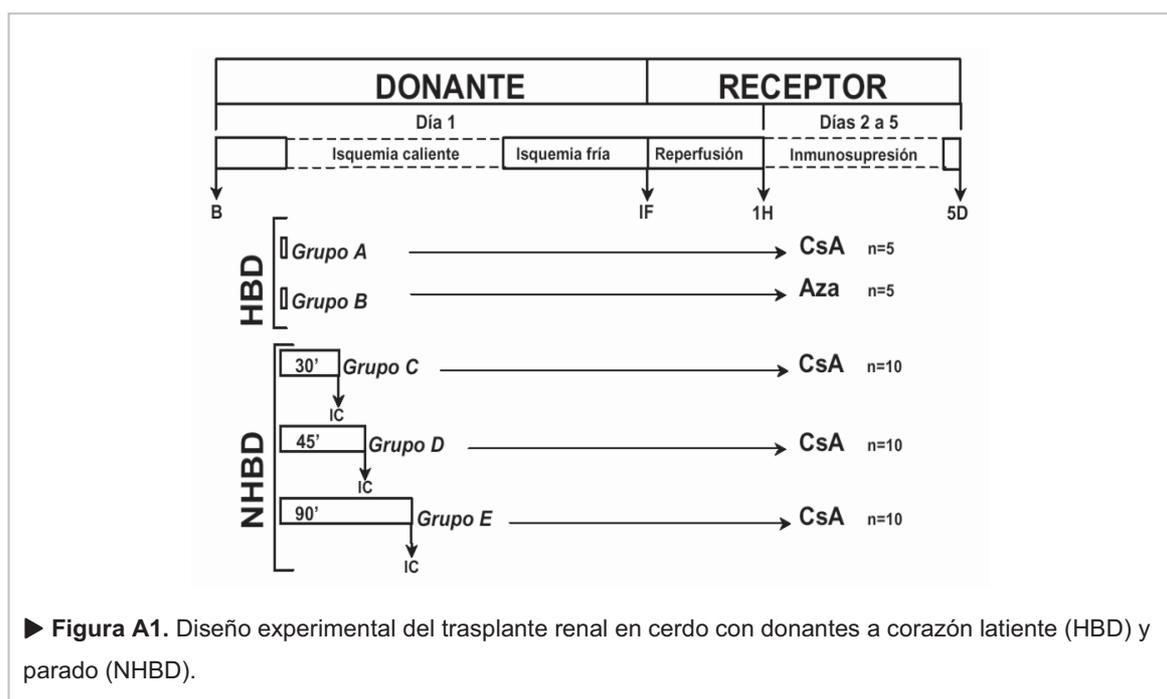
Apéndice I

Diseño del estudio.

La Figura A1 muestra un esquema del diseño experimental. El modelo consta de dos grupos principales:

- i. Donantes a corazón latiente (HBD), n=10.
- ii. Donantes a corazón parado (NHBD), n=30.

Tras el trasplante experimental, el grupo HBD es tratado bien con CsA (20 mg/kg/día, grupo HBD-CsA, n=5) o bien con Aza (1.5 mg/kg/día, grupo HBD-Aza, n=5) con el objetivo de separar el efecto inductor de la CsA sobre la expresión de TGF- β 1 (Khanna et al., 1997). El grupo NHBD se subdivide asimismo en tres grupos en función del tiempo de isquemia caliente designado: 30 minutos (30-NHBD), 45 minutos (45-NHBD) o 90 minutos (90-NHBD). Todos los animales del grupo NHBD reciben CsA (20 mg/kg/día) tras el trasplante.

**Trasplante experimental en cerdo**

El trasplante experimental en cerdo se realizó en el Estabulario de la Facultat de Medicina (UB) por los Especialistas del Servicio de Urología de nuestro centro

siguiendo las normativas del Comité Ético de nuestra Institución. Para el modelo de trasplante experimental se utilizan 40 pares de cerdos Lanrace de 30-40 Kg de peso (Isoquimen, Barcelona).

Tras la administración de 15 mg/kg de tiopental (Abbot), los animales son intubados y anestesiados con isoflurano al 0.7% (Abbot). Se disecan y canulan la aorta y la vena cava inferior tras lo cual se induce la parada cardiaca (solamente en el grupo NHBD) por infusión de 20-30 mEq de KCl. La parada cardiaca determina el tiempo de isquemia caliente, que se prolonga por 30, 45 o 90 minutos en función del grupo. Los riñones son posteriormente perfundidos *in situ* con un litro de solución fría de Wisconsin (DuPont) y extraídos por nefrectomía radical en bloque simultánea seccionando la vena cava inferior y la aorta y ambos uréteres. La isquemia fría se alarga durante 6 horas en una solución estéril de Ringer-lactato (Fresenius) a 4°C. Posteriormente se realiza la nefrectomía bilateral en el receptor. La arteria y la vena renal del donante se anastomosan a los vasos del receptor con suturas Prolene 6-0 (Aragó), se eliminan los clamps vasculares y se deja reperfundir el riñón durante una hora con el objetivo de observar la lesión por reperfusión. Se realiza entonces la reconstrucción ureteral por ureteroneocistomía. Como analgésico postoperatorio se utiliza Miperidina (50-100 mg). El tratamiento inmunosupresor comienza en todos los animales durante la inducción anestésica por la administración de metilprednisolona (250mg, Pharmacia) y Aza (1.5 mg/kg, Medeva Pharma).

Antes de iniciar la reperfusión se administra una segunda dosis de metilprednisolona (250 mg). El tratamiento inmunosupresor continúa 24 horas después por la administración de Aza o CsA.

En la Figura A1 se detallan con una flecha los puntos donde se recogen las biopsias corticales durante el trasplante, éstos son:

- i. **B** Tras la inducción anestésica.
- ii. **IC** Tras 30, 45 ó 90 minutos de isquemia caliente (sólo en NHBD).
- iii. **IF** Tras las 6 horas de isquemia fría (tanto en HBD como NHBD)
- iv. **1H** Tras la hora de reperfusión.
- v. **5D** A los cinco días postrasplante.

Determinación de la expresión de TGF- β 1 por PCR competitiva

Los métodos convencionales de análisis de expresión de mRNA tales como el Northern-blot o la técnica de protección de las ribonucleasas (RPA) no son lo suficientemente sensibles como para detectar mRNAs específicos en muestras de pequeño tamaño o con bajo número de copias por célula. La cuantificación que permiten estas técnicas es, además, relativa.

La PCR es una metodología altamente sensible. Para cuantificar niveles de expresión de mRNAs, éstos deben retrotranscribirse a DNA complementario (cDNA) por medio de DNA polimerasas dependientes de RNA (retrotranscriptasas), puesto que la *Taq* es una polimerasa dependiente de DNA.

La retrotranscripción (RT) asociada a PCR (RT-PCR) nos permite amplificar *in vitro* secuencias de cDNA definidas con una alta sensibilidad. Sin embargo, debido a su carácter exponencial, no es un buen método de cuantificación. Los productos de PCR finales no reflejan necesariamente la cantidad inicial de cDNA presente en la muestra ya que pequeñas variaciones durante los primeros ciclos de la PCR serán exponencialmente amplificadas.

La PCR competitiva es una versión de PCR que permite cuantificar de forma absoluta (número de copias) moléculas de cDNA. Para este proceso es necesario un Standard o competidor, un fragmento de DNA de concentración conocida que contenga la misma secuencia de reconocimiento para los cebadores que el cDNA que se pretende cuantificar. El Standard de una PCR competitiva ha de poderse diferenciar —por tamaño o por patrón de restricción— del cDNA problema. Es, asimismo, imprescindible determinar con exactitud la concentración del mismo y debe ser una molécula estable.

En la PCR competitiva se amplifica en el mismo tubo y con los mismos cebadores, moléculas del competidor y del cDNA que se quiere cuantificar (cDNA problema o diana). Se habla por ello de una coamplificación. Para cada muestra se utilizan un mínimo de cinco tubos en los que se coamplifica una batería de diluciones conocidas del competidor con una cantidad constante de cDNA problema (Figura A2, C).

La metodología se basa en la distinta probabilidad que tienen las moléculas de competidor o del cDNA problema por amplificarse según la concentración relativa de ellas en el tubo de reacción. En los de mayor concentración de competidor, será más probable que los cebadores se unan a estas secuencias y se amplifiquen. A medida que la cantidad de competidor va disminuyendo, la probabilidad de que se amplifiquen las moléculas de cDNA problema será mayor. Es una competición entendida como la mayor accesibilidad de los cebadores y la polimerasa a aquellas moléculas que están más abundantemente representadas en la reacción.

El resultado son dos productos de PCR cuya amplificación sufre un proceso inverso, a medida que la cantidad de amplificación de una disminuye (competidor), aumenta la amplificación de la otra (cDNA problema) (Figura A3, B).

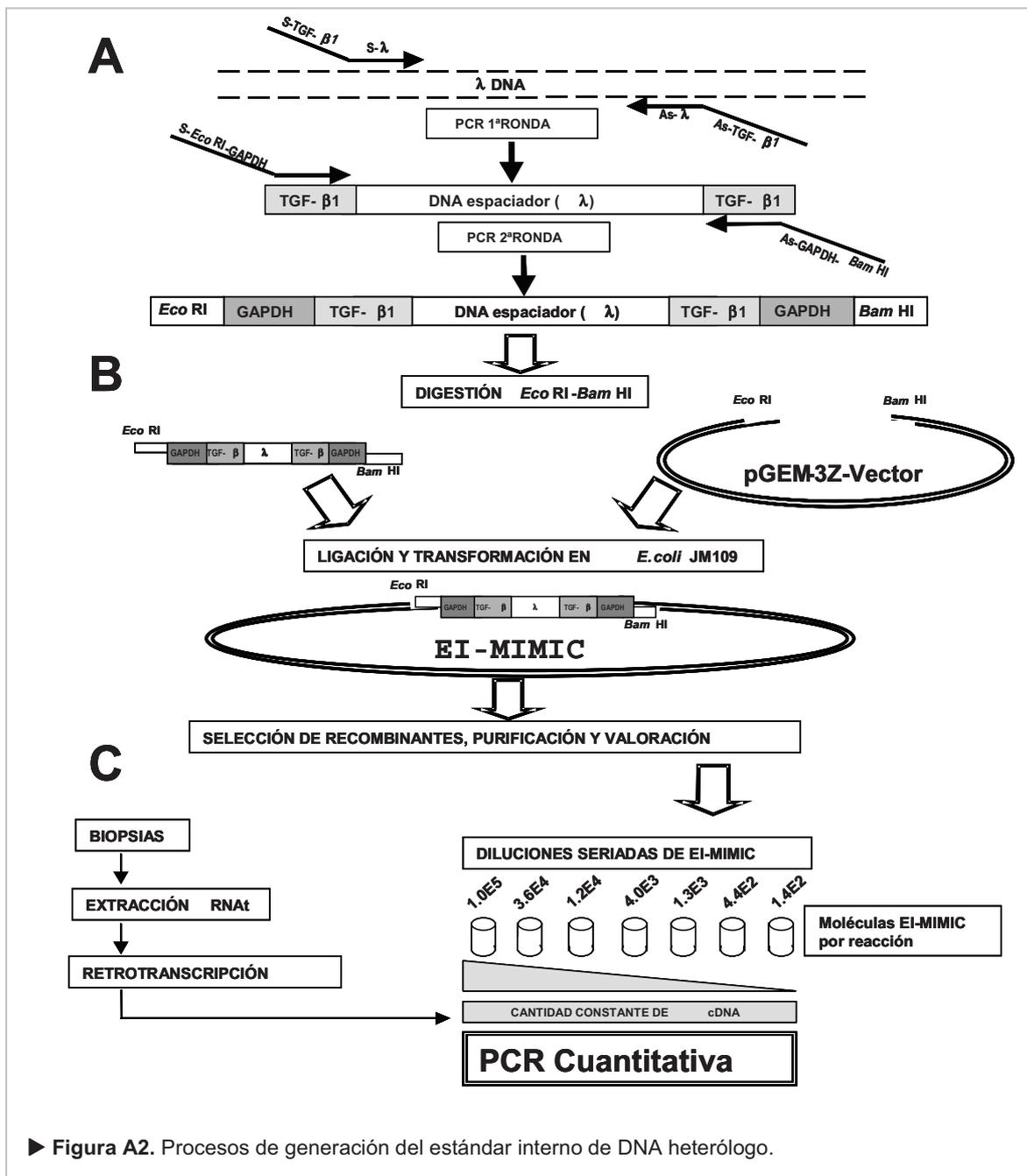
A lo largo del proceso, existe un punto en el que las concentraciones del competidor y el cDNA son tan similares que la probabilidad de amplificarse es la misma para ambas. Este es el punto de equimolaridad, donde el cociente entre los productos amplificados refleja la relación real que existe entre la cantidad inicial conocida del competidor y la cantidad de cDNA problema.

Bibliografía complementaria sobre PCR cuantitativa puede encontrarse en (Freeman et al., 1999; Raeymaekers, 1993; Raeymaekers, 2000)

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

Se diseñó un estándar interno heterólogo compuesto por: fago lambda (λ , N° acceso: J02459) como espaciador, secuencias para los cebadores de TGF- β 1 (N° acceso: M23703) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, N° acceso: AF017079) y las dianas de restricción para *EcoRI* y *BamHI* para su posterior clonaje. El EI-MIMIC se realizó utilizando una modificación de la metodología PCR MIMICS (Siebert and Larrick, 1993). Tanto los cebadores simples como los compuestos fueron diseñados y testados mediante el programa Oligo 4.01 (Molecular Biology Insights). En una primera fase, se obtuvo un fragmento de PCR que contenía el DNA espaciador de fago λ y las secuencias para TGF- β 1. En una segunda ronda, utilizando este primer amplicón como sustrato, se obtuvo el producto final que contenía el DNA espaciador λ , las secuencias para TGF- β 1, las secuencias GAPDH y las dianas de restricción para *EcoRI* y *BamHI* (Figura A2, A). El producto de PCR así obtenido y el vector de clonaje pGEM-3Z fueron

sometidos a una digestión doble con *EcoRI* y *BamHI* (Promega). Las digestiones se purificaron y ligaron con T4 DNA ligasa.



La transformación se realizó en células competentes *E. coli*-JM109. Las bacterias transformadas se seleccionaron por screening en presencia de ampicilina-tetraciclina y X-Gal/IPTG (Figura A2, B) (pGEM Vector System; Promega). Las colonias que presentaron el plásmido recombinante se hicieron crecer en medio LB, purificándose el plásmido por miniprep (QIAprep Spin Miniprep kit; Qiagen). EI-MIMIC fue secuenciado con tal de verificar su identidad (ABI PRISM Dye Terminator Cycle

Sequencing Kit) y cuantificado por espectrofotometría ultravioleta a 260nm (Kontron Instruments).

Tras determinar el intervalo de expresión de TGF- β 1 en riñón de cerdo se realizaron diluciones seriadas del EI-MIMIC que se alicuotaron a -20°C hasta su uso en la PCR cuantitativa) (Figura A2, C).

Aislamiento del RNA total:

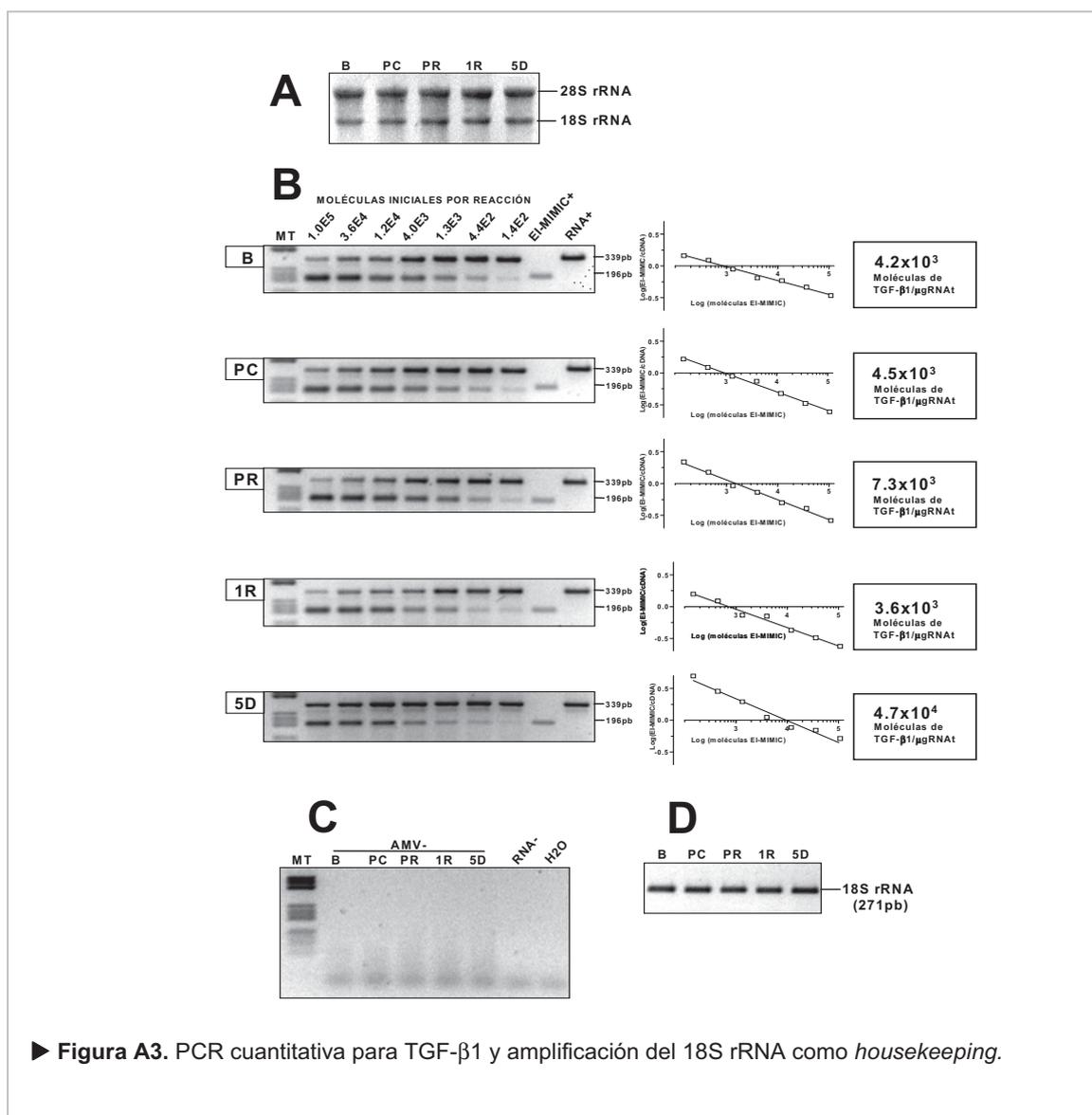
Las biopsias renales obtenidas durante la cirugía fueron inmediatamente congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido. El RNA total (RNAt) fue aislado por el método del guanidinio-isotiocianato tal y como lo describe Chirgwin (Chirgwin et al., 1979). Las biopsias renales corticales fueron homogeneizadas en una solución que contiene guanidinio-isotiocianato 4.0M y 2-mercaptoetanol 0.14M con Polytron (Kinematica). El homogenado obtenido se dispensó sobre una solución de cloruro de cesio 5.7M y fue centrifugado a 140.000xg durante 18 horas a 20°C (L8-M Beckman Ultracentrifuge). El pellet fue resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC; Ambion), precipitado con acetato sódico 3.0M y etanol absoluto, lavado con etanol 70% (v/v) y resuspendido de nuevo en H₂O-DEPC. La cuantificación y pureza del RNAt se realizó por espectrofotometría ultravioleta a 260-280nm y la integridad se valoró por visualización de los RNA ribosómicos (rRNA) 18S y 28S en gel de agarosa desnaturizante al 1% (Figura A3, A). El RNAt fue congelado y almacenado a -80°C hasta su uso en la retrotranscripción.

Retrotranscripción (RT)

4 μ g de RNAt se retrotranscribieron a cDNA en una reacción que contenía RT buffer 1X (50mM Tris-HCl, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5mM espermidina, 1.0mM DTT)(Promega), 500 μ g/ml de random primers (Promega), 1.0mM deoxinucleótidos (dNTPs)(Boehringer Mannheim), 20U de inhibidor de las RNAsas (Rnasin; Amersham Pharmacia Biotech) y 15U de transcriptasa reversa del virus del mioblastoma aviar (AMV; Promega). La síntesis del cDNA se realizó en un termociclador PTC-200 DNA Engine (MJ-Research) durante 1h a 42°C y posteriormente se desnaturizó la AMV durante 5' a 95°C.

Se realizaron dos controles en este paso que después se sometieron a PCR: el primero verifica la posible contaminación de DNA genómico en el RNAt (AMV-) y el segundo controla la posible contaminación de amplicones en los reactivos de la

retrotranscripción (RNA-). Las RTs se mantuvieron a 4°C hasta su uso por no más de 24h. Previa a la PCR cuantitativa, las RT y sus respectivos controles fueron diluidos en 1/4 en H₂O.



► **Figura A3.** PCR cuantitativa para TGF- β 1 y amplificación del 18S rRNA como *housekeeping*.

PCR cuantitativa para TGF- β 1

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

- 7 diluciones de EI-MIMIC que comprendían el intervalo desde 1.0×10^5 a 1.4×10^2 moléculas por tubo.
- 2 controles positivos, uno conteniendo cDNA (RT+) y otro conteniendo EI-MIMIC (EI-MIMIC+)

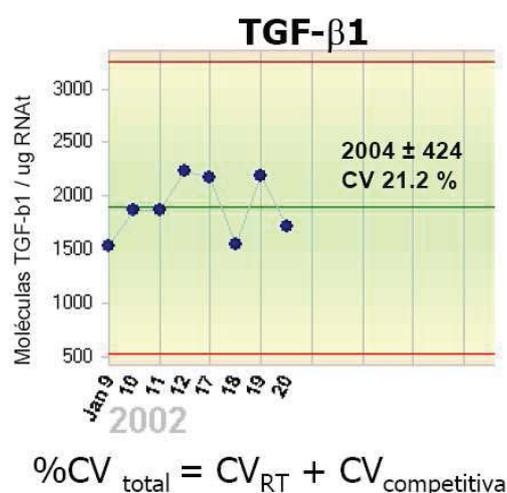
-
- 3 controles negativos: el control de genómico (AMV-), el control de reactivos de la retrotranscripción (RNA-), y el control de reactivos de la PCR sin cDNA ni EI-MIMIC (H₂O).

La mezcla de reacción estaba compuesta por: buffer de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; Ecogen), 2.0mM dNTPs (Boehringer Mannheim), 0.25μM de cebadores (sentido 5' GCC GCT GCT GCT GCC GCT GCT GT; antisentido 5' TCA TAG ATT TGG TTG CCG CTT TC), 0.9mM MgCl₂ y 0.5U Taq DNA polimerasa (Ecogen). Las reacciones que formaban parte de la curva estándar de la PCR cuantitativa contenían 32μl de la mezcla de reacción, 4μl de EI-MIMIC y 4μl de cDNA (diluido 1/4). Las muestras así preparadas se dispusieron en un PTC-200 DNA-Engine (MJ-Research) en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 5' y 35 ciclos de PCR compuestos por: desnaturalización a 94°C 30", hibridación a 57°C 30" y extensión a 72°C 30". Se incluyó una extensión final de 72°C 5'.

Posteriormente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en agarosa-nusieve al 2.5% (Pronadisa) durante 90' a 6V/cm y fueron teñidos con bromuro de etidio. El competidor MIMIC presenta un tamaño de 196pb, mientras que el cDNA para TGF-β1 rinde una banda de 339pb. Los geles fueron fotografiados con el sistema Kodak DC120 Digital Access y las intensidades cuantificadas por densitometría mediante el programa Phoretix-1D (Nonlinear Dynamics). Un experimento representativo de la cuantificación de TGF-β1 se muestra en la Figura A3, B. Los controles negativos se muestran en la Figura A3, C.

El cociente de las densidades corregidas por tamaños de EI-MIMIC y cDNA (factor de corrección: EI-MIMIC x 1.73) se representaron en función de la cantidad inicial de EI-MIMIC presente en cada reacción y sometida a regresión lineal con GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc). El punto de corte con el eje de abcisas representa la cantidad inicial de cDNA presente en la muestra. El resultado final se expresa como moléculas de TGF-β1/μg de RNAt (Figura A3, B). Antes de normalizar los resultados con logaritmo natural, el coeficiente de variación intraensayo (%CV_{intra}) para la suma de RT, PCR cuantitativa y densitometría fue del 21.2% (n=8). Tras la normalización el %CV_{intra} se fijó en 2.8% (Figura A4).

► **Figura A4**, Coeficientes de variación interensayo del control de calidad para la PCR competitiva.



Amplificación de 18S rRNA como housekeeping.

En este estudio se decidió sustituir el gen housekeeping GAPDH presente en el EI-MIMIC por la valoración semicuantitativa de 18S rRNA con la finalidad de confirmar tanto la celularidad como la valoración de los RNA testados.

Existen evidencias (Zhong and Simons, 1999) que indican que GAPDH es muy variable bajo condiciones de hipoxia y se sugiere que estas variaciones serían más acusadas durante la isquemia que sufre el riñón durante el trasplante. De entre todos los genes housekeeping revisados por este grupo bajo condiciones de hipoxia el 28S fue el menos variable (28S y 18S se transcriben en un mismo rRNA 45S que es después procesado para obtener los distintos rRNA) (Alberts et al., 2002).

Se diseñaron unos cebadores específicos para 18S rRNA: (Nº Acceso: AF179868, AF102857): sentido 5' CGT CCC CGC CCC TTG CCT CT; antisentido 5' GCT TTC GCT CTG GTC CGT CTT que generan un producto de 271bp. Se testaron varias diluciones del cDNA a distintos ciclos de PCR con tal de determinar la linealidad de la PCR. Las condiciones finales fueron: PCR buffer 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; Ecogen), 2.0mM dNTPs (Boehringer Mannheim), 0.5µM de cebadores, 2.0mM MgCl₂ y 0.5U Taq DNA polimerasa (Ecogen). El cDNA se diluyó 1/40 y 4.0µl fueron sometidos a 22 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C 5' y 35 ciclos de PCR compuestos por: desnaturalización a 94°C 30", hibridación a 60°C 30" y extensión a 72°C 30". Se incluyó una extensión final de 72°C 5'.

Posteriormente, los productos de PCR se cargaron en agarosa 2.0% (Pronadisa), se hicieron correr 60' a 6V/cm y fueron teñidos con bromuro de etidio (Figura A3, D). Las

imágenes fueron adquiridas y tratadas como en el caso de TGF- β 1. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densitometría (UAD). El %CV_{intra} para la suma de la RT, PCR semicuantitativa y densitometría fue del 4.4% n=7).

Apéndice III

Cuantificación de por PCR en tiempo real con el sistema LightCycler

La complejidad y elevado tiempo necesario para el diseño y análisis de expresión por PCR competitiva ha limitado durante mucho tiempo la cuantificación de RNA.

Actualmente, los nuevos marcadores fluorogénicos y los termocicladores en tiempo real facilitan esta cuantificación. La adquisición por nuestro grupo del sistema de PCR en tiempo real LightCycler nos permitió determinar la expresión de los genes a estudio de una manera relativamente más sencilla y sobre todo con un menor tiempo de análisis ya que se eliminan todas las fases post-PCR, limitando asimismo la contaminación ya que la reacción de PCR y el análisis se realizan en el mismo tubo (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Wong and Medrano, 2005).

Semicuantificación por PCR a tiempo real: curvas standard de cDNA.

La cuantificación que realizaremos con el sistema en tiempo real fue semicuantitativa, esto significa que no obtuvimos un resultado cuantitativo en moléculas/ μ gRNA sino que el resultado se expresó en ng equivalentes de cDNA de la curva standard. Para ello se realizó un pool de RNA de 5 biopsias basales que se retrotranscribieron, diluyeron y alicuotaron a -70°C .

Optimización de la PCR en tiempo real

Los cebadores que utilizamos en la amplificación de los genes a estudio fueron diseñados con PrimerSelect (DNASar Inc.) y optimizados. Este último aspecto consiste en la determinación empírica de la concentración de Mg^{2+} , determinación de la temperatura de *annealing*, así como del nivel de expresión en condiciones basales determinado por el *crossing point* (Cp) y la temperatura de melting (Tm) característica de cada producto de PCR. Asimismo, se determina la eficiencia de cada PCR utilizando la pendiente de la curva standard para cada uno de los genes.

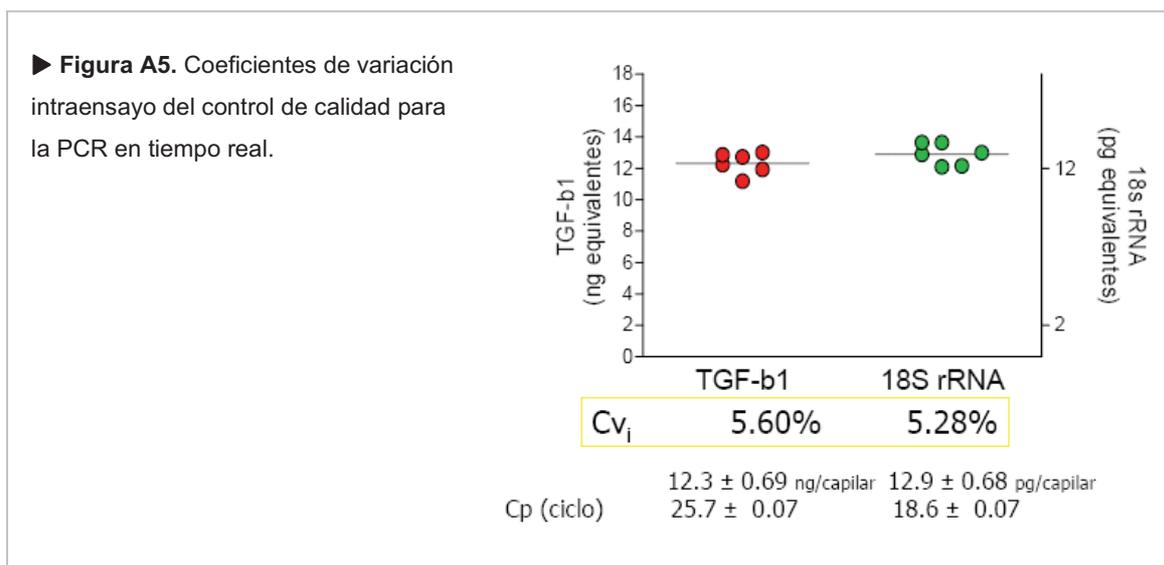
PCR en tiempo real

Una serie típica de cuantificación consta de: 6 puntos de curva standard de cDNA (entre 50 y 3.1 ng cDNA/capilar), dos controles positivos, las muestras problema a 12.5

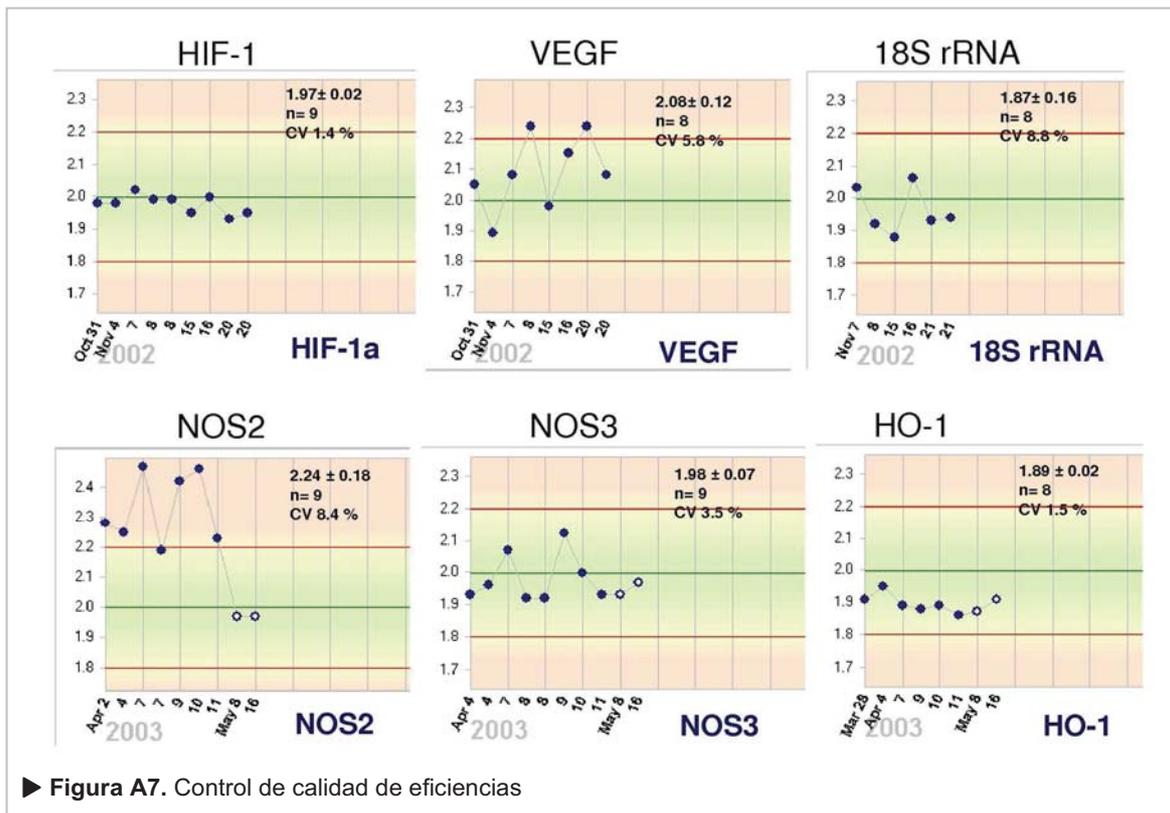
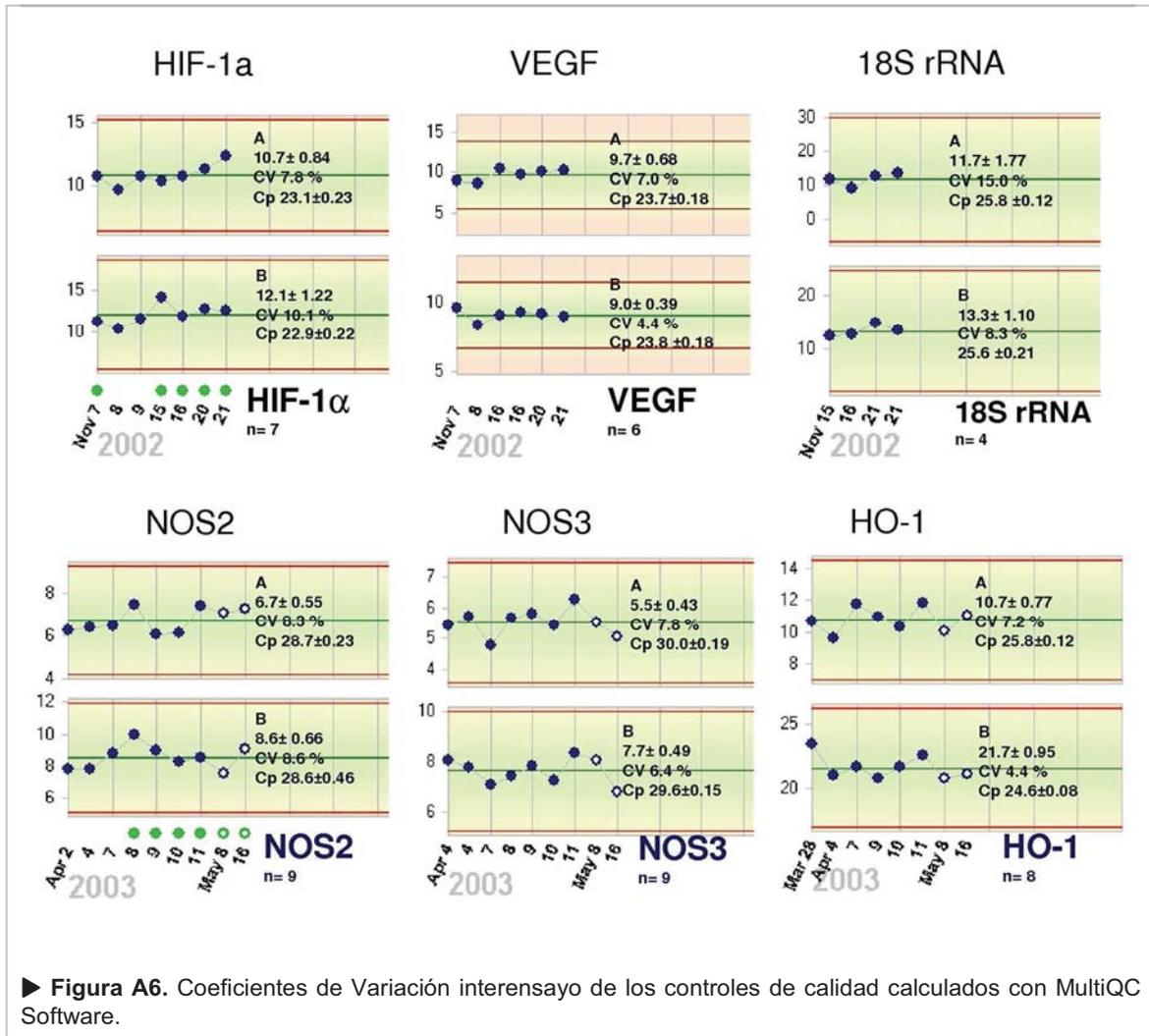
ng cDNA/capilar y los controles negativos de PCR y RT. El mastermix está constituido por FastStart DNA Master SYBRGreen I 1X (Roche), uracilo-N-glicosilasa (Roche) y los cebadores específicos (0.5 μ M). Los capilares así preparados se disponen en el rotor del sistema y son sometidos al protocolo específico para cada uno de ellos que consiste en una fase de amplificación y otra de melting. El software LightCycler 3.5 calcula al final el Cp para cada uno de los puntos de la curva standard y de las muestras extrapolando estas últimas y determinando para cada una de ellas los ng equivalentes del gen problema.

Control de calidad, determinación de los coeficientes de variación.

Se realizaron controles de calidad con el objetivo de determinar los %CV_{Intra} e %CV_{Inter} para cada uno de los genes analizados. Para ello se procesaron dos pools de RNAt de 5 biopsias basales que se retrotranscribieron, diluyeron y alicuotaron a -70°C. En cada serie se analizaron estos controles determinándose su %CV. Los resultados de los CV_{intra} para TGF- β 1 y 18S rRNA se muestran en la Figura A5, mientras que los CV_{Inter} se muestran en la Figura A6.

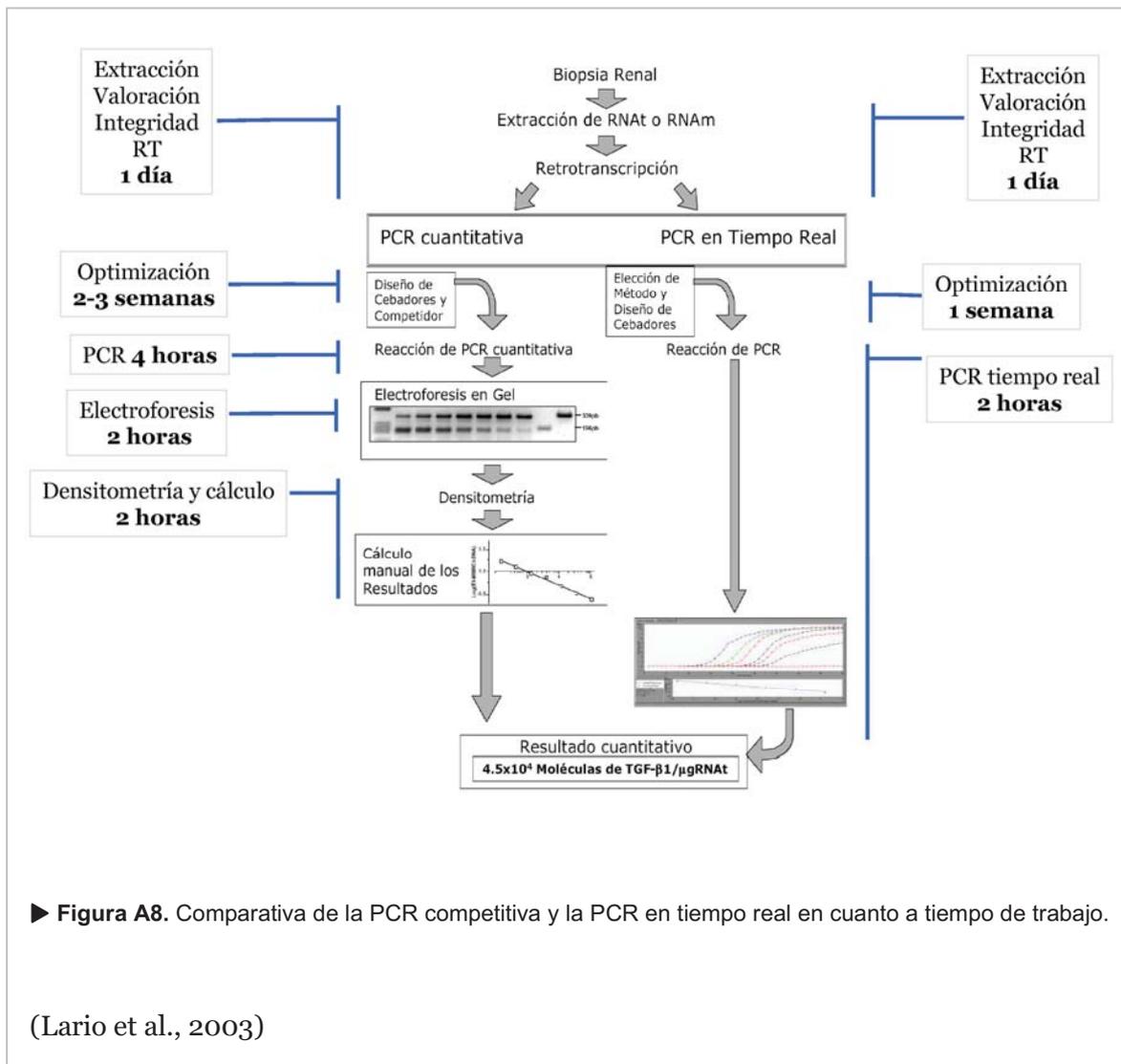


Asimismo todos los RNAt obtenidos fueron analizados en cuanto a su integridad y pureza y se establecieron los controles de contaminación de DNA genómico y de contaminación de reactivos de RT y PCR. Las variaciones en cuanto a la eficiencia de la PCR también fueron analizadas y se muestran en la Figura A7.



La Figura A8 muestra una comparativa de los tiempos de trabajo entre la PCR competitiva y la PCR a tiempo real. Los tiempos de extracción, valoración, chequeo de la integridad y retrotranscripción son los mismos para las dos técnicas, sin embargo en el diseño y optimización encontramos la primera gran diferencia, una competitiva estaría puesta a punto en dos o tres semanas mientras que una PCR a tiempo real se consigue optimizar unos días (o en horas si se opta por la adquisición de un kit prediseñado).

Asimismo, al eliminarse las fases de post PCR y el análisis manual, los resultados de la PCR en tiempo real los obtendríamos en unas dos horas, mientras que para la competitiva necesitaríamos un mínimo de ocho.



Para finalizar, la Tabla A1 muestra una comparativa resumen de varias características de la cuantificación por PCR. Mientras que la PCR competitiva consume un 40% de la RT (1 µg RNA total) por gen, la PCR en tiempo real consume un 1.25% lo que permite analizar entre 40 y 80 genes dependiendo de su nivel de expresión. La sensibilidad y especificidad son comparables, puesto que son inherentes al proceso de PCR. Por último los CV_{inter} son aceptables para la PCR competitiva (teniendo en cuenta la complejidad técnica que arrastra) y comparables a los valores obtenidos por otras metodologías como los ELISA para la PCR en tiempo real.

Tabla A1. Comparativa resumen de varias características de la cuantificación por PCR.

	PCR competitiva	PCR tiempo real
Consumo de cDNA	40%	1.25%
Nº de genes/RT	2-3	40-80
Sensibilidad	ALTA	ALTA
Especificidad	ALTA	ALTA
%CV intraensayo	ND	< 6.0%
%CV interensayo	<20%	<10%

► **Bibliografia**

- Abdelouahed,M., Ludlow,A., Brunner,G., and Lawler,J. (2000). Activation of platelet-transforming growth factor beta-1 in the absence of thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* 275, 17933-17936.
- Abraham,N.G. and Kappas,A. (2005). Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1-25.
- Agarwal,A. and Nick,H.S. (2000). Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 965-973.
- Aizawa,T., Ishizaka,N., Taguchi,J., Nagai,R., Mori,I., Tang,S.S., Ingelfinger,J.R., and Ohno,M. (2000). Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. *Hypertension* 35, 800-806.
- Akagi,Y., Isaka,Y., Arai,M., Kaneko,T., Takenaka,M., Moriyama,T., Kaneda,Y., Ando,A., Orita,Y., Kamada,T., Ueda,N., and Imai,E. (1996). Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 50, 148-155.
- Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Walter,P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=mboc4.TOC&depth=2>).
- Albrecht,E.W., Stegeman,C.A., Heeringa,P., Henning,R.H., and van Goor,H. (2003). Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 199, 8-17.
- Albrecht,E.W., Stegeman,C.A., Tiebosch,A.T., Tegzess,A.M., and van,G.H. (2002). Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am. J. Transplant.* 2, 448-453.
- Albrecht,E.W., van,G.H., Tiebosch,A.T., Moshage,H., Tegzess,A.M., and Stegeman,C.A. (2000). Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 70, 1610-1616.
- Altes Ineva, MP, Alonso Paz, Pastor, Abadia, H, Izquierdo, RL, Oppenheimer, F, and Álvarez-Vijande, R. Evolución del trasplante renal de donante vivo: datos históricos, estadísticos, nacionales y propios. *Arch.Esp.Urol.[online]* 58[6], 497-501. 2005.
Ref Type: Abstract
- Anaise,D., Yland,M.J., Waltzer,W.C., Frischer,Z., Hurley,S., Eychmuller,S., and Rapaport,F.T. (1988). Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant. Proc.* 20, 891-894.
- Ando,T., Okuda,S., Tamaki,K., Yoshitomi,K., and Fujishima,M. (1995). Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney. *Kidney Int.* 47, 733-739.
- Andres,A., Praga,M., Ortuno,T., Hernandez,E., and Morales,J. (2001). [The marginal donor in renal transplantation]. *Nefrologia.* 21 *Suppl* 4, 104-110.
- Ashcroft,G.S. (1999). Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes. Infect.* 1, 1275-1282.
- Azuma,H., Nadeau,K., Takada,M., Mackenzie,H.S., and Tilney,N.L. (1997). Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 64, 190-197.
- Bachmann,S. and Mundel,P. (1994). Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am. J. Kidney Dis.* 24, 112-129.
- Baid-Agrawal,S. and Frei,U.A. (2007). Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 3, 31-41.
- Basile,D.P. (1999). The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8, 21-30.

-
- Basile,D.P., Martin,D.R., and Hammerman,M.R. (1998). Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF-beta in repair. *Am. J. Physiol* 275, F894-F903.
- Basile,D.P., Rovak,J.M., Martin,D.R., and Hammerman,M.R. (1996). Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am. J. Physiol* 270, F500-F509.
- Baylis,C., Mitruka,B., and Deng,A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest* 90, 278-281.
- Bitzer,M., Sterzel,R.B., and Bottinger,E.P. (1998). Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res.* 21, 1-12.
- Blydt-Hansen,T.D., Katori,M., Lassman,C., Ke,B., Coito,A.J., Iyer,S., Buelow,R., Ettenger,R., Busuttill,R.W., and Kupiec-Weglinski,J.W. (2003). Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 745-754.
- Bonventre,J.V. (1988). Mediators of ischemic renal injury. *Annu. Rev. Med.* 39, 531-544.
- Bonventre,J.V. (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 43, 1160-1178.
- Bonventre,J.V. and Colvin,R.B. (1996). Adhesion molecules in renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 5, 254-261.
- Border,W.A., Brees,D., and Noble,N.A. (1994). Transforming growth factor-beta and extracellular matrix deposition in the kidney. *Contrib. Nephrol.* 107, 140-145.
- Border,W.A. and Noble,N.A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331, 1286-1292.
- Border,W.A., Noble,N.A., and Ketteler,M. (1995). TGF-beta: a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int. Suppl* 49, S59-S61.
- Border,W.A., Noble,N.A., Yamamoto,T., Harper,J.R., Yamaguchi,Y., Pierschbacher,M.D., and Ruoslahti,E. (1992). Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360, 361-364.
- Border,W.A., Okuda,S., Languino,L.R., Sporn,M.B., and Ruoslahti,E. (1990). Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 346, 371-374.
- Borel,J.F., Feurer,C., Gubler,H.U., and Stahelin,H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-475.
- Bornstein,P. (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J. Clin. Invest* 107, 929-934.
- Boukhalfa,G., Desmouliere,A., Rondeau,E., Gabbiani,G., and Sraer,J.D. (1996). Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp. Nephrol.* 4, 241-247.
- Bouton,C. and Demple,B. (2000). Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 275, 32688-32693.
- Branton,M.H. and Kopp,J.B. (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes. Infect.* 1, 1349-1365.
- Brook,N.R., Waller,J.R., and Nicholson,M.L. (2003). Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney Int.* 63, 1516-1529.
- Brouard,S., Otterbein,L.E., Anrather,J., Tobiasch,E., Bach,F.H., Choi,A.M., and Soares,M.P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 1015-1026.

- Brune, B. and Ullrich, V. (1987). Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* 32, 497-504.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.
- Calne, R.Y., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.N., Pentlow, B.D., and Rolles, K. (1978). Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2, 1323-1327.
- Campistol, J.M. and Grinyo, J.M. (2001). Exploring treatment options in renal transplantation: the problems of chronic allograft dysfunction and drug-related nephrotoxicity. *Transplantation* 71, SS42-SS51.
- Campistol, J.M., Inigo, P., Larios, S., Bescos, M., and Oppenheimer, F. (2001). Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 Suppl 1, 114-116.
- Carmago, S., Shah, S.V., and Walker, P.D. (2002). Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats. *Kidney Int.* 61, 959-966.
- Cerwenka, A. and Swain, S.L. (1999). TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes. Infect.* 1, 1291-1296.
- Chapman, J.R., O'Connell, P.J., and Nankivell, B.J. (2005). Chronic renal allograft dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3015-3026.
- Chatterjee, P.K., Patel, N.S., Kvale, E.O., Cuzzocrea, S., Brown, P.A., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., and Thiemermann, C. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 61, 862-871.
- Chen, H., Li, D., Saldeen, T., and Mehta, J.L. (2001). TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H1035-H1039.
- Chintala, M.S., Chiu, P.J., Vemulapalli, S., Watkins, R.W., and Sybertz, E.J. (1993). Inhibition of endothelial derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 348, 305-310.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Choi, M.E., Kim, E.G., Huang, Q., and Ballermann, B.J. (1993). Rat mesangial cell hypertrophy in response to transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int.* 44, 948-958.
- Coito, A.J., Buelow, R., Shen, X.D., Amersi, F., Moore, C., Volk, H.D., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74, 96-102.
- Conger, J.D. and Weil, J.V. (1995). Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J. Investig. Med.* 43, 431-442.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-1170.
- D'Alessandro, A.M., Hoffmann, R.M., Knechtle, S.J., Eckhoff, D.E., Love, R.B., Kalayoglu, M., Sollinger, H.W., and Belzer, F.O. (1995). Controlled non-heart-beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant. Proc.* 27, 707-709.
- D'Angio, C.T. and Finkelstein, J.N. (2000). Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol. Genet. Metab* 71, 371-380.

-
- Daemen, J.H., de, V.B., Oomen, A.P., DeMeester, J., and Kootstra, G. (1997). Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart-beating donor kidneys--early results. *Transpl. Int.* 10, 317-322.
- Daemen, J.W., Kootstra, G., Wijnen, R.M., Yin, M., and Heineman, E. (1994). Nonheart-beating donors: the Maastricht experience. *Clin. Transpl.* 303-316.
- Daniel, C., Amann, K., Hohenstein, B., Bornstein, P., and Hugo, C. (2007). Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in experimental glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 788-798.
- Daniel, C., Wiede, J., Krutzsch, H.C., Ribeiro, S.M., Roberts, D.D., Murphy-Ullrich, J.E., and Hugo, C. (2004). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Kidney Int.* 65, 459-468.
- Datta, P.K. and Lianos, E.A. (1999). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55, 1734-1739.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000a). The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 37-49.
- Delves, P.J. and Roitt, I.M. (2000b). The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 108-117.
- Devarajan, P. (2005). Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 17, 193-199.
- DiPietro, L.A., Nissen, N.N., Gamelli, R.L., Koch, A.E., Pyle, J.M., and Polverini, P.J. (1996). Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am. J. Pathol.* 148, 1851-1860.
- DiPietro, L.A. and Polverini, P.J. (1993). Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am. J. Pathol.* 143, 678-684.
- Docherty, N.G., Lopez-Novoa, J.M., Arevalo, M., Duwel, A., Rodriguez-Pena, A., Perez-Barriocanal, F., Bernabeu, C., and Eleno, N. (2006). Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 2106-2119.
- Docherty, N.G., Perez-Barriocanal, F., Balboa, N.E., and Lopez-Novoa, J.M. (2002). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1): a potential recovery signal in the post-ischemic kidney. *Ren Fail.* 24, 391-406.
- Duckers, H.J., Boehm, M., True, A.L., Yet, S.F., San, H., Park, J.L., Clinton, W.R., Lee, M.E., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* 7, 693-698.
- Duffield, J.S., Park, K.M., Hsiao, L.L., Kelley, V.R., Scadden, D.T., Ichimura, T., and Bonventre, J.V. (2005). Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J. Clin. Invest.* 115, 1743-1755.
- Durante, W., Kroll, M.H., Christodoulides, N., Peyton, K.J., and Schafer, A.I. (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 80, 557-564.
- Eckardt, K.U., Bernhardt, W.M., Weidemann, A., Warnecke, C., Rosenberger, C., Wiesener, M.S., and Willam, C. (2005). Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int. Suppl* S46-S51.
- English, J., Evan, A., Houghton, D.C., and Bennett, W.M. (1987). Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44, 135-141.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.P., Kikkawa, Y., Miner, J.H., and Quaggin, S.E. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* 111, 707-716.
- Erwig, L.P., Stewart, K., and Rees, A.J. (2000). Macrophages from inflamed but not normal glomeruli are unresponsive to anti-inflammatory cytokines. *Am. J. Pathol.* 156, 295-301.

- Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.
- Fischer,S., Renz,D., Schaper,W., and Karliczek,G.F. (2001). In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Pharmacol.* 411, 231-243.
- Forstermann,U., Gath,I., Schwarz,P., Closs,E.I., and Kleinert,H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1321-1332.
- Frazier,W.A. (1987). Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J. Cell Biol.* 105, 625-632.
- Freeman,W.M., Walker,S.J., and Vrana,K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112-115.
- Fukumura,D., Gohongi,T., Kadambi,A., Izumi,Y., Ang,J., Yun,C.O., Buerk,D.G., Huang,P.L., and Jain,R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2604-2609.
- Furchgott,R.F. and Zawadzki,J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gage,F.A. and Vodovotz,Y. (2003). Normalization of nitric oxide flux improves physiological parameters of porcine kidneys maintained on pulsatile perfusion. *Nitric. Oxide.* 9, 141-147.
- Gamble,J.R. and Vadas,M.A. (1988). Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 242, 97-99.
- Gobe,G., Willgoss,D., Hogg,N., Schoch,E., and Endre,Z. (1999). Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 56, 1299-1304.
- Goligorsky,M.S., Brodsky,S.V., and Noiri,E. (2002). Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int.* 61, 855-861.
- Gonzalez-Michaca,L., Farrugia,G., Croatt,A.J., Alam,J., and Nath,K.A. (2004). Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286, F370-F377.
- Ha,H.C. and Snyder,S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13978-13982.
- Ha,I.S., Um,E.Y., Jung,H.R., Park,H.W., Cheong,H.I., and Choi,Y. (2002). Glucocorticoid diminishes vascular endothelial growth factor and exacerbates proteinuria in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 39, 1001-1010.
- Haugen,E.N., Croatt,A.J., and Nath,K.A. (2000). Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int.* 58, 144-152.
- Hebbel,R.P. and Eaton,J.W. (1989). Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. *Semin. Hematol.* 26, 136-149.
- Heeringa,P., van,G.H., Itoh-Lindstrom,Y., Maeda,N., Falk,R.J., Assmann,K.J., Kallenberg,C.G., and Jennette,J.C. (2000). Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine accelerated anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 156, 879-888.
- Henke,W., Nickel,E., and Jung,K. (1992). Cyclosporine A inhibits ATP net uptake of rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 43, 1021-1024.
- Higgins,D.F., Biju,M.P., Akai,Y., Wutz,A., Johnson,R.S., and Haase,V.H. (2004). Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F1223-F1232.
- Hill-Kapturczak,N., Truong,L., Thamilselvan,V., Visner,G.A., Nick,H.S., and Agarwal,A. (2000). Smad7-dependent regulation of heme oxygenase-1 by transforming growth factor-beta in human renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 40904-40909.

Hochegger,K., Knight,S., Hugo,C., Mayer,G., Lawler,J., Mayadas,T.N., and Rosenkranz,A.R. (2004). Role of thrombospondin-1 in the autologous phase of an accelerated model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Nephron Exp. Nephrol.* 96, e31-e38.

Hogg,P.J., Owensby,D.A., and Chesterman,C.N. (1993). Thrombospondin 1 is a tight-binding competitive inhibitor of neutrophil cathepsin G. Determination of the kinetic mechanism of inhibition and localization of cathepsin G binding to the thrombospondin 1 type 3 repeats. *J. Biol. Chem.* 268, 21811-21818.

Hood,J.D., Meiningner,C.J., Ziche,M., and Granger,H.J. (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am. J. Physiol* 274, H1054-H1058.

Horie,M., Uchida,S., Yanagisawa,M., Matsushita,Y., Kurokawa,K., and Ogata,E. (1991). Mechanisms of endothelin-1 mRNA and peptides induction by TGF-beta and TPA in MDCK cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 Suppl 7, S222-S225.

Huang,L.E., Willmore,W.G., Gu,J., Goldberg,M.A., and Bunn,H.F. (1999). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 9038-9044.

Hugo,C., Kang,D.H., and Johnson,R.J. (2002). Sustained expression of thrombospondin-1 is associated with the development of glomerular and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney model. *Nephron* 90, 460-470.

Hugo,C., Shankland,S.J., Pichler,R.H., Couser,W.G., and Johnson,R.J. (1998). Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int.* 53, 302-311.

Humar,A. and Dunn,D. (2005). Chapter 10 -Transplantation. In *Schwartz's Principles of Surgery*, F.Brunicaardi, T.Billiari, D.Andersen, D.Dunn, J.Hunter, J.Matthews, R.Pollock, and S.Schwartz, eds. McGraw-Hill).

Isaka,Y., Fujiwara,Y., Ueda,N., Kaneda,Y., Kamada,T., and Imai,E. (1993). Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J. Clin. Invest* 92, 2597-2601.

Jerkic,M., Rivas-Elena,J.V., Prieto,M., Carron,R., Sanz-Rodriguez,F., Perez-Barriocanal,F., Rodriguez-Barbero,A., Bernabeu,C., and Lopez-Novoa,J.M. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 18, 609-611.

Johnson,D.W. (2000). Growth factors in progressive renal disease. *Nephrology* 5, 251-261.

Joosten,S.A., Sijpkens,Y.W., van,K.C., and Paul,L.C. (2005). Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 68, 1-13.

Kahan,B.D., Van Buren,C.T., Flechner,S.M., Jarowenko,M., Yasumura,T., Rogers,A.J., Yoshimura,N., LeGrue,S., Drath,D., and Kerman,R.H. (1985). Clinical and experimental studies with cyclosporine in renal transplantation. *Surgery* 97, 125-140.

Kanamaru,Y., Nakao,A., Mamura,M., Suzuki,Y., Shirato,I., Okumura,K., Tomino,Y., and Ra,C. (2001). Blockade of TGF-beta signaling in T cells prevents the development of experimental glomerulonephritis. *J. Immunol.* 166, 2818-2823.

Kanellis,J., Mudge,S.J., Fraser,S., Katerelos,M., and Power,D.A. (2000). Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 57, 2445-2456.

Kanellis,J., Paizis,K., Cox,A.J., Stacker,S.A., Gilbert,R.E., Cooper,M.E., and Power,D.A. (2002). Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidney Int.* 61, 1696-1706.

Kang,D.H., Anderson,S., Kim,Y.G., Mazzalli,M., Suga,S., Jefferson,J.A., Gordon,K.L., Oyama,T.T., Hughes,J., Hugo,C., Kerjaschki,D., Schreiner,G.F., and Johnson,R.J. (2001a). Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 37, 601-611.

- Kang,D.H., Hughes,J., Mazzali,M., Schreiner,G.F., and Johnson,R.J. (2001b). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1448-1457.
- Kang,D.H., Joly,A.H., Oh,S.W., Hugo,C., Kerjaschki,D., Gordon,K.L., Mazzali,M., Jefferson,J.A., Hughes,J., Madsen,K.M., Schreiner,G.F., and Johnson,R.J. (2001c). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1434-1447.
- Kang,D.H., Kanellis,J., Hugo,C., Truong,L., Anderson,S., Kerjaschki,D., Schreiner,G.F., and Johnson,R.J. (2002). Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 806-816.
- Katori,M., Busuttil,R.W., and Kupiec-Weglinski,J.W. (2002). Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 74, 905-912.
- Kelly,K.J., Williams,W.W., Jr., Colvin,R.B., and Bonventre,J.V. (1994). Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 812-816.
- Khalil,N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes. Infect.* 1, 1255-1263.
- Khanna,A., Kapur,S., Sharma,V., Li,B., and Suthanthiran,M. (1997). In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 63, 1037-1039.
- Khanna,A., Li,B., Stenzel,K.H., and Suthanthiran,M. (1994). Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation* 57, 577-582.
- Kimber,R.M., Metcalfe,M.S., White,S.A., and Nicholson,M.L. (2001). Use of non-heart-beating donors in renal transplantation. *Postgrad. Med. J.* 77, 681-685.
- King,A.J. and Brenner,B.M. (1991). Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am. J. Physiol* 260, R653-R662.
- Kitamura,H., Shimizu,A., Masuda,Y., Ishizaki,M., Sugisaki,Y., and Yamanaka,N. (1998). Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp. Nephrol.* 6, 328-336.
- Klein,J. and Sato,A. (2000a). The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 702-709.
- Klein,J. and Sato,A. (2000b). The HLA system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343, 782-786.
- Kootstra,G., Daemen,J.H., and Oomen,A.P. (1995). Categories of non-heart-beating donors. *Transplant. Proc.* 27, 2893-2894.
- Kootstra,G., Wijnen,R., van Hooff,J.P., and van der Linden,C.J. (1991). Twenty percent more kidneys through a non-heart beating program. *Transplant. Proc.* 23, 910-911.
- Kothapalli,D., Frazier,K.S., Welpy,A., Segarini,P.R., and Grotendorst,G.R. (1997). Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ.* 8, 61-68.
- Kumar,N.M., Sigurdson,S.L., Sheppard,D., and Lwebuga-Mukasa,J.S. (1995). Differential modulation of integrin receptors and extracellular matrix laminin by transforming growth factor-beta 1 in rat alveolar epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 221, 385-394.
- Kunduzova,O.R., Escourrou,G., Seguelas,M.H., Delagrance,P., De La,F.F., Cambon,C., and Parini,A. (2003). Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *FASEB J.* 17, 872-874.
- Kwiatkowski,A., Wszola,M., Kosieradzki,M., Danielewicz,R., Ostrowski,K., Domagala,P., Lisik,W., Nosek,R., Fesolowicz,S., Trzebicki,J., Durlik,M., Paczek,L., Chmura,A., and Rowinski,W. (2007). Machine perfusion preservation improves renal allograft survival. *Am. J. Transplant.* 7, 1942-1947.

-
- Lally,C., Healy,E., and Ryan,M.P. (1999). Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 56, 1254-1257.
- Lario,S., Bescos,M., and Campistol,J.M. (2003). [Applications of molecular biology to renal transplant]. *Nefrologia.* 23, 15-26.
- Lastres,P., Letamendia,A., Zhang,H., Rius,C., Almendro,N., Raab,U., Lopez,L.A., Langa,C., Fabra,A., Letarte,M., and Bernabeu,C. (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J. Cell Biol.* 133, 1109-1121.
- Lawler,J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 634-640.
- Lawler,J., Sunday,M., Thibert,V., Duquette,M., George,E.L., Rayburn,H., and Hynes,R.O. (1998). Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest* 101, 982-992.
- Lebman,D.A. and Edmiston,J.S. (1999). The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes. Infect.* 1, 1297-1304.
- Lee,L.K., Meyer,T.W., Pollock,A.S., and Lovett,D.H. (1995). Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J. Clin. Invest* 96, 953-964.
- Lee,P.C., Salyapongse,A.N., Bragdon,G.A., Shears,L.L., Watkins,S.C., Edington,H.D., and Billiar,T.R. (1999). Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol* 277, H1600-H1608.
- Lee,P.C., Wang,Z.L., Qian,S., Watkins,S.C., Lizonova,A., Kovesdi,I., Tzeng,E., Simmons,R.L., Billiar,T.R., and Shears,L.L. (2000). Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 69, 1186-1192.
- Lemos,F.B., Ijzermans,J.N., Zondervan,P.E., Peeters,A.M., van den,E.S., Mol,W.M., Weimar,W., and Baan,C.C. (2003). Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 3278-3287.
- Liang,M., Croatt,A.J., and Nath,K.A. (2000). Mechanisms underlying induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 279, F728-F735.
- Libby,P. and Pober,J.S. (2001). Chronic rejection. *Immunity.* 14, 387-397.
- Lieberthal,W. (1998). Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7, 289-295.
- Lieberthal,W. and Levine,J.S. (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am. J. Physiol* 271, F477-F488.
- Ling,H., Edelstein,C., Gengaro,P., Meng,X., Lucia,S., Knotek,M., Wangsiripaisan,A., Shi,Y., and Schrier,R. (1999). Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am. J. Physiol* 277, F383-F390.
- Liu,J., Farmer,J.D., Jr., Lane,W.S., Friedman,J., Weissman,I., and Schreiber,S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Luque P. Trasplante renal experimental en cerdo con donante a corazón parado. Estudio de la lesión por isquemia reperfusión. Marcadores de viabilidad del injerto. (<http://www.tesisenxarxa.net/>). 1999.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Maines,M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 517-554.
- Manotham,K., Tanaka,T., Ohse,T., Kojima,I., Miyata,T., Inagi,R., Tanaka,H., Sassa,R., Fujita,T., and Nangaku,M. (2005). A biologic role of HIF-1 in the renal medulla. *Kidney Int.* 67, 1428-1439.
- Mansfield,E.S. and Sarwal,M.M. (2004). Arraying the orchestration of allograft pathology. *Am. J. Transplant.* 4, 853-862.

- Marletta, M.A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Matsumoto, M., Makino, Y., Tanaka, T., Tanaka, H., Ishizaka, N., Noiri, E., Fujita, T., and Nangaku, M. (2003). Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1825-1832.
- Maxwell, P. (2003). HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2712-2722.
- McGregor, B., Colon, S., Mutin, M., Chignier, E., Zech, P., and McGregor, J. (1994). Thrombospondin in human glomerulopathies. A marker of inflammation and early fibrosis. *Am. J. Pathol.* 144, 1281-1287.
- McLaren, A.J. and Friend, P.J. (2003). Trends in organ preservation. *Transpl. Int.* 16, 701-708.
- Melillo, G., Taylor, L.S., Brooks, A., Musso, T., Cox, G.W., and Varesio, L. (1997). Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine. *J. Biol. Chem.* 272, 12236-12243.
- Mihatsch, M.J., Kyo, M., Morozumi, K., Yamaguchi, Y., Nিকেleit, V., and Ryffel, B. (1998). The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin. Nephrol.* 49, 356-363.
- Miranda, B., Vilardell, J., and Grinyo, J.M. (2003). Optimizing cadaveric organ procurement: the catalan and Spanish experience. *Am. J. Transplant.* 3, 1189-1196.
- Mitterbauer, C., Schwarz, C., Hauser, P., Steininger, R., Regele, H.M., Rosenkranz, A., and Oberbauer, R. (2003). Impaired tubulointerstitial expression of endothelin-1 and nitric oxide isoforms in donor kidney biopsies with postischemic acute renal failure. *Transplantation* 76, 715-720.
- Miyazono, K. (2000). TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 15-22.
- Monkawa, T., Hiromura, K., Wolf, G., and Shankland, S.J. (2002). The hypertrophic effect of transforming growth factor-beta is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21 and p27. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1172-1178.
- Mosher, D.F., Misenheimer, T.M., Stenflo, J., and Hogg, P.J. (1992). Modulation of fibrinolysis by thrombospondin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 667, 64-69.
- Muhlbacher, F., Langer, F., and Mittermayer, C. (1999). Preservation solutions for transplantation. *Transplant. Proc.* 31, 2069-2070.
- Mumby, S.M., Abbott-Brown, D., Raugi, G.J., and Bornstein, P. (1984). Regulation of thrombospondin secretion by cells in culture. *J. Cell Physiol* 120, 280-288.
- Murphy-Ullrich, J.E., Schultz-Cherry, S., and Hook, M. (1992). Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol. Biol. Cell* 3, 181-188.
- Murray, J.E., MERRILL, J.P., HARRISON, J.H., WILSON, R.E., and DAMMIN, G.J. (1963). Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N. Engl. J. Med.* 268, 1315-1323.
- Nakagawa, T., Lan, H.Y., Glushakova, O., Zhu, H.J., Kang, D.H., Schreiner, G.F., Bottinger, E.P., Johnson, R.J., and Sautin, Y.Y. (2005). Role of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in the regulation of thrombospondin-1 by TGF-beta1 in rat proximal tubular cells and mouse fibroblasts. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 899-904.
- Nakagawa, T., Lan, H.Y., Zhu, H.J., Kang, D.H., Schreiner, G.F., and Johnson, R.J. (2004a). Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F658-F664.

Nakagawa,T., Li,J.H., Garcia,G., Mu,W., Piek,E., Bottinger,E.P., Chen,Y., Zhu,H.J., Kang,D.H., Schreiner,G.F., Lan,H.Y., and Johnson,R.J. (2004b). TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* 66, 605-613.

Nath,K.A., Haggard,J.J., Croatt,A.J., Grande,J.P., Poss,K.D., and Alam,J. (2000). The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am. J. Pathol.* 156, 1527-1535.

Nath,K.A. and Norby,S.M. (2000). Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 109, 665-678.

Nauck,M., Karakiulakis,G., Perruchoud,A.P., Papakonstantinou,E., and Roth,M. (1998). Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 341, 309-315.

Nijboer,W.N., Schuurs,T.A., van der Hoeven,J.A., Fekken,S., Wiersema-Buist,J., Leuvenink,H.G., Hofker,S., Homan van der Heide JJ, van Son,W.J., and Ploeg,R.J. (2004). Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 78, 978-986.

Ning,W., Song,R., Li,C., Park,E., Mohsenin,A., Choi,A.M., and Choi,M.E. (2002). TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 283, L1094-L1102.

Noiri,E., Peresleni,T., Miller,F., and Goligorsky,M.S. (1996). In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J. Clin. Invest* 97, 2377-2383.

O'Garra,A., Warren,D.J., Holman,M., Popham,A.M., Sanderson,C.J., and Klaus,G.G. (1986). Effects of cyclosporine on responses of murine B cells to T cell-derived lymphokines. *J. Immunol.* 137, 2220-2224.

Ojo,A.O., Hanson,J.A., Meier-Kriesche,H., Okechukwu,C.N., Wolfe,R.A., Leichtman,A.B., Agodoa,L.Y., Kaplan,B., and Port,F.K. (2001). Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 589-597.

Oliver,J.A., Maarouf,O., Cheema,F.H., Martens,T.P., and Al-Awqati,Q. (2004). The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest* 114, 795-804.

Organización Nacional de Trasplantes. Meeting the Organ Shortage. Situación actual y estrategias para mejorar la donación de órganos.

http://www.ont.es/Consenso?id_nodo=263&accion=0&accion=0&keyword=&auditoria=F.

http://www.ont.es/Consenso?id_nodo=263&accion=0&accion=0&keyword=&auditoria=F . 1995.

Ref Type: Electronic Citation

Organización Nacional de Trasplantes. Organización Nacional de Trasplantes

(<http://www.ont.msc.es/informacion/legislacion/home.htm>). 2006.

Ref Type: Internet Communication

Owens,G.K., Geisterfer,A.A., Yang,Y.W., and Komoriya,A. (1988). Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 107, 771-780.

Padanilam,B.J. (2003). Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 284, F608-F627.

Page,E.L., Robitaille,G.A., Pouyssegur,J., and Richard,D.E. (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 277, 48403-48409.

Palmer,R.M., Ferrige,A.G., and Moncada,S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Park,K.M., Byun,J.Y., Kramers,C., Kim,J.I., Huang,P.L., and Bonventre,J.V. (2003). Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J. Biol. Chem.* 278, 27256-27266.

- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. (2002). Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 346, 580-590.
- Paul, L.C., Saito, K., Davidoff, A., and Benediktsson, H. (1996). Growth factor transcripts in rat renal transplants. *Am. J. Kidney Dis.* 28, 441-450.
- Pedagogos, E., Hewitson, T.D., Walker, R.G., Nicholis, K.M., and Becker, G.J. (1997). Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 64, 1192-1197.
- Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M.H., and Remuzzi, G. (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364, 1814-1827.
- Phelan, M.W., Forman, L.W., Perrine, S.P., and Faller, D.V. (1998). Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J. Lab Clin. Med.* 132, 519-529.
- Pilmore, H.L., Eris, J.M., Painter, D.M., Bishop, G.A., and McCaughan, G.W. (1999). Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 67, 929-933.
- Plaza, J.J. (2001). [Living donor renal transplantation]. *Nefrologia.* 21 Suppl 4, 97-100.
- Poss, K.D. and Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10919-10924.
- Prieto, M., Rivas, J.V., Lopez Novoa, J.M., and Perez-Barriocanal, F. (2002). [TGF-beta: synthesis and mechanism of action]. *Nefrologia.* 22, 135-143.
- Qian, X., Wang, T.N., Rothman, V.L., Nicosia, R.F., and Tuszynski, G.P. (1997). Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 235, 403-412.
- Rabb, H., Daniels, F., O'Donnell, M., Haq, M., Saba, S.R., Keane, W., and Tang, W.W. (2000). Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 279, F525-F531.
- Racusen, L.C., Solez, K., Colvin, R.B., Bonsib, S.M., Castro, M.C., Cavallo, T., Croker, B.P., Demetris, A.J., Drachenberg, C.B., Fogo, A.B., Furness, P., Gaber, L.W., Gibson, I.W., Glotz, D., Goldberg, J.C., Grande, J., Halloran, P.F., Hansen, H.E., Hartley, B., Hayry, P.J., Hill, C.M., Hoffman, E.O., Hunsicker, L.G., Lindblad, A.S., Yamaguchi, Y., and . (1999). The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 55, 713-723.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488.
- Raeymaekers, L. (1993). Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* 214, 582-585.
- Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnol.* 15, 115-122.
- Rastinejad, F., Polverini, P.J., and Bouck, N.P. (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56, 345-355.
- Ribeiro, S.M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M., and Murphy-Ullrich, J.E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 274, 13586-13593.
- Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275, 26765-26771.
- Riser, B.L., Cortes, P., Zhao, X., Bernstein, J., Dumler, F., and Narins, R.G. (1992). Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J. Clin. Invest* 90, 1932-1943.
- Robertson, H., Wong, W.K., Talbot, D., Burt, A.D., and Kirby, J.A. (2001). Tubulitis after renal transplantation: demonstration of an association between CD103+ T cells, transforming growth factor beta1 expression and rejection grade. *Transplantation* 71, 306-313.

-
- Rodriguez-Pena,A., Prieto,M., Duwel,A., Rivas,J.V., Eleno,N., Perez-Barriocanal,F., Arevalo,M., Smith,J.D., Vary,C.P., Bernabeu,C., and Lopez-Novoa,J.M. (2001). Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 *Suppl* 1, 34-39.
- Rosenberger,C., Heyman,S.N., Rosen,S., Shina,A., Goldfarb,M., Griethe,W., Frei,U., Reinke,P., Bachmann,S., and Eckardt,K.U. (2005). Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: evidence for a protective transcriptional response to hypoxia. *Kidney Int.* 67, 531-542.
- Rosenberger,C., Mandriota,S., Jurgensen,J.S., Wiesener,M.S., Horstrup,J.H., Frei,U., Ratcliffe,P.J., Maxwell,P.H., Bachmann,S., and Eckardt,K.U. (2002). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1721-1732.
- Rosenberger,C., Pratschke,J., Rudolph,B., Heyman,S.N., Schindler,R., Babel,N., Eckardt,K.U., Frei,U., Rosen,S., and Reinke,P. (2007). Immunohistochemical detection of hypoxia-inducible factor-1alpha in human renal allograft biopsies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 343-351.
- Roy-Chaudhury,P., Simpson,J.G., and Power,D.A. (1997). Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp. Nephrol.* 5, 55-60.
- Ruiz-Ortega,M., Largo,R., Bustos,C., Gomez-Garre,D., and Egido,J. (1997). Platelet-activating factor stimulates gene expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells: role of TGF-beta. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1266-1275.
- Ryter,S.W., Alam,J., and Choi,A.M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 86, 583-650.
- Sahai,A., Mei,C., Schrier,R.W., and Tannen,R.L. (1999). Mechanisms of chronic hypoxia-induced renal cell growth. *Kidney Int.* 56, 1277-1281.
- Sakagami,K., Takasu,S., Kawamura,T., Saito,S., Haisa,M., Oiwa,T., Kurozumi,Y., Hasuoka,H., Inagaki,M., Niguma,T., and . (1990). A comparison of University of Wisconsin and Euro-Collins' solutions for simple cold storage in non-heart-beating cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 49, 824-826.
- Salahudeen,A.K. (2004). Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F181-F187.
- Sanchez-Elsner,T., Botella,L.M., Velasco,B., Corbi,A., Attisano,L., and Bernabeu,C. (2001). Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 38527-38535.
- Sanchez-Elsner,T., Botella,L.M., Velasco,B., Langa,C., and Bernabeu,C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 43799-43808.
- Sanchez-Fructuoso,A.I., de Miguel,M.M., Prats,D., and Barrientos,A. (2003). Non-heart-beating donors: experience from the Hospital Clinico of Madrid. *J. Nephrol.* 16, 387-392.
- Sanchez-Fructuoso,A.I., Marques,M., Prats,D., Conesa,J., Calvo,N., Perez-Contin,M.J., Blazquez,J., Fernandez,C., Corral,E., Del,R.F., Nunez,J.R., and Barrientos,A. (2006). Victims of cardiac arrest occurring outside the hospital: a source of transplantable kidneys. *Ann. Intern. Med.* 145, 157-164.
- Saura,M., Zaragoza,C., Cao,W., Bao,C., Rodriguez-Puyol,M., Rodriguez-Puyol,D., and Lowenstein,C.J. (2002). Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ. Res.* 91, 806-813.
- Savill,J., Hogg,N., Ren,Y., and Haslett,C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest* 90, 1513-1522.
- Schrijvers,B.F., Flyvbjerg,A., and De Vriese,A.S. (2004). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 65, 2003-2017.

- Schuurs,T.A., Gerbens,F., van der Hoeven,J.A., Ottens,P.J., Kooi,K.A., Leuvenink,H.G., Hofstra,R.M., and Ploeg,R.J. (2004). Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. *Am. J. Transplant.* 4, 1972-1981.
- Shahbazi,M., Fryer,A.A., Pravica,V., Brogan,I.J., Ramsay,H.M., Hutchinson,I.V., and Harden,P.N. (2002). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 260-264.
- Shanley,P.F., Rosen,M.D., Brezis,M., Silva,P., Epstein,F.H., and Rosen,S. (1986). Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. *Am. J. Pathol.* 122, 462-468.
- Sharma,K. and Ziyadeh,F.N. (1993). The transforming growth factor-beta system and the kidney. *Semin. Nephrol.* 13, 116-128.
- Sharma,V.K., Bologa,R.M., Xu,G.P., Li,B., Mouradian,J., Wang,J., Serur,D., Rao,V., and Suthanthiran,M. (1996). Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 49, 1297-1303.
- Shi,Y. and Massague,J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shihab,F.S., Bennett,W.M., Isaac,J., Yi,H., and Andoh,T.F. (2002). Angiotensin II regulation of vascular endothelial growth factor and receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 62, 422-433.
- Shihab,F.S., Tanner,A.M., Shao,Y., and Weffer,M.I. (1996). Expression of TGF-beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int.* 50, 1904-1913.
- Shiraishi,F., Curtis,L.M., Truong,L., Poss,K., Visner,G.A., Madsen,K., Nick,H.S., and Agarwal,A. (2000). Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F726-F736.
- Siebert,P.D. and Larrick,J.W. (1993). PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 14, 244-249.
- Sikorski,E.M., Hock,T., Hill-Kapturczak,N., and Agarwal,A. (2004). The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286, F425-F441.
- Southard,J.H., van Gulik,T.M., Ametani,M.S., Vreugdenhil,P.K., Lindell,S.L., Pienaar,B.L., and Belzer,F.O. (1990). Important components of the UW solution. *Transplantation* 49, 251-257.
- Sporn,M.B. and Roberts,A.B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J. Cell Biol.* 119, 1017-1021.
- Spurgeon,K.R., Donohoe,D.L., and Basile,D.P. (2005). Transforming growth factor-beta in acute renal failure: receptor expression, effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 288, F568-F577.
- St Peter,S.D., Imber,C.J., and Friend,P.J. (2002). Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 359, 604-613.
- Stepkowski,S.M. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2000, 1-23.
- Sunderkotter,C., Steinbrink,K., Goebeler,M., Bhardwaj,R., and Sorg,C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 55, 410-422.
- Tacchini,L., Dansi,P., Matteucci,E., and Desiderio,M.A. (2001). Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 22, 1363-1371.
- Takada,M., Nadeau,K.C., Shaw,G.D., and Tilney,N.L. (1997). Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 64, 1520-1525.

-
- Takahashi,H. and Shibuya,M. (2005a). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 109, 227-241.
- Takahashi,H. and Shibuya,M. (2005b). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 109, 227-241.
- Tanaka,T., Miyata,T., Inagi,R., Fujita,T., and Nangaku,M. (2004). Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *Am. J. Pathol.* 165, 1979-1992.
- Thakar,C.V., Zahedi,K., Revelo,M.P., Wang,Z., Burnham,C.E., Barone,S., Bevans,S., Lentsch,A.B., Rabb,H., and Soleimani,M. (2005). Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *J. Clin. Invest* 115, 3451-3459.
- Tian,L., Stepkowski,S.M., Qu,X., Wang,M.E., Wang,M., Yu,J., and Kahan,B.D. (1997). Cytokine mRNA expression in tolerant heart allografts after immunosuppression with cyclosporine, sirolimus or brequinar. *Transpl. Immunol.* 5, 189-198.
- Tullius,S.G., Nieminen-Kelha,M., Buelow,R., Reutzel-Selke,A., Martins,P.N., Pratschke,J., Bachmann,U., Lehmann,M., Southard,D., Iyer,S., Schmidbauer,G., Sawitzki,B., Reinke,P., Neuhaus,P., and Volk,H.D. (2002). Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 74, 591-598.
- Ueda,N. and Shah,S.V. (2000). Role of endonucleases in renal tubular epithelial cell injury. *Exp. Nephrol.* 8, 8-13.
- Valentin,M., Miranda,B., De la,R.G., Martin-Escobar,E., Garrido,G., and Matesanz,R. (2005). [Renal donation and transplantation in Spain 2004]. *Nefrologia.* 25, 350-360.
- Vetterlein,F., Bludau,J., Petho-Schramm,A., and Schmidt,G. (1994). Reconstruction of blood flow distribution in the rat kidney during postischemic renal failure. *Nephron* 66, 208-214.
- Vodovotz,Y., Geiser,A.G., Chesler,L., Letterio,J.J., Campbell,A., Lucia,M.S., Sporn,M.B., and Roberts,A.B. (1996). Spontaneously increased production of nitric oxide and aberrant expression of the inducible nitric oxide synthase in vivo in the transforming growth factor beta 1 null mouse. *J. Exp. Med.* 183, 2337-2342.
- Vroemen,J.P., van,d., V, and Kootstra,G. (1983). The emergency in situ preservation of kidneys for transplantation. *Neth. J. Surg.* 35, 55-60.
- Waaga,A.M., Gasser,M., Laskowski,I., and Tilney,N.L. (2000). Mechanisms of chronic rejection. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 517-521.
- Walker,L.M., Walker,P.D., Imam,S.Z., Ali,S.F., and Mayeux,P.R. (2000). Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N(6)-(1-Iminoethyl)lysine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 417-422.
- Waller,J.R. and Nicholson,M.L. (2001). Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *Br. J. Surg.* 88, 1429-1441.
- Wang,S., Shiva,S., Poczatek,M.H., rley-Usmar,V., and Murphy-Ullrich,J.E. (2002). Nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase regulation of glucose-mediated thrombospondin 1-dependent transforming growth factor-beta activation in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 9880-9888.
- Wangsiripaisan,A., Gengaro,P.E., Nemenoff,R.A., Ling,H., Edelstein,C.L., and Schrier,R.W. (1999). Effect of nitric oxide donors on renal tubular epithelial cell-matrix adhesion. *Kidney Int.* 55, 2281-2288.
- Warnecke,C., Griethe,W., Weidemann,A., Jurgensen,J.S., Willam,C., Bachmann,S., Ivashchenko,Y., Wagner,I., Frei,U., Wiesener,M., and Eckardt,K.U. (2003). Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J.* 17, 1186-1188.
- Weber,M., Dindo,D., Demartines,N., Ambuhl,P.M., and Clavien,P.A. (2002). Kidney transplantation from donors without a heartbeat. *N. Engl. J. Med.* 347, 248-255.

- Weight,S.C., Bell,P.R., and Nicholson,M.L. (1996). Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 83, 162-170.
- Wenger,R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151-1162.
- Witzgall,R., Obermuller,N., Bolitz,U., Calvet,J.P., Cowley,B.D., Jr., Walker,C., Kriz,W., Gretz,N., and Bonventre,J.V. (1998). Kid-1 expression is high in differentiated renal proximal tubule cells and suppressed in cyst epithelia. *Am. J. Physiol* 275, F928-F937.
- Wolf,G., Butzmann,U., and Wenzel,U.O. (2003). The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93, 3-13.
- Wong,M.L. and Medrano,J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85.
- Woolf,A.S. (2004). Do kidney tubules serve an angiogenic soup? *Kidney Int.* 66, 862-863.
- Wu,K.K. (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 122-130.
- Wu,L.L., Cox,A., Roe,C.J., Dziadek,M., Cooper,M.E., and Gilbert,R.E. (1997). Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* 51, 1553-1567.
- Yachie,A., Niida,Y., Wada,T., Igarashi,N., Kaneda,H., Toma,T., Ohta,K., Kasahara,Y., and Koizumi,S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest* 103, 129-135.
- Yamamoto,T., Nakamura,T., Noble,N.A., Ruoslahti,E., and Border,W.A. (1993). Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 1814-1818.
- Yamamoto,T., Noble,N.A., Miller,D.E., and Border,W.A. (1994). Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int.* 45, 916-927.
- Yang,J. and Duerksen-Hughes,P. (1998). A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis* 19, 1117-1125.
- Yang,Z.Z. and Zou,A.P. (2001). Transcriptional regulation of heme oxygenases by HIF-1alpha in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 281, F900-F908.
- Yevdokimova,N., Wahab,N.A., and Mason,R.M. (2001). Thrombospondin-1 is the key activator of TGF-beta1 in human mesangial cells exposed to high glucose. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 703-712.
- Yoshioka,K., Takemura,T., Murakami,K., Okada,M., Hino,S., Miyamoto,H., and Maki,S. (1993). Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 68, 154-163.
- Zeisberg,M., Strutz,F., and Muller,G.A. (2001). Renal fibrosis: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 315-320.
- Zhang,H., Akman,H.O., Smith,E.L., Zhao,J., Murphy-Ullrich,J.E., and Batuman,O.A. (2003). Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* 101, 2253-2260.
- Zhao,X.M., Hu,Y., Miller,G.G., Mitchell,R.N., and Libby,P. (2001). Association of thrombospondin-1 and cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *Circulation* 103, 525-531.
- Zhong,H. and Simons,J.W. (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 523-526.
- Ziche,M., Morbidelli,L., Choudhuri,R., Zhang,H.T., Donnini,S., Granger,H.J., and Bicknell,R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest* 99, 2625-2634.

Ziyadeh, F.N. (2004). Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 *Suppl 1*, S55-S57.

