



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Medicina
Programa de Doctorado en Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

IMPACTO DE LA INFLAMACIÓN Y FIBROSIS EN LA FUNCIÓN DEL INJERTO RENAL

Tesis para optar al grado de doctor de:

Iara Karlla DaSilva Santos

Directores:

Montserrat Díaz

Elena Guillén

José Ballarín

Tutor: Salvador Benito

Servicio de Nefrología
Fundació Puigvert

Barcelona, Septiembre 2018

AUTORIZACIÓN DE DIRECTORES DE LA TESIS

Los Drs. MONTSERRAT DÍAZ-ENCARNACIÓN, ELENA GUILLÉN-GOMÉZ y JOSÉ BALLARÍN CASTÁN, en calidad de directores, y el Dr. SALVADOR BENITO VALÉS, en calidad de tutor, certifican que:

La memoria con título “**Impacto de la inflamación y fibrosis en la función del injerto renal**”, presentada por **Iara K. DaSilva Santos** para optar al grado de Doctor en Medicina, ha estado realizada bajo nuestra dirección y es apta para su defensa. Una vez finalizada, autorizamos a su presentación para ser evaluada por el tribunal correspondiente.

Para que conste a efectos oportunos, firmamos la presente en Barcelona a 05 de Septiembre de 2018.

Dra. Montserrat Díaz
Directora de la tesis

Dra. Elena Guillén
Directora de la tesis

Dr. José Ballarín
Director de la tesis

Dr. Salvador Benito
Tutor de la tesis

*A mis padres y a mi hermano,
por su amor incondicional y por comprender la ausencia.*

***“ Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.”***
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMIENTOS

Después de casi 5 años, fueron tantas las personas que pasaron por mi vida, y que de alguna manera han colaborado y participado de esta tesis, que me hace difícil agradecer a todos. Hubo mucha renuncia pero a la vez, he tenido la suerte de conocer a muchos *ángeles* que aparecieron por mi camino y me ayudaron de alguna forma a construir estas más de 100 páginas de mi vida.

Por supuesto ellos son los más importantes para mi; quiero agradecer a mis padres, **Manoel y Nair**. Painho e mainha, obrigada pelo amor incondicional e por entender a ausência. Vocês são meu estímulo diário. Sempre pagaram para mim os melhores colégios e os melhores cursos possíveis, se privaram de muitas coisas na vida para dar ao meu irmão e a mim a melhor educação. Como dizia painho “essa é a maior herança que posso deixar para vocês”. Espero que eu tenha cumprido e retribuído toda essa dedicação. A minha mainha, por me ensinar os valores do trabalho, que tudo é possível se o deseja muito y por me ensinar que um simples sorriso e umas palavras de carinho podem ajudar o próximo. Ao meu irmão **Waubert**; Binho, obrigada por estar presente, mesmo longe sempre presente, por cuidar a eles tão bem e por me substituir nos momentos de comemoração e de problemas. Que vocês saibam que esse foi o mais difícil e o maior sacrificio de tudo isso, muito mais que as noites em claro e as renunciaciones todos esos años, estar longe dos que mais amo na vida sem dúvida foi o mais duro para mim. E todas as vezes que eu duvidei se tudo isso valia a pena vocês me fizeram vê que sim.

Y todas las veces que dudé si todo eso valdría la pena, ellos me hicieron ver que SÍ!

Ni, thanks for being always with me. Life made an uncle became a brother. Brother, friend, uncle... I'm proud of you and I know the feeling is mutual. Thank you for taking care of me so much, sometimes without patience, but in the end, you always get everything I need. Always by my side, taking a plane just to my medicine graduation party and now doing the same to witness my thesis defense.

A **Brunno**, obrigada por compartilhar o inicio desse projeto, que nessa época a gente chamava sonho. Obrigada pelo seu apoio e incentivo. A sua maneira, você sempre acreditou em mim.

Debería haber comenzado agradeciendo a mis directores, quienes representan los verdaderos responsables de esta tesis, y que por ser tan diferentes si complementaron perfectamente.

A la **Dra. Montserrat Díaz**, gracias por tu generosidad en compartir conmigo tus ideas y tu línea de investigación y por darme la oportunidad de entrar en este apasionante mundo de la investigación. Gracias además por siempre haber creído en mí; aún me acuerdo nuestra conversación en el comedor de la Puigvert, cuando era R2 y muy decepcionada después de una tutoría, por que me habían dicho que no sería posible empezar el doctorado mientras hacía la residencia, y tu volviste a encender en mí la ilusión y desde este día iniciamos nuestro proyecto doctoral y nunca dudaste que yo podría lograr. Montse, gracias por todos los años de enseñanza y sobre todo por haberme ayudado a madurar como investigadora. No tienes idea de todo lo que aprendí y sigo aprendiendo de ti. Eres para mí un ejemplo de tenacidad, de valentía y de amor al trabajo.

A la **Dra. Elena Guillén**, per introduir-me en el món del laboratori, des dels càlculs de conversió i maneig de les pipetes, organització i neteja del material del laboratori, fins a la realització de diferents tècniques de laboratori, sempre amb tota la paciència del món. Elena, gràcies per tot el que m'has ensenyat d'estadística, per les teves explicacions *superorganitzades* de biologia molecular (mira que vaig intentar fer el meu quadern d'anotacions el més ordenat possible...jejeje), per la teva delicadesa i disponibilitat. Ets el regalet que la tesi m'ha donat, un dels meus angelets. Ets gran i vals molt, molt més del que imagines. Espero que la nostra amistat perduri més enllà de la tesi i, com tu mateixa em dius. "el que uneix una tesi, no ho separa res ni ningú".

A **Dr. José Ballarín**, je vous remercie pour avoir lutter pour moi, pour m'avoir accorder votre confiance et pour rendre mon chemin plus facile. Pour moi, c'est un honneur de pouvoir travailler a vos cotes et apprendre de votre enseignement. Son integrite, son humilite, sa generosite et son equilibre sont des exemples a suivre.

Al **Dr. Salvador Benito**, tutor de esta tesis, por aceptar amablemente ser el tutor de esta tesis.

No puedo dejar de agradecer, al resto de adjuntos de la familia Puigvert, a mis compañeros de DER que en la reta final se ha ajustado a la planta y las consultas para que yo pudiera tener tiempo de acabar la redacción. Al **Dr. Lluís Guirado**, por la oportunidad y por todo lo que me ha enseñado los 3 años con el equipo de trasplante, a quienes les agradezco el cuidado y la consideración con lo cual me han tratados siempre, haciéndome sentir parte del equipo.

Mi agradecimiento especial a la **Dra. Yolanda Arce**, por todas sus enseñanzas de anatomía patológica, desde la residencia (gracias por la labor que dedicas en las sesiones) hasta la gran ayuda en mi trabajo de tesis. Yolanda, gracias por tu disponibilidad y amabilidad conmigo. Mi sincero agradecimiento también a todo el

servicio de APA. Mi acuerdo las caras que poníais cuando me veíais llegando, en los días de post-guardia, llena de polvo y con las cajitas de cartulina trayendo los los bloques de parafina jejejeje. A los chicos de archivos, en especial a **Toni** y a **David**, que aunque a tope de trabajo nunca me han dicho un *no* y siempre han estado dispuestos a ayudarme.

A mis amadas chicas del laboratorio: **Chiara, Ania, Gemma, Patricia, Laura, Bea, Irene**, gracias por la paciencia con esta médico torpe, por la manera como me habéis recibido, por la alegría y el buen rollo que hay en el laboratorio, por hacerme sentir parte de vuestro equipo. En especial a Irene, por contribuir de forma activa en este proyecto. A Bea por sus buenos consejos y ayuda en estadística. A **Luz** y **Judit** por todos los coffee cuando yo estaba estresada, por el cariño y por ser así como sós. Ir al laboratorio era mi terapia semanal. Que orgullo hacer parte del chat "Puigvert_laboratorio".

A **Susa** y **Anna** por la preocupación y ánimo a diario, vuestro cariño fue fundamental. A **Jordi**, por haberme enseñado el anion gap y el delta-delta ...jaajaja...nooo, gracias por transmitir el amor por la nefrología, por enseñarme a ser crítica con la estadística, a escribir mis primeros papers, a enseñarme de verdad a hacer una bibliografía y a espabilarme con el Mendeley. Con toda seguridad, redactar esta tesis fue fruto de todo que me enseñaste con las publicaciones todos estos años.

Mi Nadiiii, mi Rmayor, mi amiga y compañera de despacho y desahogos, has sido clave fundamental de mi salud mental estos años; tu té, tu tranquilidad, tu bondad y tu buen humor diario. Gracias por estar a mi lado todos estos años y por lo apuntes de la "p" burocracia de la tesis. El *Word Tesis_Nadia* ha sido útil para todas mis amigas doctorandas ...jejeje.

A a mis coR, **Cesar Ruiz y Monica Furlano**, gracias por aguantarme durante toda la residencia y por el compañerismo incondicional, habéis hecho todo más fácil.

A mis queridas coR de Sant Pau: **Monica Sarmiento, Paula Lopez, Analia Ramos, Cris Arqueros**, fuisteis el mejor regalo que la residencia me dio, muchas de vosotras estáis en el camino de doctoranda y espero ansiosamente verlas llegar hasta aquí.

A mis residentes queridos (mis peques) que empezaron conmigo y me llenan de orgullo: **Silvia, Victor, Alejandra, Franklin y Maya**; gracias por ser un estímulo a aprender cada vez mas y poder enseñaros lo mejor y más actual.

Mi Edi, gracias por compartir todos estos años, empezamos como compañeros del pool de guardia con Juanca (los mejores compañeros de guardia que hubiera podido tener) y hemos vividos juntas tantas experiencias personales (llantos y risas), la medicina, el amor a la ciencia, y como no podía ser diferente... hemos compartido esta dura fase final de la tesis. Hubiera sido infinitamente más difícil sin ti. En estos

últimos días, fuiste mi ejemplo de resistencia y superación. **Juanca y Dani** (y Mía), gracias por acogerme cuando más necesité y volví de Londres, haciéndome sentir en casa cuando yo no tenía una. A **Cristian** por el apoyo y por todo lo bueno que traes contigo.

A **Lili y Diana**, mil gracias por el soporte en Londres. La investigación fría asociada al idioma diferente y al carácter *british* solo fue posible por el apoyo de las dos y por las comidas y cafés de desahogo en Hammersmith. Prontito seré yo la que estará viendo vuestra defensa de tesis. To **Kevin Woollard**, head of section of Renal and Vascular Inflammation, at Hammersmith Hospital, many thanks for the support and the tips that was extremely helpful.

A **Juliana**, minha versão *Bellvitgiana*, amiga obrigada pelo apoyo y por dividir conmigo um pouquinho de Sofi, y por compartilhar nossas angustias Españas/Brasil.

A mi querida **Rosaura**, por mi haber acogido como una hermana en las duras guardias del SEM en Zaragoza y por seguir haciendo parte de mi vida, siendo ejemplo de mujer en todos los colores, eres un ejemplo de mujer valiente, dedicada, trabajadora. En breve podremos celebrar nuestro doctorado!!! Me asumo al grupo, hemos llegado, hemos conseguido!!!

Mil gracias a **Ignasi Gish** por siempre encontrar una hora en su agenda tan ocupada, por ayudarme a interpretar los datos estadísticos (vaya rollo!!!). Gracias por saber que es una nefrona, un trasplante, las causas de pérdida del injerto (hay que censurar las pérdidas de injerto por suicidio?) ...jejeje.. ya eres medio nefrólogo.

Y por último, y no menos importante, quisiera agradecer a 3 personas de nuestro servicio que son ejemplo de dedicación y que hacen su trabajo de la mejor manera posible: gracias a **Nuria Viñolas** por ser extremadamente eficiente, ordenada y responsable y siempre atender nos con tanto cariño. A **Ricard Pellejero**, por todos estos años de recogida de papers de macrófagos, inflamación y fibrosis, manteniendo mi carpeta de *papers tesis* abarrotada de artículos. Y a **Silvia Mateu** por toda la ayuda con las peticiones de becas, la burocracia que no fue fácil y por la incondicional disponibilidad. Muchas gracias!!

Finalmente, seguro que me olvidé a alguien, por lo que dejo aquí expresado mi más sincero agradecimiento a todos. Este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas que han puesto su tiempo, sus conocimientos y su apoyo a mi disposición.

ABREVIACIONES

ACV	Accidente Cerebro-Vascular
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico monocatenario
APC	Del inglés, <i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula presentadora de antígeno)
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
a-SMA	Del inglés, <i>Smooth muscle actin-alfa</i> (Alfa-actina de músculo liso)
AT	Atrofia Tubular
BR	Biopsia Renal
CD	“Cluster” (cúmulo) de diferenciación
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration
COL	Colágeno
CSF	Del inglés, <i>Colony Stimulating Factor</i> (Factor estimulador de colonias)
DC	Donante Cadáver
DCE	Donante con Criterios Expandidos
DCI	Disfunción Crónica del Injerto
DEST	Donante estándar
DM	Diabetes Mellitus
DV	Donante Vivo
EGF	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
ERC	Enfermedad Renal Crónica
FG	Filtrado glomerular/Filtración glomerular
FI	Fibrosis Intersticial
FI/AT	Fibrosis Intersticial/Atrofia tubular
FGF	Del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor</i> (Factor de crecimiento fibroblástico)
FRI	Función Retrasada del Injerto
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos)
GUSB	Glucuronidasa-beta

HLA	Del inglés, <i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitario Humano)
HTA	Hipertensión arterial
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Molécula de Adhesión intercelular-1)
IFN	Interferón
IFN-γ	Interferón-gamma
iNOS	“inducible” Nitric Oxide Synthase (Sintetasa del Oxido Nítrico inducible)
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1-beta
IL-1a	Antagonista de la interleucina-1
IL4R	Receptor de la Interleucina-4
IS	Inmunosupresión
JAK	Janus Kinasas
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
LIR	Lesión de Isquemia-Reperfusión
LPS	Lipopolisacárido
LTSV	Limitación de Tratamiento de Soporte Vital
M1	Macrófagos activados por vía clásica
M2	Macrófagos activados por vía alternativa
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína quemotáctica de monocitos)
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor (Factor estimulador de colonias de macrófagos)
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
MMP	MetaloProteinasas
NCI	Nefropatía Crónica del Injerto
NCT	Nefropatía Crónica del Trasplante
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
NK	Natural Killer
NOS	Nitric Oxide Synthase (Sintetasa del Oxido Nítrico)
NTA	Necrosis Tubular Aguda
OCATT	Organització Catalana de Trasplantaments

ON	Óxido Nítrico
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
OPTN	Organ Procurement and Transplantation Network
PCR	Parada Cardio-Respiratoria
PCRq	Polymerase Chain Reaction cuantitativa (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)
RCP	Reanimación Cardio-Pulmonar
RCS	Rechazo Celular Subclínico
RR	Riesgo Relativo
SMA	Smooth Muscle Actin (Actina del músculo liso)
SMAD	Del inglés, " <i>Small</i> " Mothers Against Decantaplegic
SNS	Sistema Nacional de Salud
SR	Sirius Red
SRTN	Scientific Registry of Transplant Recipients
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCE	Traumatismo Cráneo-Encefálico
TEM	Transición Epitelio-Mesenquimal
TFG	Tasa de Filtrado Glomerular
TGF	Transforming Growth Factor (Factor de crecimiento transformante)
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta (Factor de crecimiento transformante-beta)
Th	T helper (T cooperador)
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (Inhibidor Tisular of Metaloproteinases)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alfa (Factor de necrosis tumoral-alfa)
TR	Trasplante Renal
TRS	Terapia/Tratamiento Renal Sustitutivo
UNOS	United Network for Organ Sharing

INDICE

I. RESUMEN.....	17
II. INTRODUCCIÓN.....	23
1. Trasplante renal	25
1.1 Historia del trasplante renal.....	26
1.2. Tipos de Trasplante Renal	26
1.2.1. <i>Trasplante de donante vivo.....</i>	<i>26</i>
1.2.2. <i>Trasplante de donante cadáver</i>	<i>27</i>
1.3 Supervivencia del trasplante renal	28
1.3.1. <i>Factores de supervivencia pre-trasplante.....</i>	<i>29</i>
1.3.2 <i>Factores de supervivencia post-trasplante.....</i>	<i>31</i>
2. Biopsia renal en el trasplante.....	34
2.1. Biopsia del donante (pre-implantacional o basal).....	34
2.2. Biopsias del receptor (biopsias clínicas).....	36
2.3. Biopsias de protocolo	36
2.4. Cambios anatomopatológicos y valor pronóstico.....	37
2.4.1 <i>Infiltrado inflamatorio intersticial:.....</i>	<i>38</i>
2.4.2 <i>Tubulitis.....</i>	<i>38</i>
2.4.3 <i>Arteritis intimal.....</i>	<i>39</i>
2.4.4 <i>Glomerulitis y/o capilaritis peritubular.....</i>	<i>39</i>
2.4.5. <i>Necrosis tubular aguda.....</i>	<i>39</i>
2.4.6. <i>Fibrosis intersticial y atrofia tubular</i>	<i>39</i>
2.5. Clasificación de Banff para la patología del trasplante	42
3. Inflamación	43
3.1 Inflamación aguda.....	43
3.2 Inflamación crónica	45
3.3 Reparación	45
3.4 Inflamación y Donante Renal: LIR.....	46
3.5. Citoquinas pro-inflamatorias	47
3.5.1 <i>Interferón-gamma (IFN-γ).....</i>	<i>47</i>
3.5.2 <i>Interleucina-1 y factor de necrosis tumoral alfa.....</i>	<i>48</i>
4. Fibrosis.....	48

4.1 Transición Epitelio-Mesenquimal	49
4.2 Fibrogénesis: Síntesis y degradación de la matriz extracelular	51
5. Macrófagos	54
5.1 Origen de los macrófagos	54
5.2 Función de los macrófagos	55
5.3. Activación de los macrófagos	55
5.3.1. Activación clásica de los macrófagos (M1)	58
5.3.2 Activación alternativa de los macrófagos (M2)	59
5.4. El papel de los macrófagos en la inflamación del injerto renal	64
5.5. El papel de los macrófagos en la fibrosis del injerto renal	65
III. HIPÓTESIS.....	67
IV. OBJETIVOS.....	71
V. MÉTODOS.....	75
6. Diseño del estudio	77
6.1. Pacientes	77
6.1.1. Criterios de inclusión:	77
6.1.2. Criterios de exclusión:	77
6.1.3. Variables clínicas	78
6.1.4. Terapia inmunosupresora	78
6.2. Muestras	78
6.2.1. Muestras de biopsias renales	78
6.2.2 Muestras para el análisis clínico	80
7. Biopsia renal.....	80
7.1. Escala de Remuzzi	80
7.2. Clasificación de Banff	81
7.3. Tinción inmunohistoquímica para CD68	81
7.3.1 Procedimiento de tinción	81
7.3.2. Análisis de imágenes	82
7.4. Análisis de la expresión de ARNm	82
7.4.1. Extracción de ARN	82
7.4.2. Síntesis de ADNc (Retrotranscripción)	83
7.4.3. PCR a tiempo real	83
8. Análisis estadístico	84

9. Aspectos éticos.....	85
VI. RESULTADOS.....	87
10. Características basales de los donantes y receptores	89
11. Histopatología	91
12. Expresión génica de proteínas proinflamatorias	93
12.1. Inflamación en biopsias renales de donantes.....	93
12.2. Inflamación en biopsias renales de protocolo.....	93
12.3. Correlación entre la expresión génica de proteínas pro-inflamatorias y la función renal a medio y largo plazo.....	95
13. Infiltrado de macrófagos.....	97
13.1. Correlación entre el infiltrado de macrófagos y la función renal a medio y largo plazo	98
14. Expresión génica de proteínas pro-fibróticas	99
14.1. Fibrosis en biopsias renales de donantes.....	99
14.2. Fibrosis en biopsias renales de protocolo.....	100
14.3. Correlación entre la expresión génica de proteínas pro-fibróticas y la función renal a medio y largo plazo.....	103
15. Correlación entre las variables clínicas con la función renal a largo plazo en el donantes cadáver	105
16. Supervivencia renal	107
VII. DISCUSIÓN.....	113
VIII. CONCLUSIONES.....	125
IX. LÍNEAS DE FUTURO.....	129
X. BIBLIOGRAFÍA.....	133
XI. ANEXOS.....	163

I. RESUMEN

RESUMEN

A pesar de los grandes avances en el campo del trasplante renal (TR), los resultados a largo plazo aún no son óptimos. Varios estudios han demostrado que diversos factores como la inflamación precoz y/o la presencia de fibrosis intersticial (FI) están asociados a un peor pronóstico del injerto, pero todavía se trata de un tema controvertido. En este estudio analizamos el estado inflamatorio (Banff, macrófagos CD68+, fenotipos de macrófagos M1-M2) y la expresión génica de múltiples factores relacionados con la inflamación y FI (TGF- β_1 , metaloproteinasas, proteínas de matriz extracelular, entre otros) en injertos procedentes de donantes cadáver (DC) y los comparamos con un grupo control de donantes vivos (DV). Así mismo analizamos la potencial asociación de estos factores, ya desde antes de la implantación, con diversas variables clínicas y con la función renal a medio-largo plazo. Entre otros hallazgos, confirmamos que los órganos procedentes de DC presentan un mayor infiltrado intersticial de macrófagos CD68+ y describimos que tanto la expresión génica de varias proteínas pro-inflamatorias como pro-fibróticas se encuentran significativamente incrementadas en los DC incluso antes de la implantación. También observamos un aumento en la expresión génica de proteínas que promueven la infiltración leucocitaria, especialmente macrófagos, en el tejido (MCP-1, ICAM-1), así como de mediadores de inflamación como TNF α , IL1 β . También se observó un aumento en la expresión génica de receptores de membrana de los macrófagos que les confiere el fenotipo inflamatorio (M1) así como el antiinflamatorio (M2). En los DC también se observó un aumento significativo de los precursores y mediadores de FI. Es de destacar que muchos de estos parámetros (inflamatorios y pro-fibróticos) se asociaron a la función renal estimada (MDRD) en distintos tiempos de seguimiento. El análisis multivariante (regresión lineal múltiple) mostró que tanto la función retrasada del injerto como la expresión génica de TGF- β_1 a los cuatro meses fueron predictores independientes de la función del injerto del último control (media 5.8 ± 1.0 años). En conclusión, confirmamos la estrecha interconexión entre inflamación y fibrosis especialmente en el TR de DC, que ésta se inicia ya antes de la implantación y persiste post-TR y que estos factores muy precoces (potencialmente tratables) pueden determinar el pronóstico del injerto a largo plazo.

ABSTRACT

Despite great achievements in the field of renal transplantation (RT), long-term results are still not optimal. Several studies have shown that various factors such as early inflammation and/or the presence of interstitial fibrosis (IF) are associated with a worse graft prognosis, but this issue is still controversial and far from being resolved. In this study, we analyzed the inflammatory state (Banff, CD68 + macrophages, M1-M2 phenotypes, among others) and the gene expression of multiple factors related to both inflammation and IF (TGF- β 1, metalloproteinases, extracellular matrix proteins, among others) in grafts from cadaveric donors (CD) and they were compared with a control group from living donors (LD). We also analyzed the potential association of all these factors with several clinical variables with medium and/or long-term renal function. Among other findings, we confirm that organs from CD have a greater CD68+ macrophage infiltration and we describe that the expression of several proinflammatory and profibrotic molecules is significantly increased in CD even before grafting. We also observed an increased gene expression of proteins related to graft leukocyte infiltration, mainly macrophages, such as MCP-1 or ICAM-1, as well as of inflammatory mediators such as TNF α or IL1 β . We also observed an increased gene expression of macrophage membrane cell receptors related to their inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype. Finally, we described a significant increase of IF precursors and mediators in CD. It is noteworthy that multiple parameters (both inflammatory and profibrotic) were associated with the estimated glomerular filtration rate (MDRD) at different times. Multiple regression analysis revealed that delayed renal function as well as graft TGF- β 1 gene expression four months after RT were independent predictors of the last renal function control during follow-up (5.8 ± 1.0 years). In conclusion, we confirm the existence of an especially close interconnection between inflammation and fibrosis, especially in the CD RT setting, starting before engraftment and progressing after RT, and that these very early (potentially treatable) factors may already devise its long-term graft prognosis.

II. INTRODUCCIÓN

1. Trasplante renal

La lesión inicial al riñón nativo puede tener un amplio abanico de manifestaciones clínicas, que van desde la hematuria asintomática a una insuficiencia renal terminal. Muchos pacientes se recuperan completamente de esa lesión inicial aunque algunos de ellos posteriormente pueden sufrir grados de secuela distintos y a la larga podrían desarrollar una enfermedad renal progresiva.

La enfermedad renal crónica (ERC) se define por la presencia de “daño renal” y/o la presencia de pérdida progresiva e irreversible de la función renal, cuyo grado de afectación se determina con una tasa de filtrado glomerular (TFG) < 60 ml/min/1,73m². La disminución de la TFG permite su clasificación en estadios que reflejan la pérdida progresiva (por 3 meses o más) de las múltiples funciones del riñón y que, en último término, pueden condicionar la necesidad de iniciar terapia renal sustitutiva (TRS) (1). La ERC es un problema de salud pública que afecta aproximadamente al 10% de la población mundial, siendo la prevalencia en España en torno al 11% de la población adulta (2–4) y aunque la mayoría de veces es asintomática hasta estadios terminales, se asocia a un incremento exponencial de la mortalidad - fundamentalmente cardiovascular - desde el inicio de la enfermedad renal y que continua empeorando a pesar de la TRS (5–7).

Un paciente que requiere TRS tiene ante sí tres posibilidades de tratamiento: hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante renal (TR). En los últimos 20 años, el TR se ha posicionado como el tratamiento de elección para la mayoría de pacientes con ERC terminal en cuanto a supervivencia, mejor calidad de vida, menores complicaciones y mejor relación coste-beneficio frente a la diálisis (8)(9). Hay una evidencia acumulada de que la supervivencia con un riñón trasplantado excede a la supervivencia en diálisis tanto en estudios realizados en Europa como en series de Estados Unidos (10–14).

1.1 Historia del trasplante renal

El primer TR exitoso fue realizado en Boston en el año 1954 con los Dres. Hatwell Harrison y Joseph Murray, haciendo el primer trasplante entre gemelos univitelinos (15,16). A mediados de la década de los sesenta se hicieron los primeros trasplantes en España iniciados en 1965 por el Dr. Gil Vernet en el Hospital Clínico de Barcelona, con el Dr. Antonio Caralps como nefrólogo (17). La experiencia acumulada, la aparición de nuevos fármacos inmunosupresores y el avance de técnicas quirúrgicas han hecho que el trasplante de órganos pase a ser una terapia consolidada con excelentes resultados en todo el mundo. Sin embargo, a pesar del éxito global del trasplante, todavía existen muchos problemas por resolver en este campo: la mortalidad de los pacientes sigue siendo elevada, los tratamientos inmunosupresores tienen numerosos efectos secundarios que limitan la calidad de vida de los receptores, y es de destacar que un gran número de injertos se pierden a medio y largo plazo por la presencia de la llamada “disfunción crónica del injerto” (DCI), cuya fisiopatología es extremadamente compleja. Además, la aplicabilidad del TR viene limitada por la escasa disponibilidad de riñones en relación a la demanda creciente de pacientes que lo necesitan. Este desequilibrio entre pacientes en lista de espera de trasplante renal y la disponibilidad de riñones de cadáver aumenta cada año.

1.2. Tipos de Trasplante Renal

Según el origen del donante se distinguen dos tipos: trasplante de donante vivo (DV) y de donante cadáver (DC).

1.2.1. Trasplante de donante vivo

El insuficiente número de DC para atender las necesidades de las listas de espera y la escasa oferta de riñones de donantes jóvenes, ha llevado en los últimos años a que la comunidad trasplantadora, con el apoyo de la ONT y la Comisión de Trasplantes de Consejo Interterritorial del SNS, esté impulsando el desarrollo de programas de trasplante de DV, pues se considera la mejor opción terapéutica para la ERC terminal debido, entre otros, a la mayor supervivencia del injerto. Eso se debe fundamentalmente a la estabilidad hemodinámica del donante, al uso de órganos obtenidos en condiciones óptimas con una cirugía programada y un tiempo de isquemia fría corto, la

optimización de la inmunosupresión y finalmente, la posibilidad de realizar el trasplante anticipado (sin necesidad de diálisis previa) (18–22).

1.2.2. Trasplante de donante cadáver

Donantes en muerte encefálica

Los donantes en muerte encefálica son pacientes que han sufrido algún tipo de daño neurológico agudo y que son diagnosticados de muerte cerebral pero sus órganos funcionan de manera correcta. La principal ventaja que tiene este tipo de donante es que habiendo fallecido el individuo, gracias a la ventilación mecánica y a que el corazón está latiendo, se mantiene la perfusión de los órganos hasta el acto quirúrgico de la extracción, evitándose la isquemia caliente (23).

La donación por muerte encefálica es aún la principal fuente de órganos para trasplante. Sin embargo, apenas representa el 3% de los fallecidos en un hospital, y la mitad no llegan a ser donantes efectivos debido a que son excluidos por contraindicaciones médicas o por negativa familiar la donación (24).

Donantes en asistolia

La reducción de la mortalidad más frecuente para la donación de órganos (mortalidad por tráfico y por enfermedad cerebrovascular), unida a la mejoría en la atención al paciente crítico en general y neurocrítico en particular, está condicionando un descenso progresivo de la donación en muerte encefálica en España. De lo anterior se deriva la necesidad de desarrollar fuentes de órganos alternativas como la donación en asistolia (controlada o no) (25).

La donación en asistolia no controlada o donación tipo II de la Clasificación de Maastricht modificada de Madrid se plantea en personas que han sufrido una parada cardio-respiratoria y a las que se les ha aplicado maniobras de reanimación cardiopulmonar sin éxito, siempre que se cumplan una serie de requisitos como: edad menor a 55 años y tiempo desde la parada cardio-respiratoria hasta inicio del Soporte Vital Avanzado (tiempo de parada) menor de 15 minutos (26).

La donación en asistolia controlada o donación tipo III de la *Clasificación de Maastricht modificada de Madrid* hace referencia a la donación de órganos que

procedente de personas fallecidas por criterios circulatorios y respiratorios tras una limitación de tratamiento de soporte vital (25).

Donantes con criterios expandidos

Se definió donantes con criterios expandidos (DCE) a los donantes mayores de 60 años y a los donantes entre 50 y 60 años con al menos 2 factores de riesgo asociados: HTA, creatinina mayor que 1,5mg/dL y/o fallecimiento por accidente cerebro vascular (ACV) de origen isquémico (27).

Consecuentemente, durante las últimas décadas se ha producido un aumento progresivo en la edad de los donantes. Según datos de la ONT, en el año 2014 más del 50% de los DC tenían una edad superior a 60 años y más de un 25% tenían una edad superior a los 70 años (28).

1.3 Supervivencia del trasplante renal

Las causas principales de pérdida del injerto son la muerte del paciente con injerto funcionando (40%) y la denominada DCI (25%). La muerte de causa cardiovascular es la principal causa de fallecimiento en la población trasplantada siendo responsable por un 32% de los pacientes que fallecen con injerto normofuncionante (29).

La supervivencia del TR es actualmente de un 90-95% al primer año, y aproximadamente un 80% a los 5 años y 50% a los 10 años en el caso de DC. Los resultados son aún mejores para los riñones de DV, siendo casi del 100% al año, 90% a los 5 años y 50% a los 17 años, por lo menos cuando se utilizan donantes genéticamente relacionados (30)(31). En Cataluña, los datos del Registro de la Organización Catalana de Trasplantes (OCATT) revelaron una gran mejoría de la supervivencia del injerto entre 1984-1989 y 2002-2009, a corto y medio plazo. La supervivencia al año aumentó de 78.1% a 89.4%, mientras que la supervivencia a los 5 años aumentó del 58.1% al 76.7% (32).

Los resultados del TR a largo plazo han mejorado con el tiempo, y la vida media de los injertos y pacientes ha aumentado significativamente desde la década de los ochenta. Sin embargo, durante los últimos años, se ha frenado esta clara tendencia positiva probablemente debido a que se ha producido un cambio en las características demográficas y la comorbilidad de los donantes y receptores (33,34). Por otra parte, se han introducido en la práctica clínica nuevos fármacos inmunosupresores que han permitido reducir la tasa de

episodios de rechazo agudo y que han permitido mejorar la progresión de la función del injerto, así como avances farmacológicos que probablemente disminuyen el riesgo cardiovascular de estos pacientes (antihipertensivos, estatinas, etc) (34).

Sin embargo, para seguir progresando es preciso conocer y anticiparse a las causas de pérdida del injerto, para lo que es necesario también conocer los factores clínicos que predicen la supervivencia del injerto a largo plazo. Por ello describimos brevemente esta asociación con diversos factores *pre*-trasplante (dependientes del *donante* y/o del *receptor*) y factores o acontecimientos clínicos *post*-trasplante.

1.3.1. Factores de supervivencia pre-trasplante

Es bien conocido que diversos factores clínicos relacionados con el *donante* y/o el *receptor* se asocian a la supervivencia del trasplante.

Factores relacionados con el donante

La edad del donante es uno de los principales y más importantes factores pre-trasplante que influyen en la supervivencia del injerto a corto y largo plazo. La edad mayor de 60 años se ha relacionado con más incidencia de función retrasada del injerto (FRI), y esto es más evidente si se asocian otras comorbilidades del propio donante, como hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), o arterioesclerosis (35,36). Además, estos riñones añosos van a ser más sensibles al daño derivado de un tiempo de isquemia fría prolongado, y a las lesiones relacionadas con los factores dependientes del receptor o los acontecimientos *post*-trasplante (37–39).

Como hemos comentado, más del 90% de la actividad trasplantadora en España se realiza a partir del DC, pero las experiencias publicadas sobre el TR de DV en hospitales españoles y los resultados de las grandes series de países con gran experiencia muestran una mayor supervivencia de este trasplante frente al de cadáver, implicándose tanto factores quirúrgicos, al tratarse de una cirugía programada, así como períodos de isquemia fría mínimos que influyen en la LIR. Además, estos donante están sanos y no han sido sometidos al daño que puede producir los fenómenos hemodinámicos e inflamatorios que se producen en el momento del fallecimiento (31)(40). Por otra parte, cuando se compararon los tipos de donante cadáver, se ha visto

que los DCE tienen peor supervivencia a medio y largo plazo, tanto en receptores jóvenes como mayores. Asimismo, los resultados de supervivencia son mejores cuando se acorta el tiempo de isquemia fría (41). Por otro lado, se ha demostrado que, a pesar de obtenerse peores resultados con este tipo de donantes, la supervivencia es mejor que en diálisis (8,42). Incluso, numerosos artículos que han comparado los trasplantes en asistolia con aquellos en muerte encefálica han demostrado similar supervivencia del injerto a corto y medio plazo.

Para analizar cómo las distintas causas de muerte encefálica podían influir en el pronóstico de estos injertos se tomaron los datos del registro OPTN/UNOS americano con más de 80.000 pacientes trasplantados con muerte encefálica. En general, los donantes con traumatismo craneoencefálico (TCE) fueron más jóvenes y los de ACV fueron mayores y con más factores de riesgo vascular. Respecto a la categoría de referencia (TCE), el AVC y la anoxia cerebral estuvieron relacionadas con un mayor riesgo de pérdida de injerto (43).

Factores relacionados con el receptor

Numerosos factores pre-trasplante relacionados con el receptor inciden en la supervivencia del injerto, tales como la edad, las comorbilidades cardiovasculares e infecciosas, el tiempo de permanencia en diálisis y la histocompatibilidad del complejo mayor HLA.

En los últimos años se ha observado un aumento del número de trasplantes en receptores mayores de 60 años en relación al grupo de edad más jóvenes, debido a la mejor evaluación de estos receptores para su inclusión en la lista de espera y por el uso creciente de DCE. La edad mayor de 60 años del receptor tiene un impacto negativo en la supervivencia del injerto debido a las comorbilidades asociadas a ese grupo de pacientes (44).

En cuanto a los factores relacionados con la diálisis, está claramente demostrado que el TR anticipado en el DV mejora la supervivencia del injerto y se asocia a una menor FRI (18,20). También la duración del tiempo de permanencia en diálisis previo al TR tiene una influencia negativa en la supervivencia del injerto a partir del sexto mes de duración, dado que con el

tiempo disminuye la función renal residual y empeora progresivamente la comorbilidad (45,46).

La sensibilización pre-trasplante del receptor (presencia anticuerpos preformados) se asocia a un mayor riesgo de DCI por rechazo crónico y también juega un papel importante en la supervivencia del injerto. Varios análisis previos del registro UNOS (acrónimo de United Network for Organ Sharing) asocian positivamente los niveles de panel reactivo de anticuerpos (PRA) a una mayor incidencia de rechazo agudo y a una peor supervivencia del injerto (47,48).

Por último, es necesario destacar que el trasplante de un órgano entre un donante y un receptor implica siempre un periodo más o menos largo de isquemia desde el pinzamiento de los vasos sanguíneos del órgano en el donante hasta la revascularización del mismo en el receptor. La privación de oxígeno y metabolitos a un órgano tiene siempre unas consecuencias negativas en el funcionalismo posterior del mismo se conoce como lesión de isquemia-reperfusión (LIR). El grado de afectación de LIR puede condicionar desde una disfunción inicial leve del injerto trasplantado hasta, en mayor grado, una FRI o una disfunción que condicione una limitación de la supervivencia del injerto (49).

1.3.2 Factores de supervivencia post-trasplante

Función retrasada del injerto

El término FRI describe la disfunción del injerto renal en el período post-trasplante inmediato. La definición concreta más utilizada es la necesidad de diálisis en la primera semana tras el TR (50). La FRI tiene un origen multifactorial y el tratamiento va a variar en función de la causa. Las maniobras de extracción renal, la cirugía de banco y cirugía del trasplante, contribuyen al daño renal y al riesgo de presentar FRI (51). Además los procesos obstructivos de las vías urinarias y las oclusiones vasculares también pueden ser causas de FRI. Sin embargo, la necrosis tubular aguda (NTA) de origen isquémico es la principal causa, seguida del rechazo agudo y la nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina y/o por inhibidores de m-TOR (por las siglas en inglés “mammalian Target Of Rapamycin”). La edad del donante es otro factor de

riesgo importante para el desarrollo de la FRI, datos del Registro americano de trasplante (US Scientific Renal Transplant Registry) mostraron que el riesgo de FRI era el doble en receptores de donantes mayores de 55 años (52).

La incidencia global de FRI es de 10-15% presentando una amplia variabilidad en función del tipo de donante empleado (51); siendo la incidencia más elevada en donante de asistolia tipo II (> 80%) y tipo III (35-50%) así como en DCE (32%) (53).

Por otra parte, los riñones procedentes de DV presentan un menor riesgo de presentar FRI que los procedentes de DC, con una incidencia < 10% (54,55).

En la mayor parte de los estudios publicados se concluye que la FRI presenta un efecto negativo en la supervivencia del injerto a corto (50,56–58) y a largo plazo (51,59).

Factores inmunológicos

Tradicionalmente, la histocompatibilidad HLA es el principal lastre para el éxito del TR, no solo a corto sino también a largo plazo. Los grandes esfuerzos realizados en inicialmente para controlar la respuesta inmune frente al injerto es lo que ha ayudado a mejorar su supervivencia. A largo plazo, la compatibilidad HLA-DR se ha descrito como un factor de protección para la supervivencia del injerto (29).

Inmunosupresores

El principal objetivo del TR es conseguir la mejor función renal posible durante el mayor período de tiempo posible. En paralelo a la evolución del TR, a lo largo de los años se han ido desarrollando distintas familias de inmunosupresores y, combinación de estos, simultánea o secuencial. Sin embargo, la mejoría paulatina de la inmunosupresión se ha traducido en una mejoría de la supervivencia del injerto censurada a los 5 años, no existiendo diferencias tan ostensibles en la última década (29). Por otra parte, estos indudables beneficios de los inmunosupresores se encuentra contrabalanceado en parte por la nefrotoxicidad (aguda y crónica) de algunos de ellos.

Disfunción crónica del injerto

La DCI es un término altamente inespecífico que se podría definir como pérdida lenta y progresiva de la función renal. Es decir, se trata de un concepto

clínico, independientemente de los sustratos histológicos que se puedan encontrar en la biopsia renal y de la causa que los origine (inmunológica o no). La DCI influye de forma significativa en la incidencia de la ERC terminal y contribuye a la pérdida anual de un 3-5% de injertos. Si bien es una causa poco frecuente de pérdida de injerto en el primer año (< 10%), con el tiempo va aumentando su frecuencia, y supera el 30% como causa a los 2 años. En muchas ocasiones esta alteración se acompaña de proteinuria, que puede alcanzar el rango nefrótico y de HTA (60,61).

Es importante resaltar que clásicamente el rechazo *agudo* es el mejor predictor de DCI. El número de episodios y la gravedad, así como los rechazos tardíos son factores que se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar DCI (62,63). Por otro lado, en algunos estudios se ha descrito que el rechazo agudo precoz y en el que, tras el tratamiento, se normaliza la función renal no parece favorecer el desarrollo de DCI (64,65).

Entre los factores no inmunológicos estarían las características mencionadas del donante a los que se sumaría el estado clínico del receptor (HTA no controlada, tabaquismo, dislipemia), la recurrencia de la enfermedad de base y otras enfermedades que suelen afectar a riñones nativos (nefropatía obstructiva, infecciones, HTA), así como la glomerulonefritis de novo. Los fármacos inhibidores de la calcineurina (ciclosporina-A/tacrolimus), debido a su efecto nefrotóxico, también son un factor que contribuye a la DCI. La nefropatía por virus BK es una causa emergente en los últimos años de DCI y se relaciona específicamente con la intensidad de la inmunosupresión (60,61,66,67).

La lesión anatomopatológica característica de la DCI es similar, independientemente de la causa que produzca la lesión inicial. El efecto de las distintas citoquinas y factores de crecimiento favorece la proliferación de la matriz extracelular (MEC), el remodelado y la aparición y/o progresión de fibrosis. Los hallazgos en las biopsias de pacientes con DCI muestran fibrosis intersticial y atrofia tubular (FI/AT), hiperplasia vascular y/o esclerosis glomerular, que no son más que la expresión inespecífica de mecanismos comunes de “reparación” a las agresiones sobre el injerto. Su gravedad varía en función del número de factores lesivos, la repetición en el tiempo y la capacidad de reparación del riñón trasplantado (61,68).

2. Biopsia renal en el trasplante

La biopsia renal continúa siendo el método diagnóstico por excelencia de la patología del injerto renal (69). La actitud respecto a la indicación de la biopsia ha sido cada vez más proactiva y sus indicaciones son diferentes en función del momento del trasplante. Las biopsias del injerto se practican guiadas por ecografía con tasas muy bajas de complicaciones (70–73). Las series europeas y americanas que han publicado su experiencia cifran las complicaciones mayores en un 1,2-6% (74,75).

Los principales valores de la biopsia renal en el TR residen en su capacidad para: a) analizar la patología previa existente en los riñones de DCE; b) distinguir entre las distintas causas de FRI (NTA, rechazo, nefrotoxicidad aguda, etc); c) distinguir la situación de rechazo agudo y crónico sobre la base de los criterios establecidos en las sucesivas conferencias de Banff; d) permitir la detección de los depósitos de C4d; e) identificar las lesiones propias de la nefrotoxicidad inducida por anticalcineurínicos y demás fármacos inmunosupresores; f) diagnosticar glomerulopatías *de novo*, recidivas de la enfermedad glomerular recurrente y nefropatías asociadas a infecciones, etc (76).

2.1. Biopsia del donante (pre-implantacional o basal)

Aunque no son realizadas sistemáticamente por motivo diversos, múltiples estudios han demostrado que la presencia de lesiones preexistentes en la biopsia del donante se asocia a la presencia de posterior rechazo agudo, a una peor función renal, al desarrollo de lesiones posteriores y a una supervivencia reducida del injerto (77–85). Incluso, se ha podido demostrar en varios estudios que las lesiones glomerulares, tubulointersticiales y vasculares en la biopsia pre-implantacionales, representan uno de los principales factores dependientes del donante que pueden condicionar la evolución del injerto renal (85,86).

El interés por la realización de biopsias en el donante se ha incrementado significativamente durante los últimos años de forma paralela al mayor uso de órganos marginales provenientes de DCE. La práctica de la biopsia a estos

donantes subóptimos tiene como objetivo evaluar la viabilidad de los órganos y ayudar a indicar adecuadamente a qué receptores deberán ser implantados (87). Sin embargo, no existe evidencia suficiente de que la biopsia pre-implantacional sea realmente imprescindible para seleccionar o descartar un riñón para su posible implante (88). Por otra parte, no hay que olvidar que la obtención de una muestra en tiempo cero (basal), incluso en donantes óptimos, es de gran ayuda para el patólogo para la correcta interpretación de lesiones posteriores que puedan presentarse en el receptor (89).

En 1999, Remuzzi y cols. (90) publicaron el primer estudio prospectivo que evaluaba el uso de una escala *cuantitativa* basada en la biopsia pre-implantacional para aceptar o descartar injertos de DCE y valorar su pronóstico tras el trasplante. Esta escala de Remuzzi evalúa las lesiones de las diferentes estructuras renales (glomérulo, túbulo, intersticio y vasos) y a cada estructura se le asigna una puntuación de 1 a 3, según el grado de lesión (0 = normal; 3 = lesión grave). La suma de las puntuaciones individuales determinará el grado de lesión histológica del injerto, con un máximo de puntuación de 12. De este modo, según la cuantificación de la puntuación se trasplanta un solo injerto (score menor o igual a 4), se trasplanta doble injerto (score entre 5 y 6) y se desestiman aquellos injertos con una puntuación muy elevada (mayores de 6). En dicho trabajo, los autores observaron que la supervivencia a largo plazo de los injertos seleccionados mediante esta escala fue significativamente superior en comparación con una cohorte de pacientes a los que también se habían implantado injertos de donantes mayores de 60 años aunque sin valoración histológica previa (91).

Por último mencionar que también se considera conveniente contar con una biopsia del donante (estándar o expandido) en todos los ensayos clínicos y de investigación que incluyan biopsias de protocolo para obtener datos comparativos de valor pronóstico (92).

La biopsia pre-implantacional puede obtenerse mediante biopsia cortical en cuña o punción con aguja gruesa, pero en la bibliografía no hay acuerdo acerca de cuál sería el mejor procedimiento (76).

2.2. Biopsias del receptor (biopsias clínicas)

El examen histológico de la biopsia renal sigue constituyendo a día de hoy el método por excelencia para la identificación diagnóstica de la patología del injerto. Su utilidad se refleja en que más del 70% de las indicaciones de biopsias en pacientes trasplantados renales en nuestro país se realizan por motivos diagnósticos (89).

Aunque el valor pronóstico de la biopsia renal post-trasplante está, en gran parte, subrogado a su capacidad para establecer un diagnóstico preciso, deriva en el diagnóstico de una entidad clinicopatológica concreta, sino que se sustituye por un diagnóstico descriptivo que incluye una larga lista de las lesiones más relevantes (FIAT, glomerulitis, vasculitis aislada, capilaritis, arteriopatía hialina, elastosis miointimal, etc.) (93).

2.3. Biopsias de protocolo

Las biopsias de protocolo en el trasplante renal son aquellas realizadas en momentos predeterminados post-trasplante, independientemente de la función renal. Durante mucho tiempo las biopsias de protocolo fueron consideradas “antiéticas”, sin embargo, en la última década, cada vez más centros trasplantadores (incluyendo el nuestro) realizan este tipo de biopsias. Estas biopsias han sido útiles para estudiar la historia natural del riñón trasplantado, monitorizar el estado del injerto (especialmente en pacientes de alto riesgo) y valorar su impacto en el pronóstico (61,94). Las biopsias de protocolo son útiles para investigar la existencia de lesiones subclínicas y el reconocimiento precoz de cambios histológicos que puedan favorecer la optimización de la inmunosupresión y/o en una potencial mejoría de la supervivencia del injerto. Por otro lado, la identificación de una histología normal en estas biopsias, puede informarnos sobre la seguridad de reducción de la inmunosupresión o el uso de nuevos inmunosupresores menos tóxicos (95–97).

Los primeros estudios con biopsias de protocolo se realizaron a finales de los años 70 y principios de los 80 con el objetivo principal de valorar si los episodios de rechazo agudo se podrían predecir por lesiones histológicas que aparecieran antes del deterioro de la función renal o aparición de proteinuria así como también evaluar si los injertos estables tenían una histología normal (98).

Posteriormente, el interés se desplazó rápidamente al estudio de las lesiones crónicas. Por ejemplo, en la década de 90, Serón y cols. describieron la prevalencia de Nefropatía crónica del injerto (NCI) en un 42% en biopsias de protocolo (70). La introducción de los criterios de Banff facilitó el uso de un sistema de clasificación común para la patología del aloinjerto renal que también se aplicó a los estudios de biopsias de protocolo (99). Aún durante los años 90, Rush y cols. introdujeron el término rechazo celular subclínico (RCS) para referirse a injertos estables que mostraban un infiltrado intersticial y tubulitis en la biopsia, definiendo RCS como la presencia de un aumento menor de 10% de la creatinina plasmática asociada a lesiones histológicas de rechazo agudo según la clasificación de Banff (100). En estudios de biopsias de protocolo, se ha demostrado que la prevalencia de RCS es máxima durante los tres primeros meses (29%), disminuye progresivamente hasta el primer año post-trasplante, y persiste en un pequeño número de pacientes después del primer año (101). La presencia de RCS en biopsias de protocolo ha sido consistentemente asociada a la progresión de FI/AT apoyando que la inflamación intersticial persistente es perjudicial para el aloinjerto y la FI/AT están relacionadas y son perjudiciales para el aloinjerto (102–105). De hecho, hoy en día existe evidencia de que las biopsias de protocolo constituyen una medida subordinada de la supervivencia del injerto (95).

Más recientemente se ha demostrado también que las biopsias de protocolo permiten también el diagnóstico precoz del rechazo mediado por anticuerpos, la recurrencia de la enfermedad primaria, las glomerulonefritis *de novo* o la nefropatía por polioma en pacientes que no presentan proteinuria significativa ni deterioro de la función renal (106).

Finalmente, como en el proyecto de esta tesis, las biopsias de protocolo podrían ser una herramienta valiosa para futuros estudios que evalúen a distintos niveles mecanismos de lesión que podrían ayudar en el futuro a diseñar estrategias terapéuticas para mejorar la supervivencia a largo plazo del injerto

2.4. Cambios anatomopatológicos y valor pronóstico

En las primeras publicaciones sobre biopsias de donantes se vió que las lesiones glomerulares fueron las que mejor se correlacionaban con la

supervivencia del injerto (107). En estudios posteriores se ha establecido que las lesiones vasculares y tubulointersticiales crónicas también presentaban un importante significado pronóstico (108).

Hace más de diez años, Nankivell y cols. demostraron una dinámica temporal en el curso de lesiones histológicas en muestras de biopsia de protocolo tomadas regularmente desde el momento del trasplante hasta 10 años después. La historia natural del daño histológico del aloinjerto renal parece así incluir una primera etapa caracterizada por inflamación tubular-intersticial que es máxima durante los primeros meses y tiende a disminuir a partir de entonces pero que no desaparece en algunos pacientes. Después de la inflamación, se produciría un daño intersticial en los túbulos que aparecerían unos pocos meses después del trasplante y que en su descripción afecta al 94,2% de los pacientes en 1 año, seguido posteriormente de una fase posterior de NCI definida por hialinosis arteriolar y glomeruloesclerosis (61).

Entre los distintos componentes asociados al pronóstico renal destacamos:

2.4.1 Infiltrado inflamatorio intersticial:

El infiltrado inflamatorio intersticial, habitualmente acompañado de tubulitis de mayor o menor intensidad, es la lesión fundamental que se observa en el rechazo agudo o crónico mediado por células T (109) y junto a la isquemia mantenida es el principal desencadenante de la FIAT que, en mayor o menor grado, afectan a la gran mayoría de los injertos renales durante su evolución. De hecho, Nankivell y cols. constataron que el infiltrado de células mononucleadas en las áreas con lesión tubulointerticial se correlacionaba con la fibrosis intersticial crónica, con las puntuaciones de Banff y, de forma aún más importante, predecía la progresión histológica de las lesiones (101).

2.4.2 Tubulitis

La tubulitis es una lesión casi siempre subordinada al diagnóstico de rechazo agudo o crónico y, por tanto, apenas hay estudios donde se haya evaluado de forma independiente en su relación con el pronóstico a largo plazo del injerto. De todos modos, la presencia de tubulitis influye muy notablemente en la supervivencia a largo plazo del injerto, ya que la intensidad de la inflamación es el predictor más importante de la progresión de la enfermedad (110).

2.4.3 Arteritis intimal

La gravedad de la endarteritis intimal en la gradación de Banff para el rechazo agudo mediado por células T es quizás el factor independiente de mayor riesgo para la supervivencia del injerto (111). Además, su asociación muy frecuente con anticuerpos positivos frente al riñón del donante sugiere fuertemente que la endarteritis es, al menos en parte, un componente esencial de las formas humorales de rechazo agudo y crónico (112).

2.4.4 Glomerulitis y/o capilaritis peritubular

Los infiltrados inflamatorios microvasculares históricamente han estado vinculados a una mala evolución del injerto y al desarrollo de rechazo agudo humoral y glomerulopatía del trasplante, más aún cuando en la conferencia de Banff celebrada en 2013 se ha aceptado la existencia de rechazo humoral mediado por anticuerpos negativo para depósitos de C4d. Estudios previos han demostrado que las lesiones microcapilares con glomerulitis y tubulitis tienen valor pronóstico superior al depósito de C4d a la hora de evaluar la rápida evolución del injerto hacia la ERC (113).

2.4.5. Necrosis tubular aguda

Recientemente se ha publicado un interesante estudio multicéntrico demostrativo de que la NTA presente en la biopsia preimplantación del riñón del donante no tiene ninguna consecuencia sobre su supervivencia a largo plazo (114). Sin embargo, en el caso de los signos de necrosis tubular que aparecen tardíamente en el injerto, la interpretación es bien distinta, puesto que estas lesiones frecuentemente se asocian a rechazo agudo humoral o infección crónica por virus del poliooma (115).

2.4.6. Fibrosis intersticial y atrofia tubular

Las características histopatológicas comunes de fracaso renal incluyen la FI/AT, los diversos grados de glomeruloesclerosis y la hialinosis arteriolar. La FI/AT es la lesión más común en el TR. En biopsias de protocolo obtenidas en el primer año post-trasplante se ha demostrado un rápido aumento en la prevalencia de FI/AT. Nankivell y cols. demostraron que, en comparación con biopsias realizadas a las 1-2 semanas del trasplante, la FI/AT aumentó diez

veces al primer año post-trasplante y, con menor incremento durante los 9 años posteriores (116).

La presencia de FI/AT en biopsias de protocolo de TR es un predictor independiente de la supervivencia del injerto. Así, la detección de FI/AT en biopsias de protocolo de injertos estables, realizadas a los 3-6 meses post trasplante, se ha correlacionado con la disfunción y posterior pérdida del injerto (116,117). En biopsias de protocolo practicadas al año, la prevalencia es aún más alta y también predice la pérdida del injerto (118) especialmente cuando se asocia a lesiones de rechazo subclínico.

Una de las series más amplias en cuanto al número de casos (n=435) de F. Moreso y cols. (119), mostró en la biopsias de protocolo practicadas en los 6 primeros meses post-trasplante y con un seguimiento de 9 años de media, que los pacientes que presentaban rechazo *subclínico asociado* a FI/AT (n=65) tenían casi el doble de riesgo de presentar disfunción del injerto que los pacientes que presentaban una biopsia normal (n=186), una biopsia con rechazo subclínico aislado (n=74) o con FI/AT aislada (n=110). Estos datos sugerirían que el efecto de la FI/AT sobre la supervivencia a largo plazo está modulado por el rechazo subclínico.

Mediciones de la FI/AT

Varios estudios han demostrado que cuantificar la FI/AT puede ayudar a pronosticar la función renal en injertos y en riñones nativos, por ejemplo con Nefropatía IgA (120,121). De este modo, la FI/AT se podría considerar como el mejor marcador histológico de lesión renal crónica (122,123). Sin embargo, hay muchas incertidumbres sobre la mejor manera de medirla y si los diferentes métodos disponibles para la medición son contundentes, reproducibles y si se correlacionan con los análisis histológicos convencionales (124). Además, las medidas de la FI/AT raramente tienen en cuenta el tipo de células que componen las áreas fibróticas (fibrosis cualitativa), y cómo esto podría reflejar la duración del proceso fibrótico y/o su potencial de reversibilidad u otras características biológicas inherentes a la fibrosis (125).

Métodos cuantitativos

La tinción tricrómica de Masson es el método más extendido, fácil y barato, que se usa a menudo junto a otras tinciones histológicas convencionales para evaluar el contenido de colágeno en el intersticio. Es un método muy usado tanto en la práctica clínica como para la investigación. Sin embargo, algunos estudios demostraron que esa técnica puede tener una pobre reproducibilidad y poca sensibilidad a niveles más finos de fibrosis (125).

La inmunohistoquímica del colágeno III es probablemente la tinción para cuantificar fibrosis menos utilizada y por lo tanto tiene poca validación clínica. Como discrimina las moléculas de colágeno, proporciona una señal muy discreta, sin embargo tiene la ventaja de prestarse a análisis de imágenes computarizadas (125).

La tinción Sirius Red (SR) se examina bajo luz polarizada y no polarizada. Cuando observado bajo luz polarizada es específico para los tipos de colágeno I y III, que representan respectivamente el 80 y 20% del colágeno total sintetizado por los fibroblastos (126). En las biopsias renales, la tinción de SR se ha cuantificado mediante análisis de imagen computarizado y se correlacionó con la función renal en el momento de la biopsia: en distintos tiempos y distintas glomerulopatías (127). Una serie publicada de 68 biopsias de protocolo demostró que la evaluación cuantitativa de FI/AT en biopsias teñidas con SR y analizadas bajo luz polarizada se correlacionaba significativamente con la pérdida del injerto a los 6 meses. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1662–1668. Por otro lado, Díaz Encarnación et al. encontraron correlación entre el SR-no polarizado y la función renal en el momento de la biopsia diagnóstica de la NCI, y concluyeron que los métodos análisis digitales computarizado presentaban una precisión variable en la cuantificación de FI/AT (128). El SR no es ampliamente utilizado y está sujeto a discrepancias entre mediciones polarizadas y no polarizadas. Además, actualmente se carece de estudios para probar la reproducibilidad de esta metodología entre distintas instituciones. Se tarda más tiempo, requiere más tiempo y es más costoso que la tinción tricrómica para valorar fibrosis (125).

2.5. Clasificación de Banff para la patología del trasplante

Como se ha mencionado anteriormente, la biopsia renal aporta información muy valiosa en términos de evaluación diagnóstica y pronóstica. En esta línea, a partir de los avances en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño del injerto renal, la clasificación de Banff y sus actualizaciones permiten unificar de modo universal las lesiones anatomopatológicas bajo una misma nomenclatura, cuando previamente no tenían un valor diagnóstico ni pronóstico claro, por lo que se ha convertido en una herramienta fundamental para la evaluación de las biopsias de los injertos renales (99,129–131). La primera reunión de patólogos y nefrólogos expertos en patología del TR fue celebrada en Banff (Canadá) en 1991. Al principio, el único diagnóstico que tenía relevancia y tratamiento era el rechazo agudo. En las reuniones posteriores, se han actualizado las categorías diagnósticas, adaptándolas a los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la pérdida del injerto y definiendo mejor el daño mediado por anticuerpos (129–132).

La clasificación de Banff 2013 permitió obtener un diagnóstico histológico específico en el 95% de las biopsias, reflejando el alto rendimiento diagnóstico que tienen las biopsias realizadas por indicación (133).

En base a un minucioso análisis estadístico los autores propusieron un sistema de puntuación que tenía en cuenta parámetros *agudos* como la glomerulitis (g-score), la inflamación intersticial (i-score), la tubulitis (t-score), la arteritis intimal (v-score) y la capilaritis peritubular (ptc-score); así como también criterios de *cronicidad* como glomeruloesclerosis (cg-score), el grado de fibrosis intersticial (ci-score), la atrofia tubular (ct-score) y el daño vascular crónico (cv-score), todos ellos evaluados de acuerdo con el grado de la lesión (129–131,133).

A modo de conclusión, la introducción en los últimos años de los criterios de Banff ha permitido disponer de una herramienta reproducible, con una elevada correlación clínico-patológica e internacionalmente aceptada para la descripción de las lesiones agudas y crónicas del injerto renal. De hecho, estudios previos confirman la significativa asociación entre la Clasificación de Banff y supervivencia del injerto (134,135).

3. Inflamación

Aunque los signos de la inflamación ya aparecían descritos en un papiro egipcio (3000 aC), fue Celsus en el siglo 1dC, el primero que describió los cuatro signos cardinales de la inflamación: rubor, tumor, calor y dolor. Posteriormente, Virchow añadió el quinto signo clínico en 1859, la pérdida de la función (*functio laesa*) (136).

La inflamación debe entenderse fundamentalmente como una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma. Al mismo tiempo, inicia una cadena de fenómenos moleculares, celulares y vasculares que, dentro de lo posible, reparan y reconstruyen el tejido lesionado. La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de reparación que, cuando progresa durante un período prolongado de tiempo puede dar lugar a la aparición de cicatrices del parénquima con desfiguración anatómica y funcional. De ese modo, los procesos de inflamación pueden ser perjudiciales.

3.1 Inflamación aguda

La inflamación *aguda* es una respuesta inmediata a un daño tisular con una duración que oscila entre minutos, horas o pocos días. Sus características principales son el aumento de flujo sanguíneo y el incremento de la permeabilidad vascular (edema), acompañado de la migración de leucocitos (predominantemente neutrófilos) y de la activación del endotelio, lo que implica un aumento de expresión de moléculas de adhesión, así como un aumento de la expresión de citoquinas y quimiocinas que atraen leucocitos al foco de inflamación. Comienza así el proceso por el cual los leucocitos atraviesan la pared del endotelio y se incorporan al tejido dañado para combatir el origen de la lesión. Este proceso consta de 4 fases: marginación, rodamiento, adhesión a células endoteliales de los vasos y salida al espacio extravascular (136).

Los neutrófilos predominan en el infiltrado inflamatorio durante las primeras 6 a 24h y luego desaparecen por apoptosis a las 24 a 48hs para posteriormente ser sustituidos por monocitos que permanecen más tiempo.

En este proceso de extravasación leucocitaria podemos distinguir 5 clases de moléculas implicadas: integrinas, inmunoglobulinas que actúan como moléculas de adhesión (como ICAM-1 y VCAM-1), selectinas, receptores de quimiocinas y otros como E-cadherina.

Muchas variables pueden modificar el proceso básico de inflamación, incluida la intensidad, la naturaleza y la localización de la lesión, el tejido afectado y la capacidad de respuesta. La inflamación aguda puede evolucionar de las siguientes 4 formas (Figura 1):

- Resolución completa: es la situación más habitual e ideal y ocurre cuando se neutraliza el estímulo lesivo de manera que la lesión se limita. La destrucción tisular ha sido escasa y el parénquima pudo regenerarse. En este proceso participan los linfocitos y fagocitos.
- Formación de absceso: particularmente se forman en las infecciones por piógenos.
- Inflamación crónica: progresión de la lesión tisular por persistencia del estímulo lesivo.
- Fibrosis: Sucede tras una destrucción tisular sustancial, cuando la lesión inflamatoria afecta a tejidos que no pueden regenerarse o cuando el exudado no es reabsorbido de forma adecuada. La cicatrización se produce mediante formación de tejido conjuntivo.

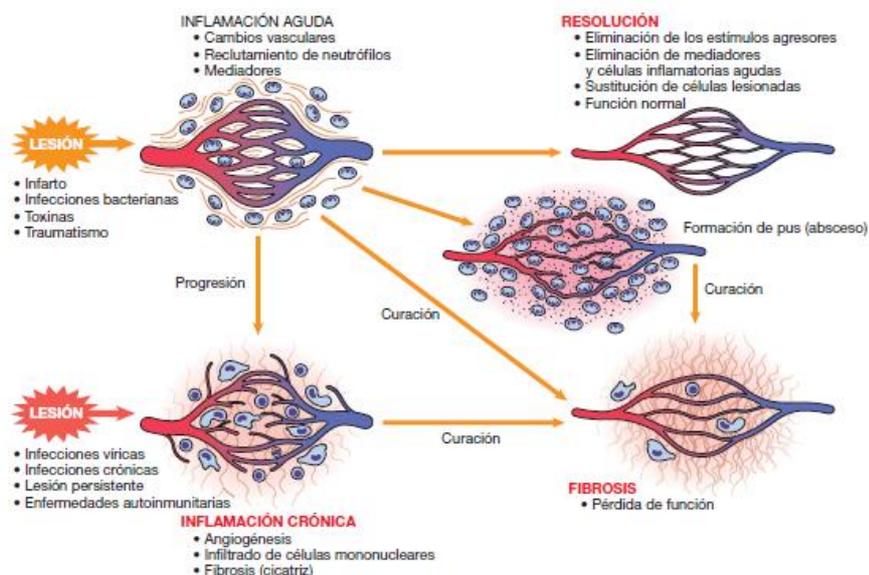


Fig. 1: Formas de evolución de la inflamación aguda. Adaptada de Patología Estructural y funcional. Robbins, sexta edición, capítulo 3.

3.2 Inflamación crónica

En contraste con las reacciones inflamatorias agudas, que se caracterizan por la rápida resolución de los cambios vasculares, edema e infiltración neutrofílica, la inflamación *crónica* se define como una reacción prolongada que persiste durante varias semanas o meses. En ella se pueden observar simultáneamente signos de inflamación activa persistente, de destrucción tisular y de intentos de reparación.

La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de células mononucleares (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), destrucción tisular y por el intento de reparación (angiogénesis y fibrosis), en el que los linfocitos son estimulados por el contacto con el antígeno para producir linfocinas que activan los macrófagos. Las citoquinas de los macrófagos activados, a su vez, estimulan los linfocitos, estableciendo así el escenario para la persistencia de la respuesta inflamatoria (136).

De este modo, a diferencia la inflamación aguda en la que los macrófagos desaparecen después de eliminar el agente lesivo; en la inflamación crónica, los macrófagos proliferan y persisten creando ciclos de retroalimentación positiva.

3.3 Reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. El intento de reparación del daño tisular se consigue sustituyendo las células parenquimatosas no regeneradas por tejido conjuntivo, pudiéndose producir con el tiempo fibrosis y cicatrización, un mecanismo crucial para la supervivencia. Para ello son necesarias una membrana basal íntegra y la capacidad de la célula endotelial de migrar, proliferar y diferenciarse. Aunque inicialmente beneficioso, el proceso de reparación puede llegar a ser patogénico si continúa sin control, dando lugar a la remodelación tisular excesiva y la formación de tejido cicatricial.

3.4 Inflamación y Donante Renal: LIR

La inflamación del injerto renal puede tener diversas etiologías, incluyendo el daño causado por la LIR (las maniobras de extracción renal, la cirugía de banco y cirugía del trasplante), las infecciones, los mecanismos de rechazo, y/o los inmunosupresores nefrotóxicos.

En el caso de la lesión tisular antes de la implantación del injerto, los mecanismos que se ponen en marcha durante la LIR producen una respuesta inflamatoria con infiltración y activación de linfocitos, liberación de citocinas y aumento de la expresión de antígenos HLA de clase I y II.

De este modo, se produce en primer lugar el *daño isquémico* que, con la disminución del aporte de oxígeno, da lugar a una serie de alteraciones en el medio interno como la inhibición del metabolismo oxidativo y la activación de la glucólisis anaeróbica que generan una activación de enzimas líticas y desencadenan reacciones que producen radicales de oxígeno (137). Todo ello produce un estrés oxidativo con liberación de citocinas inflamatorias (IFN- γ , IL1 β , IL-12 y TNF- α) que generan una vasoconstricción renal grave y una disfunción endotelial (138). La respuesta inflamatoria inicial estimula la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos (ICAM-1 y VCAM-1), de quimiocinas (como MCP-1), que promueven la migración e infiltración de leucocitos en el riñón (139). El resultado final de la compleja interacción entre radicales de oxígeno, quimioquinas y citocinas, factores del complemento, receptores de adhesión y leucocitos es un proceso inflamatorio que finalmente daña las células epiteliales tubulares.

En respuesta a la isquemia renal, se activan los mecanismo de reparación. En la siguiente fase de *reperusión* del órgano se encuentran las células-T Natural Killer (NK), productoras de IFN- γ , y los neutrófilos (respondedores precoces). Posteriormente, los monocitos infiltran el riñón lesionado tras los neutrófilos aproximadamente a las 24 horas después de la reperusión, y rápidamente se diferencian en macrófagos que proliferan durante la fase de reparación tisular para recuperar la función renal (140,141). En el caso de que no se corrija la inestabilidad hemodinámica del donante, estos procesos se amplifican y conducen finalmente a una peor función de estos injertos tras la reperusión (142).

La mejoría en la comprensión de la fisiopatología de la LIR ha contribuido al desarrollo de estrategias para disminuir las tasas de FRI, que se han centrado en el manejo del donante, adquisición de órganos y técnicas de preservación, gestión de fluidos y agentes farmacológicos al receptor.

3.5. Citoquinas pro-inflamatorias

Son innumerables las publicaciones existentes que tratan sobre los mediadores y las vías de señalización implicadas en los mecanismos de lesión inflamatoria inducidas durante todo el proceso del TR e incluso ya iniciados con el fallecimiento del donante, por lo que nos limitaremos a realizar una exposición breve de los aspectos fundamentales de aquéllos relacionados con los análisis practicados en esta tesis doctoral.

3.5.1 Interferón-gamma (IFN- γ)

El IFN- γ es una glicoproteína producida por linfocitos T y por células NK en respuesta a la IL-12 y al TNF- α (143) □ La transducción de la señal por el receptor del IFN- γ viene dada por unas tirosin-quinazas asociadas a un receptor de la familia Janus (JAK quinazas) que una vez activadas, fosforilarán residuos de tirosina intracelulares del receptor, creando así un lugar de reconocimiento para los dominios de STAT1 (factor de transcripción que activa la transcripción de distintos genes que codifican proteínas inflamatorias) (144,145). Todas las células del organismo poseen receptores específicos para el IFN- γ pero sus células diana por excelencia son los monocitos y los macrófagos, para los cuales representa el principal factor inductor de la activación clásica (146).

El IFN- γ induce la expresión de la óxido nítrico sintetasa (iNOS), la generación de intermediarios reactivos del oxígeno, aumenta la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) (147), de quimiocinas (MCP-1), así como induce la síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, así como de componentes del sistema del complemento (143). Por otra parte, existen varias citocinas o moléculas capaces de *inhibir* la producción de IFN- γ por las células presentadoras de antígenos (CPA) como el IFN- α , TGF- β , IL-10, los glucocorticoides o las citoquinas de tipo Th2 (IL-4 y IL-13) (143,146).

3.5.2 Interleucina-1 y factor de necrosis tumoral alfa

La Interleucina-1 (IL1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se producen como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés, y son mediadores clave en la respuesta inflamatoria *aguda*. Ambas citoquinas son potentes inductores de la actividad del factor de transcripción NF- κ B (148).

La IL-1 es una citoquina producida principalmente por macrófagos M1 activados y también por células dendríticas en respuesta al TNF- α . La activación del receptor de la IL-1 (IL1R) en las células del endotelio vascular produce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión e inicia o incrementa la infiltración de linfocitos y monocitos hacia los tejidos inflamados. La IL-1 es también un factor quimiotáctico de leucocitos, linfocitos y monocitos. Otros efectos proinflamatorios de la IL-1 incluyen la activación de las células T y la producción de prostaglandinas y metaloproteasas de la matriz por macrófagos y fibroblastos (149,150).

El TNF- α también es una citoquina producida principalmente por macrófagos M1 activados, y su acción es producir activación local del endotelio vascular y liberación de óxido nítrico (NOS) con la consiguiente vasodilatación, provocando la activación de los linfocitos T y B. Sin embargo, esta citoquina también participa en los procesos de inflamación crónica y ha sido ampliamente estudiada como diana de tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn (151–153).

4. Fibrosis

En la curación normal de las heridas, la inflamación es una respuesta precoz beneficiosa; sin embargo, la inflamación no resuelta después de una lesión crónica es un hilo conductor implacable de fibrogénesis, ya que crea un círculo vicioso de inflamación, daño tisular y fibrosis. Por ello, las enfermedades fibróticas tienen en común un estímulo inflamatorio persistente representado por las interacciones sostenidas linfocito-monocito que inducen la producción excesiva de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas y citocinas fibrogénicas. De este modo, la inflamación no resuelta desencadena la

producción de matriz extra-celular (MEC) a través de las células efectoras fibrogénicas de origen mesenquimal como fibroblastos, fibrocitos, pericitos y miofibroblastos derivados de la transición epitelio-mesenquimal (TEM), estimulando la deposición de elementos del tejido conectivo y que a su vez remodela y destruye progresivamente la arquitectura tisular normal (154–157).

4.1 Transición Epitelio-Mesenquimal

La TEM es un conjunto de eventos celulares y moleculares que se caracteriza por la pérdida de adhesión de las células epiteliales, reflejada por la disminución de la expresión de E-cadherina, y la conversión de células epiteliales en células mesenquimales. Este evento sucede durante el desarrollo embrionario de los vertebrados y se mantiene silente en la etapa adulta de los organismos. Sin embargo, la TEM puede reactivarse en enfermedades inflamatorias crónicas, siendo un proceso potencialmente destructivo si no es adecuadamente controlado (158,159).

Durante la TEM, las células epiteliales tubulares adquieren un fenotipo mesenquimal con propiedades migratorias e invasoras que permiten su desplazamiento a través de la MEC e invadir los tejidos adyacentes como el espacio intersticial (160,161).

De este modo, la TEM de las células epiteliales (en general) es un factor importante en la fisiopatología de la cicatrización de las heridas y la reparación de tejidos. Parece ser un proceso reversible, potencialmente determinado por las células supervivientes para facilitar la repoblación de la zona de lesión con nuevo epitelio funcional (162). Sin embargo, como se ha mencionado con anterioridad, este proceso puede comprometer la integridad mecánica y fisiológica del tejido, y su inducción inapropiada tiene consecuencias deletéreas (163,164).

Normalmente las *células epiteliales* se encuentran unidas entre sí por uniones adherentes constituidas por proteínas como E-Cadherina (expresadas en estas células) y cateninas que están conectadas con el citoesqueleto de actina. Por otra parte, las células mesenquimales no están polarizadas y carecen de uniones intercelulares, de tal manera que pueden moverse como células individuales a través de la MEC (160,165). En este sentido, la TEM se inicia con la disociación de las uniones intercelulares (como resultado de la

disminución de la expresión de dichas moléculas de adhesión) y con la pérdida de la unión célula-célula. Son muchos los factores de transcripción que pueden inhibir la expresión génica de E-cadherina y que, por tanto, pueden ser considerados como inductores de TEM, tales como Snail-1 (analizado en esta Tesis Doctoral), Snail-2, ZEB1, ZEB2, E47 y KLF8 (160,161,166).

Fenotípicamente, la TEM se suele definir por la pérdida de marcadores epiteliales típicos, como la E-cadherina mencionada, mientras que se inicia la expresión de marcadores mesenquimales, como N-cadherina, fibronectina, vimentina (163–165,167). Snail es un factor de transcripción que mediaría la TEM por infraregulación de moléculas de adhesión como E-cadherina e incrementaría marcadores mesenquimales como los mencionados (vimentina, fibronectina y metaloproteinasas). Posteriormente, las células *mesenquimales* producto de la TEM aumentan la expresión α -SMA incrementando su capacidad migratoria a través de la MEC (168,169).

Las células mesenquimales son, a su vez, fuente abundante de proteínas de señalización que actúan sobre las células epiteliales, incluyendo los factores de crecimiento epidérmico (EGF). Los fibroblastos también pueden contribuir al remodelado de la MEC sintetizando y organizando nuevos componentes a través de la producción de metaloproteinasas (MMPs), enzimas degradantes de la matriz (158,159).

En la última etapa de la TEM, las células adquieren la capacidad de degradar la membrana basal y de invadir el estroma fibrótico mediante la sobreexpresión de las MMPs y la remodelación del citoesqueleto. La expresión de receptores de integrinas (unen células con MEC) y la activación continua de las MMPs conducen a la descomposición de la membrana basal y a la migración celular (159) (Figura 2).

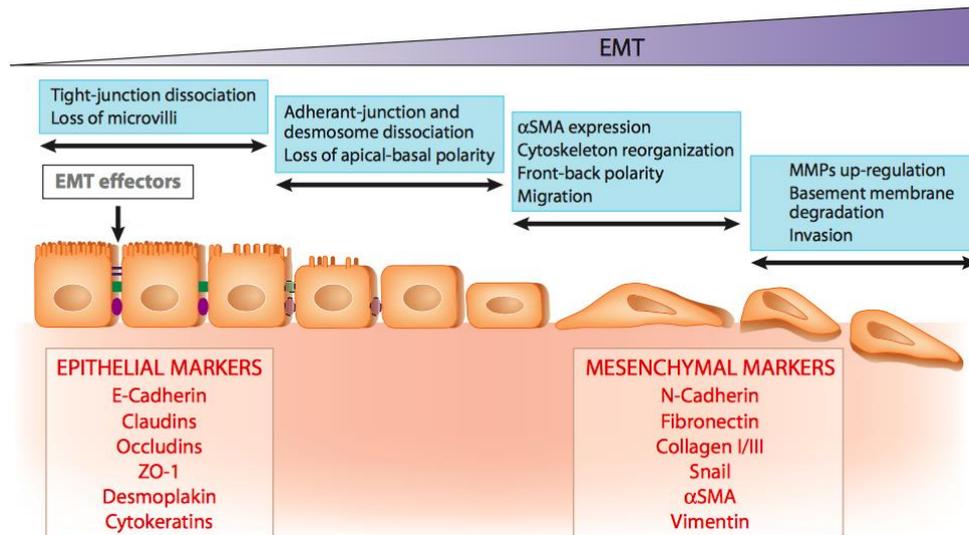


Fig 2: Eventos celulares de la TEM : La figura muestra las fase de TEM: la pérdida de adherencia célula entre las células epiteliales (↓ E-cadherina), seguido del aumento de la expresión de marcadores de células mesenquimales productoras de MEC. Finalmente, se observa la regulación a través de las MMPs y la descomposición de la membrana y migración celular. *Reproducido de Aroeira, JASN, 2004.*

4.2 Fibrogénesis: Síntesis y degradación de la matriz extracelular

Hoy sabemos que la MEC es esencial para los organismos pluricelulares puesto que no sólo permite la adhesión de las células para formar tejidos sino que además aporta propiedades mecánicas a los tejidos, mantiene la forma celular, permite la comunicació intercelular, forma “sendas” por las que se mueven las células, modula la diferenciación y la fisiología celular, secuestra factores de crecimiento, etcétera (170). La composición molecular de la MEC es típica de cada tejido y sus componentes son renovados continuamente por las células que la producen. Esto supone que la MEC está en constante renovación. La MEC está formada por muchos componentes distintos interconectados en los que destacamos, aparte de los proteoglicanos y glucosaminglicanos, proteínas estructurales (como el colágeno) y proteínas de adhesión (como la fibronectina). Tal variedad de componentes requieren toda una familia de enzimas reguladoras de la degradación de la MEC [las MMPs (endopeptidasas)] y, como contrapartida, existen muchas moléculas endógenas capaces de inhibir su acción como los inhibidores tisulares de las

metaloproteinasas (TIMP por su acrónimo inglés), aunque también hay inhibidores plasmáticos (171). Se ha descrito también, por ejemplo, que los genes asociados al factor de transcripción Snail activan algunas MMPs importantes como MMP2 o MMP9 (172,173), entre otras, que intervienen en la degradación de diversas moléculas de la MEC, incluyendo varios tipos de colágeno (174). Es fácil entrever por tanto que el balance entre producción y degradación adecuada de la MEC es importante.

La expresión y síntesis de proteínas por las células productoras de MEC se controla principalmente a nivel de transcripción génica en respuesta a diversas señales extracelulares profibrogénicas como TGF- β 1, CTGF, PDGF, FGF2 (ver abreviaturas) y angiotensina II (175,176) sintetizadas fundamentalmente por macrófagos *profibróticos* M2 y otras células que inducen la proliferación celular y la síntesis de la MEC.

Diversas células efectoras de fibrosis (entre las que destacan los fibroblastos y los miofibroblastos) inducen un exceso de deposición de la MEC en respuesta a las citoquinas, quimiocinas y las otras moléculas de señalización segregadas por células tubulares e intersticiales que son responsables del proceso de fibrogénesis (177–181) (Figura 3).

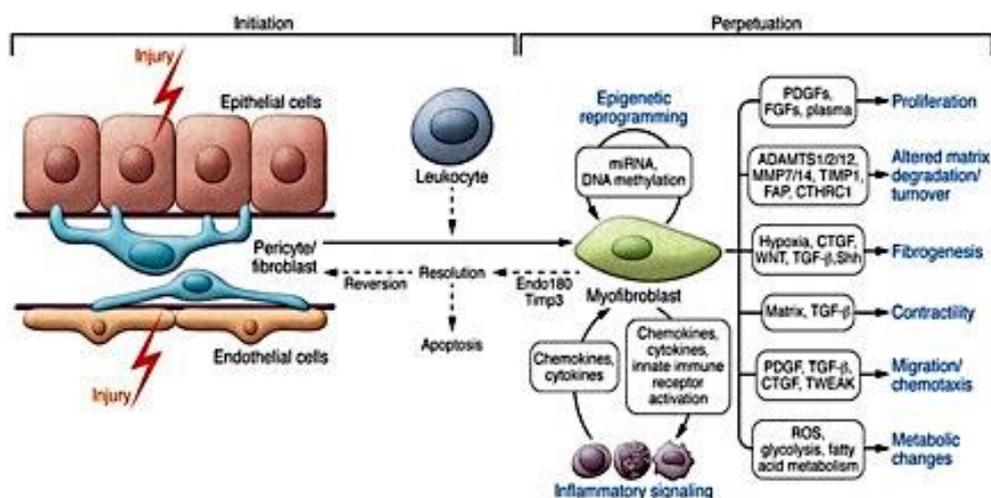


Fig. 3: Muestra el inicio del proceso fibrótico, los miofibroblastos responden a factores de crecimiento, factores plasmáticos y macrófagos y producen MEC. Reproducida de Duffield S et al. J Clin Invest. 2014

Los miofibroblastos son una población única de células que aparecen de novo en el intersticio renal durante la fibrosis (182) con características intermedias entre un fibroblasto y una célula de músculo liso (Figura 4). Se caracterizan por la expresión de proteínas de músculo liso, incluyendo la actina de músculo liso (α -SMA), una proteína de fibra de estrés que facilita el aumento de la contractilidad (179). La expresión de α -SMA se correlaciona con su activación de modo que, cuando los miofibroblastos están activados, dejan de proliferar y empiezan a sintetizar grandes cantidades de MEC (183–185). Aunque muchos tipos de células renales son capaces de producir MEC, tales como fibroblastos, células tubulares epiteliales, células del músculo liso vascular y algunos subtipos de macrófagos, los miofibroblastos son consideradas las principales células productoras de MEC incluyendo la fibronectina y algunos colágenos (182,186,187). La contracción de estas células contribuye a la distorsión de la arquitectura del parénquima, promoviendo la patogénesis y el fracaso funcional de los tejidos y órganos (188).

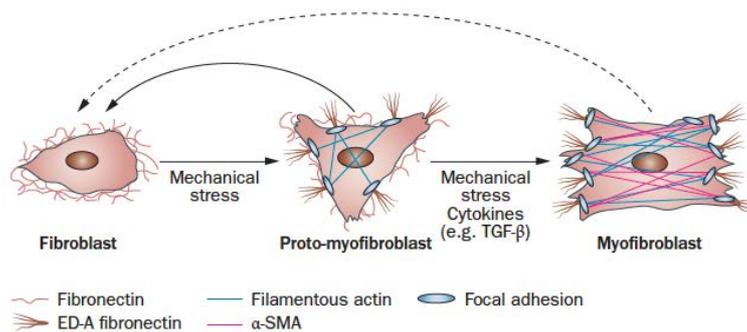


Fig 4.

Contrariamente a la percepción generalizada de que el tejido cicatricial es permanente, las evidencias actuales disponibles apuntan a la naturaleza altamente plástica de la fibrosis y que ésta puede que no se trate de una "cicatriz" irreversible, sino un componente de tejido remodelado de forma *activa* que podría, bajo ciertas circunstancias, regresar (189).

5. Macrófagos

Es bien sabido que los macrófagos están presentes en el riñón sano y que se encuentran en mayor cantidad en el riñón “dañado”, donde actúan como clave en los procesos de inflamación, daño renal progresivo y fibrosis.

5.1 Origen de los macrófagos

El sistema mononuclear fagocítico está constituido por células procedentes de la médula ósea muy relacionadas entre sí, entre las que se encuentran los monocitos de la sangre y los macrófagos de los tejidos. Estos últimos están distribuidos de forma difusa en el tejido conjuntivo, o bien se agrupan en algunos órganos con distintas funciones, como el hígado (células de Kupffer), en el bazo y ganglios linfáticos (histiocitos sinusales), o los pulmones (macrófagos alveolares) (190).

La transformación desde las células precursoras de la médula ósea hasta los macrófagos tisulares está regulada por diversos factores de crecimiento, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). El crecimiento y diferenciación de los macrófagos también depende de las citocinas, como las interleucinas IL-1, IL-3 e IL-6, de las moléculas de adhesión y de las interacciones celulares (191,192) (Figura 5).

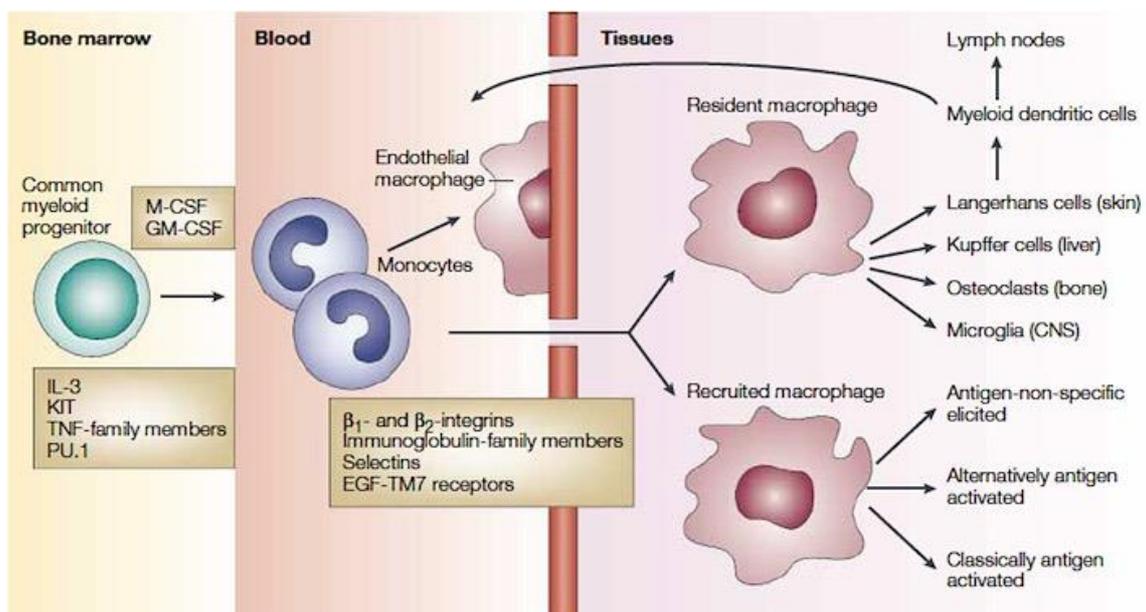


Fig. 5: Proceso de diferenciación de los macrófagos: La transformación de las células precursoras de la médula ósea en monocitos está regulada por M-CSF, GM-CSF y por otras citoquinas. En la sangre estos monocitos se diferencian en macrófagos bajo el estímulo de citoquinas y interleucinas. Los macrófagos se distribuyen en los tejidos o se agrupan en órganos específicos (macrófagos residentes) donde desarrollan funciones diferentes. *Reproducida de Siamon Gordon, Nature, 2003.*

Ya diferenciados, los monocitos circulan por el torrente sanguíneo y son capaces de alcanzar cualquier parte del organismo a través del sistema periférico capilar, donde podrán migrar hacia diferentes tejidos, gracias a la interacción entre moléculas de adhesión (integrinas y selectinas) existentes en la superficie de los monocitos y de las células del endotelio vascular (193). Una vez en los tejidos, los monocitos dejan de proliferar y se diferencian, adquiriendo las características morfológicas y bioquímicas propias de un macrófago (194).

5.2 Función de los macrófagos

Los macrófagos son un componente de la inmunidad innata reconociendo, fagocitando y eliminando del organismo los agentes patógenos y los cuerpos apoptóticos. También generan respuestas inmunes adaptativas, participan modulando la respuesta inmunitaria a través de la producción de citoquinas y quimiocinas, el procesamiento y presentación del antígeno, así como la activación de las células efectoras y la activación y diferenciación de linfocitos T. Por otro lado, los macrófagos también están involucrados en la resolución de la inflamación, promoviendo directamente la reparación de los tejidos dañados. Por lo tanto, muchas de sus funciones parecen ser de naturaleza opuesta: actividades proinflamatorias versus antiinflamatorias, actividades inmunogénicas versus tolerogénicas y actividades destructivas de tejido versus restauradoras de tejido (195,196).

El origen, el estado de activación del macrófago y el microambiente en el que residen son determinantes de su respuesta a la lesión (197).

5.3. Activación de los macrófagos

Los macrófagos son células altamente heterogéneas pudiendo exhibir *distintos fenotipos* y características funcionales en respuesta a varios estímulos o microambientes locales circundantes, al estar regulados por múltiples

moléculas y vías de señalización (198,199). Distintas subpoblaciones de macrófagos pueden coexistir en el tejido renal y determinadas subpoblaciones pueden dominar en diferentes estadios de la enfermedad, desde el inicio de la lesión renal hasta la recuperación. Esta plasticidad fenotípica de los macrófagos permite su cambio funcional en respuesta a microambientes circundantes durante la lesión, sean estímulos inflamatorios, reparativos o fibróticos (200–202).

Estas subpoblaciones fueron inicialmente definidas por respuestas *in vitro* a la exposición a citoquinas de tipo T helper 1 (Th1), o a citoquinas de tipo T helper 2 (Th2) (203,204). Las células Th1 producen citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) los cuales activan un determinado fenotipo de macrófagos que son responsables de la inmunidad celular mediada por células (205). Por otra parte, las células Th2 producen citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, activando otro fenotipo de macrófagos los cuales son responsables por una respuesta reparadora. De este modo se han descrito dos fenotipos bien definidos: a) los macrófagos activados por vías clásicas (macrófagos M1), inducidos por exposición a IFN- γ y/o a lipopolisacárido (LPS); y b) macrófagos activados por vías alternativas (macrófagos M2), inducidos por citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10) (204) (Figura 6).

Posteriormente, la designación M1/M2 original se ha ampliado para incluir un conjunto de inductores y reguladores transcripcionales que median un amplio espectro de estados de activación (206–211).

La activación de los macrófagos, tanto por vías clásicas como alternativas, es un proceso complejo y finamente regulado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas que culminan con el aumento de la capacidad de la célula para ejercer sus funciones fisiológicas y determinan si dichas células tendrán un efecto beneficioso o deletéreo durante la reparación y remodelación de los tejidos.

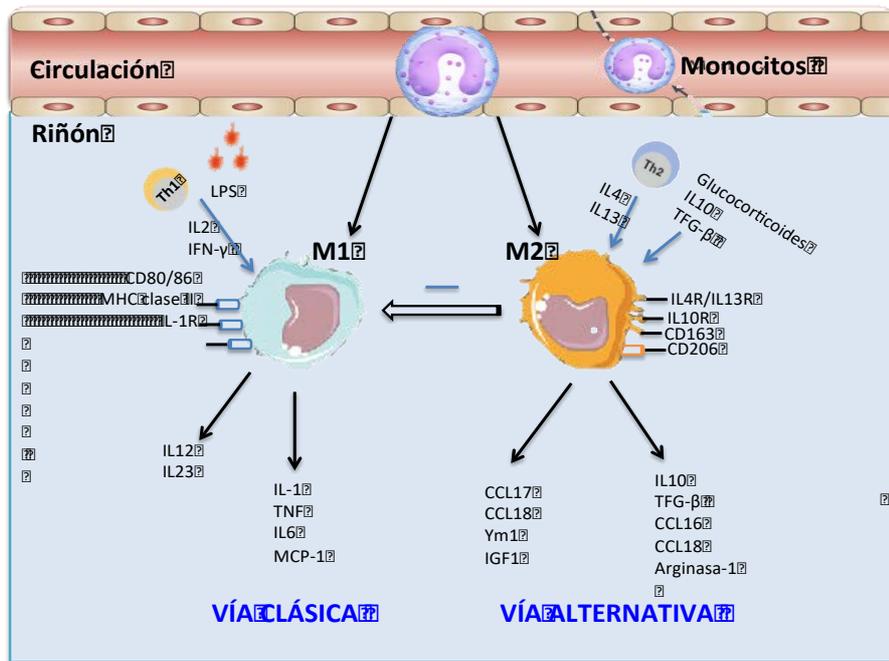
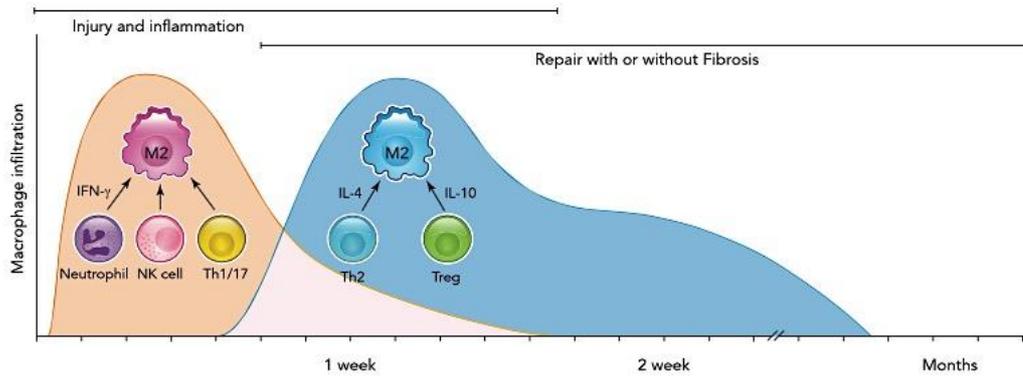


Fig. 6: Vías de activación clásica (M1) y alternativa (M2) de los macrófagos.

De este modo, amplificando la información proporcionada anteriormente, cuando se produce una lesión local, son los macrófagos M1 los primeros en ser reclutados para eliminar las células muertas (apoptóticas), mientras que los macrófagos M2 son preferentemente reclutados más tarde en zonas hipóxicas y necróticas, ejerciendo efectos de reparación local al segregar una amplia gama de quimiocinas, enzimas y factores de crecimiento que promueven la neovascularización, la fibrosis y la reparación de tejidos (212).

Por lo tanto, la plasticidad y diferenciación de los macrófagos con sus distintos fenotipos funcionales M1 y M2 representan extremos de un espectro continuo de diferentes vías, de modo que los macrófagos no permanecen en un solo estado de activación, pudiendo incluso coexistir diferentes fenotipos en un mismo tejido (197,213) (214) (Figura 7).

A Acute kidney disease



B Chronic kidney disease

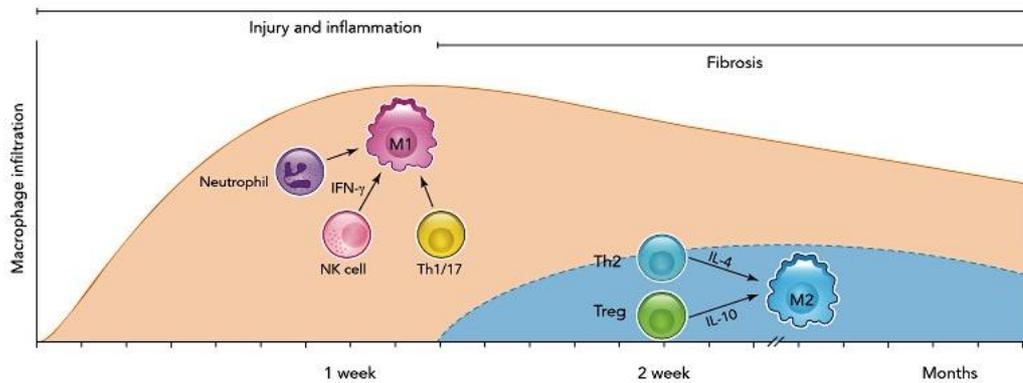


Fig. 7: Plasticidad y diferenciación de macrófagos: El fenotipo de los macrófagos cambia en respuesta al microambientes circundantes, de modo que distintas subpoblaciones de macrófagos pueden coexistir en el tejido renal y determinadas subpoblaciones pueden dominar en diferentes estadios de la enfermedad, desde el inicio de la lesión hasta su recuperación. En la fase de inflamación aguda predomina el fenotipo de macrófago M1, luego la coexistencia/cambio de fenotipo a macrófago M2a puede reparar la lesión (5A) o, en caso de persistencia de la inflamación (crónica), puede desencadenar el cambio y predominio de fenotipo M2c con progresión del daño tisular y el desarrollo subsecuente de fibrosis (5B). *Reproducido de Cao Q., Physiology, 2015.*

5.3.1. Activación clásica de los macrófagos (M1)

Como se ha comentado antes, la activación clásica es inducida por *citoquinas proinflamatorias* como el IFN- γ o el TNF- α y/o por moléculas microbianas como el LPS. Paralelamente, las citoquinas tipo Th1 aumentan los niveles de expresión del complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase II y de marcadores de superficie CD80 y CD86, potenciando así su capacidad presentadora de antígeno a los linfocitos T (197,204). El INF- γ induce la diferenciación al fenotipo Th1 sobre los linfocitos y la inhibe al tipo Th2 (215). Los macrófagos activados clásicamente (M1) producen citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1, la IL-6, así como IL-12 y IL-23, ambas

producidas por las células presentadoras de antígeno (CPA) y agentes antiproliferativos (199,214) (Figura 6). El papel funcional de los macrófagos M1 es la actividad antimicrobiana, desempeñando un papel importante en la limpieza de las células apoptóticas después de una lesión, iniciando así la respuesta de reparación (216). En el riñón, los macrófagos proinflamatorios M1 contribuyen al inicio y progresión de la ERC por la secreción de mediadores proinflamatorios y la interacción con las células renales residentes (217). La respuesta inflamatoria de los macrófagos M1 es amplificada por factores de transcripción como STAT1 y NF- κ B, los cuales son activados por IL-1 β y TNF- α , conduciendo a la activación de otros macrófagos (a través de IL-1, TNF- α , IL-12 e IL-6,) provocando, de este modo, una retroalimentación positiva y haciendo con que se incremente la expresión de más mediadores inflamatorios (218) (Figura 8).

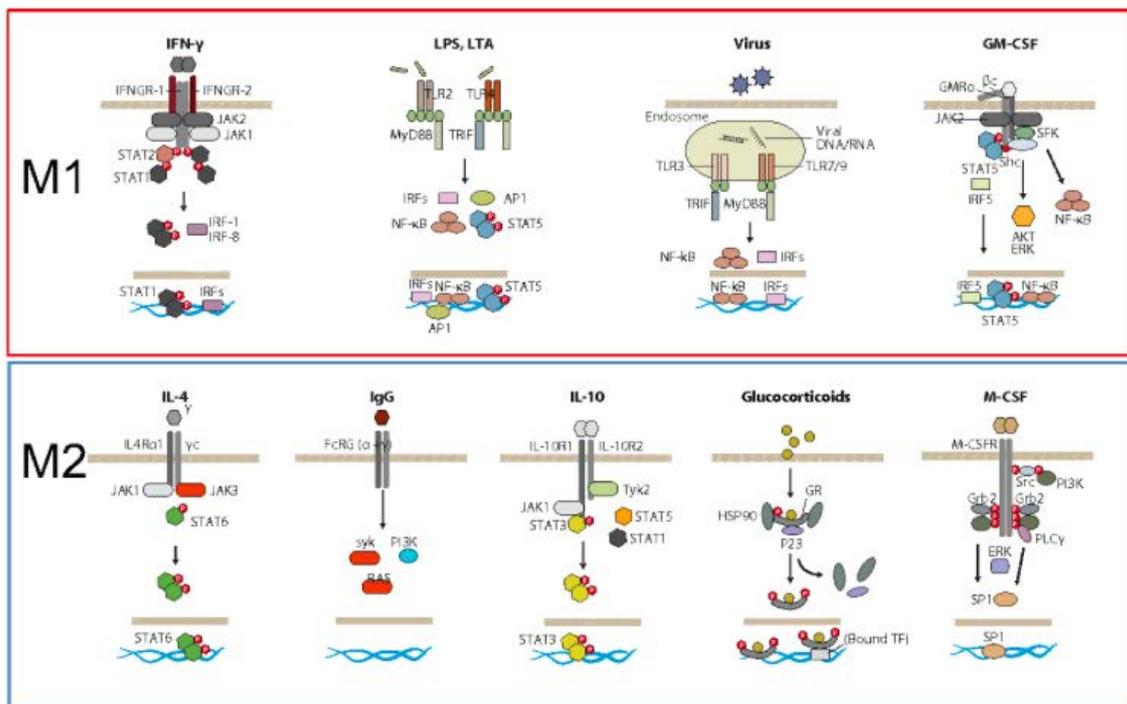


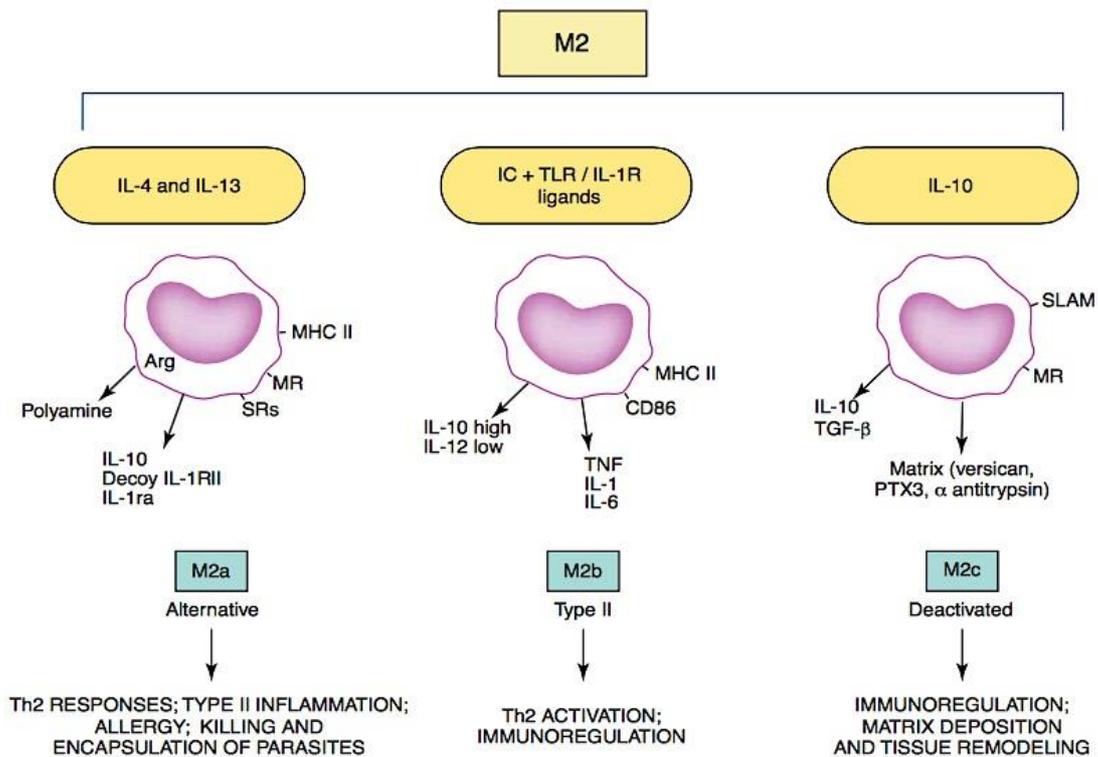
Fig. 8: Vías de señalización intracelular de activación de macrófagos M1 y M2.

5.3.2 Activación alternativa de los macrófagos (M2)

Un proceso inflamatorio *persistente* suele ser contraproducente ya que tiende a dañar los tejidos y, en estos casos, el sistema inmunitario debe desarrollar mecanismos antiinflamatorios (204).

Los macrófagos activados por las mencionadas vías alternativas (M2) desactivan a los macrófagos M1, expresan el antagonista del receptor de IL-1 y reducen la secreción de citocinas proinflamatorias, tras la exposición a citoquinas de tipo Th2, tales como IL-4 e IL-10 (219–221). Además pueden generar arginasa-1, que también suprime la inflamación al inhibir la producción de óxido nítrico (ON) proinflamatorio (222).

Los macrófagos M2 pueden subdividirse adicionalmente en al menos tres subtipos: a) Macrófagos M2a, inducidos por IL-4 y/o IL-13; b) macrófagos M2b, inducidos por complejos inmunes (inmunocomplejos) con LPS o IL-1; c) macrófagos M2c, inducida por IL-10, TGF-β o glucocorticoides (202,223) (Figura 9).



Phenotype	Stimulation	Surface Markers	Secretion/Expression	Function
M1	IFN-γ, TNF-α, LPS	MHC-II, CD86	IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, iNOS, CCL17, CCL18, Arginase-1, Ym1, FIZZ1, Stabilin 1, IGF1, Factor XIII-A	Th1 responses, tumor resistance
M2a	IL-4, IL-13	Mannose receptor, Scavenger receptor, CD163, Dectin-1	IL-10, CCL1, SPHK1	Th2 responses, tissue repair
M2b	Immune complex + LPS	MHC-II, CD86	IL-10, CCL1, SPHK1	Immunoregulation, Th2 activation
M2c	IL-10, TGF-β, Glucocorticoids, Apoptotic cells	Mannose receptor, B7-H4, SLAM (CD150)	IL-10, TGF-β, CCL16, CCL18, Arginase-1	Immunoregulation, tissue remodeling

iNOS, inducible nitric oxide synthase; Ym1, a chitinase-like protein; FIZZ1, a resistin-like protein; IGF1, insulin-like growth factor 1; SPHK1, sphingosine kinase 1; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule.

Fig. 9: Diferentes formas de activación y polarización del fenotipo de macrófagos M2 y funciones. Reproducido de Mantovani A., *Trends in immunology*, 2004.

Mediadores pro-fibróticos (M2a)

Macrófagos y reparación tisular

Como hemos comentado, los macrófagos también desempeñan un papel reparativo promoviendo la restauración tisular tanto en la enfermedad renal inmunológica como no inmunomediada (224,225).

Cada una de las principales citoquinas Th2 tiene un papel distinto en la regulación de la remodelación tisular y en la fibrosis.

Interleucina-4

La IL-4 es una citoquina antiinflamatoria producida, entre otros, por linfocitos T CD4+ (226,227) y actúa principalmente sobre los linfocitos T suprimiendo la aparición del subtipo Th1 productor de IFN- γ e induciendo su diferenciación al subtipo Th2, productor de IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13, además de desempeñar también algunas acciones sobre los linfocitos B. La unión de la IL-4 a su receptor (IL4R) produce una fosforilación de las quinasas JAK asociadas, que a su vez fosforilarán el factor de transcripción STAT6 (228) (Figura 6).

En el macrófago se ha visto que la IL-4 es capaz de inducir una gran variedad de quimiocinas (CCL17, CCL22, CCL24; etc), el receptor de la manosa (CD206), el receptor de IL-1 y el antagonista de IL1- β (IL-1a), además de su capacidad de inducir Arginasa-1 (229)(230).

La IL-4 ha sido considerada desde hace tiempo como un eficaz mediador pro-fibrótico (231). Receptores específicos para IL-4 fueron hallados en subtipos de fibroblastos en ratones (232) y humanos (233) y estudios in vitro mostraron que IL-4 estimula la síntesis de MEC, colágeno I y III y fibronectina (231,233).

IL-13

La interleucina-13 (IL-13) es una citoquina cuyo papel fundamental es la regulación de la función de los monocitos. Se produce en los linfocitos Th2 y su función es modular la producción de IL-1, TNF- α e IL-8, estimular el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B, e inhibir las células Th1, así como la producción de citocinas inflamatorias (230,234,235).

La IL-13 comparte muchas actividades funcionales con IL-4 porque ambas citoquinas usan el mismo receptor (IL-4R α /IL-13R α 1), que se expresa en fibroblastos activando vías de señalización similares como el factor de transcripción STAT6 (236). Además de inducir la producción de TGF- β 1, la IL-13 también activa indirectamente TGF- β mediante la regulación positiva de la expresión de MMPs (237).

Por tanto, la remodelación tisular asociada a respuestas Th2 podría implicar una vía en la que las células CD4⁺ Th2 productoras de IL-13 estimulan la producción de TGF- β 1 por parte de macrófagos, que será el estímulo principal para la activación de fibroblastos y el depósito de colágeno.

Mediadores anti-inflamatorios (M2c)

Macrófagos y fibrosis

Los macrófagos inmunorreguladores M2c producen altos niveles de IL-10 (citocina inmunosupresora) por lo que se propone que la función primaria de estos macrófagos reguladores sería limitar la inflamación a través del control de la respuesta inmune (238). Habitualmente estos macrófagos son transitorios y modulan respuestas inmunes y/o procesan residuos y células apoptóticas generadas como resultado del insulto renal primario. La fagocitosis de las células apoptóticas también conduce a la producción de citocinas anti-inflamatorias tales como TGF- β y IL-10 (239) que alteran la expresión de los macrófagos promoviendo la activación de estos macrófagos M2 pró-fibróticos.

Interleucina 10

La IL-10 fue inicialmente reconocida por su capacidad para suprimir la activación y la función de las células Th1 productoras de IFN- γ . Sin embargo, ahora se describe como una citoquina inmunosupresora *general* que inhibe la respuesta inflamatoria crónica a través de muchos mecanismos (240), habiendo demostrado eficacia en el tratamiento de la fibrosis en numerosos modelos (241–243). Por ejemplo, se ha observado que cuando se administraron macrófagos con sobreexpresión de IL-10 en el momento de la LIR, éstos eran capaces de preservar la función renal, limitar la lesión tubular y reducir la producción de citocinas proinflamatorias dentro del riñón (244).

TGF- β

El TGF β es una citocina multifuncional que regula la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular en muchos tipos de células, incluyendo células epiteliales y hematopoyéticas. Entre sus múltiples acciones, el TGF β puede *inhibir* la secreción y la actividad de otras muchas citoquinas proinflamatorias. De este modo, el efecto del TGF- β en macrófagos es predominantemente *supresor*, inhibiendo la proliferación de estas células e induciendo un fenotipo antiinflamatorio (M2) (245–247). Sin embargo, los miembros de la familia TGF- β son los factores de crecimiento más estudiados al estar estrechamente relacionados con la fibrosis en varias enfermedades (162,248–251). Así, el TGF- β es un potente estimulador de la síntesis de proteínas de la MEC, siendo sintetizado y secretado tanto por células inflamatorias como efectoras por lo que tanto tiene una actividad autocrina como paracrina (252). En el riñón, el TGF- β_1 derivado de macrófagos puede promover la fibrosis mediante la activación de miofibroblastos o la activación directa de células mesenquimales residentes que posteriormente se diferencian en miofibroblastos productores de MEC y colágeno (253,254).

Hay tres isotipos de TGF- β en los mamíferos - TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 - y todos tienen actividades biológicas similares (255), pero la fibrosis tisular se atribuye principalmente a la isoforma TGF- β_1 , siendo los monocitos circulantes y los macrófagos la principal fuente celular (256). La mayoría de las células inmunes, las células epiteliales tubulares y los miofibroblastos son también capaces de sintetizar TGF- β (257).

Las señales de TGF β se transmiten a través de un complejo receptor de superficie celular que consiste en el receptor TGF β tipo I (TGF β R1) y el receptor TGF β tipo II (TGF β R2) que, a través de diversos procesos intracelulares que afectan a importantes factores de transcripción llamados Smad (por ejemplo Smad 2, 3 y 4,). Smad2/3 activado (fosforilado) se une a Smad4 y, posteriormente, se transloca al núcleo donde regulará la expresión de múltiples genes que codifican, entre otras, proteínas de la MEC (258–261) (Figura 10). Además de las vías Smad-dependientes, TGF- β_1 también activa las vías de Erk, PI3K, p38 y JNK, cada uno de los cuales resulta en un patrón único de expresión génica y, por tanto, la función fisiológica (262).

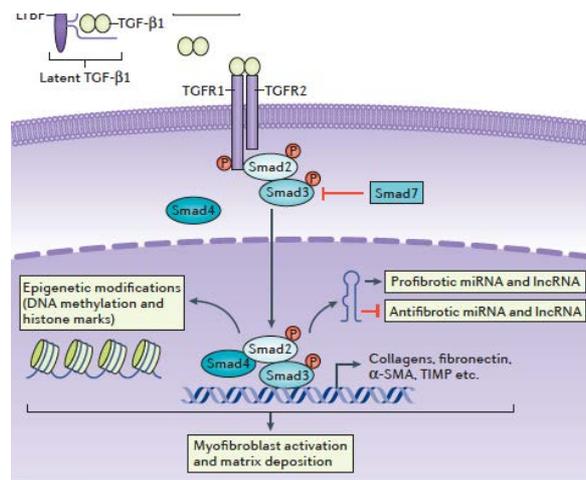


Fig. 10: Vía de señalización intracelular del TGF-β₁. Adaptado de Meng X., *Nature Reviews Nephrology*, 2016.

5.4. El papel de los macrófagos en la inflamación del injerto renal

Fenotipo pro-inflamatorio

En el injerto renal se producen fenómenos similares a todos los descritos con anterioridad. El daño renal agudo causado por la isquemia-reperfusión o por los inmunosupresores citotóxicos desencadena un infiltrado prominente de neutrófilos y células natural killer a las pocas horas de la lesión tisular (263,264), seguido de la infiltración de monocitos que se diferencian en macrófagos que median en el desarrollo de lesiones renales tubulares precoces. También en el injerto renal se ha descrito que IFN- γ y TNF- α son secretados por células Th1 infiltrantes y células NK, promoviendo la activación de macrófagos proinflamatorios (M1) (239,265,266). Estos macrófagos que se acumulan inmediatamente después de la LIR expresan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1, IL-12 e IL-6 y quimiocinas como MCP-1 (239,267). Este microambiente está preparado para inducir a la activación de los macrófagos M1 mediante la activación de las vías señalización como STAT1 y NF- κ B y así la secreción citoquinas pro-inflamatorias que amplifican aún más la inflamación intrarrenal y la lesión generando un mecanismo de retroalimentación positiva (266,268–270). Estos mismo macrófagos M1, a su vez también producen metaloproteasas (MMP-12) que permiten su migración a través de membranas basales e intersticiales de la MEC (271).

5.5. El papel de los macrófagos en la fibrosis del injerto renal

El riñón, y más específicamente el epitelio tubular renal, tiene una notable capacidad para regenerarse después de una lesión (272). Los estudios de ablación de macrófagos in vivo sugieren que la activación de los macrófagos después de la LIR renal es temporal y funcionalmente dinámica, pasando de un fenotipo pro-inflamatorio a un fenotipo reparativo.

La lesión renal y la reparación comprenden un delicado equilibrio entre la pérdida celular y la proliferación-acumulación-remodelación de la MEC dependiente del fenotipo de macrófago activado. Esta fase de reparación se produce entre 24 y 72 h después de la reperfusión del injerto renal, período durante el cual ocurre la diferenciación celular, el aumento de la actividad mitótica y la regeneración tubular (273). La inducción de un estado de activación M2a es necesaria para la proliferación y reparación celular (disolución de fibrina, a la eliminación de tejido muerto y al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (224,225,274).

Sin embargo, ante un estímulo inflamatorio persistente sobre el injerto renal, la infiltración sostenida de macrófagos puede resultar en la producción continua de diversos factores de crecimiento, así como el reclutamiento de fibroblastos, el crecimiento y la remodelación del tejido conectivo (197). En este contexto, los macrófagos M2c, bajo el estímulo de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, producen un aumento en la secreción de TGF- β a través de la vía de señalización de STAT6 que induce un aumento de la expresión de sus receptores TGFBR2 y TGFBR1. La interacción entre el TGF- β y sus receptores desencadena la cascada de vías de señalización que aumenta la expresión de genes ligados a la generación de fibrosis (248).

Además, la producción de factores de crecimiento y TGF- β 1 por los macrófagos M2c puede promover la fibrosis renal reclutando e induciendo la proliferación y activación de fibroblastos para convertirse en miofibroblastos y producir MEC (275). A su vez, las células epiteliales tubulares y los miofibroblastos son capaces de sintetizar TGF- β 1 en diferentes estadios del desarrollo de fibrosis renales (276).

Finalmente, este proceso inicial de cicatrización se vuelve patológico, dando como resultado una fibrosis irreversible, destrucción de tejido y DCI a largo plazo (277).

III. HIPÓTESIS

Es bien conocido que inmediatamente después del trasplante, los injertos renales pueden presentar una respuesta inflamatoria inespecífica asociada a la LIR, especialmente los injertos procedentes de DC. La LIR induce el reclutamiento de células inflamatorias en el injerto, lo que genera especies reactivas del oxígeno, conduce a la liberación de citoquina y el reclutamiento de macrófagos.

Nuestra hipótesis es que el proceso inflamatorio y la infiltración de macrófagos se inician antes del trasplante en el DC a diferencia del DV. Esta inflamación persiste tras el trasplante induciendo un proceso de reparación dependiente de las citoquinas producidas por los macrófagos de fenotipo antiinflamatorio M2 el cual resulta en el desarrollo de la FI/AT.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- ✓ El objetivo de este estudio es evaluar el estado inflamatorio y la expresión de factores pro-fibróticos en los injertos renales procedentes de DC y DV y su asociación con la función renal a largo plazo.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ✓ Comparar el estado inflamatorio basal (pre-implantación del injerto) entre los donantes de cadáver y vivo.
- ✓ Analizar la expresión de las proteínas proinflamatorias y pro-fibróticas en el primer año post-TR y compararlas entre DC y DV.
- ✓ Evaluar el impacto de la inflamación y de la fibrosis en la función del injerto a medio y a largo plazo.

V. MÉTODOS

6. Diseño del estudio

En la presente tesis hemos realizado un estudio prospectivo observacional, aprobado por el Comité ético de investigación clínica (CEIC) de la Fundació Puigvert. Se incluyeron aquellos pacientes que fueron trasplantados desde junio de 2008 hasta junio de 2011 en nuestro centro y su seguimiento se realizó de manera prospectiva hasta marzo de 2016.

6.1. Pacientes

Durante el período de inclusión de pacientes y recogida de muestras en el estudio, 45 pacientes negaron su consentimiento para participar. Se excluyeron 7 pacientes por presentar pérdida inmediata del injerto, 3 por pérdida del injerto durante los 30 primeros días post-trasplante y 21 pacientes por riesgo de sangrado en la biopsia. Finalmente se pudieron incluir en el estudio ciento veinticinco pacientes que fueron divididos en dos grupos: receptores de donantes cadáver y receptores de donantes vivo (grupo control), todos los cuales firmaron un consentimiento informado.

Se consideró DCI al incremento progresivo de la creatinina plasmática asociado a proteinuria. Se consideró pérdida del injerto la necesidad del inicio de diálisis, nuevo trasplante renal o MDRD $< 15 \text{ mL/min/1,73m}^2$ al final del seguimiento.

6.1.1. Criterios de inclusión:

- Pacientes trasplantados en nuestro centro que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.
- Las biopsias de protocolo con cambios borderline se incluyeron en el análisis.

6.1.2. Criterios de exclusión:

- Pacientes que presentaron pérdida inmediata del injerto o durante los 30 primeros días post trasplante, o aquellos con injerto no funcionante.
- Pacientes portadores de HIV, VHB o VHC.
- Pacientes con riesgo inaceptable de sangrado en la biopsia.

- Pacientes en los que las biopsias fueron realizadas por indicación clínica, como empeoramiento de función renal o proteinuria.

Cabe resaltar que aquellos receptores de DC que no firmaron el consentimiento para la realización de las biopsias, sólo se analizaron las muestras pre-implantacionales.

6.1.3. Variables clínicas

La información clínica se extrajo de los registros médicos de los pacientes. Se recogieron datos demográficos, comorbilidades (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia), la etiología de la ERC, tiempo en diálisis, datos bioquímicos e inmunológicos y la terapia inmunosupresora de inducción. Por otra parte, las variables de los donantes estudiadas fueron las siguientes: edad y sexo, causa de la muerte, comorbilidades, niveles de creatinina sérica pre-extracción, tiempo de isquemia fría e histocompatibilidad HLA con el receptor.

6.1.4. Terapia inmunosupresora

Todos los pacientes recibieron como inmunosupresión de inducción la triple terapia con micofenolato, tacrolimus y prednisona. Los receptores hiperinmunizados o con prolongado tiempo de isquemia fría recibieron terapia cuádruple secuencial. Esta pauta de inmunosupresión consistía en 7 a 10 días con timoglobulina añadida a la triple terapia. A los receptores de DCE se administró la pauta cuádruple secuencial con tacrolimus diferido al 5º día, en combinación con micofenolato y prednisona. Los receptores de DV recibieron basiliximab añadido a micofenolato, tacrolimus y prednisona, excepto los receptores HLA idénticos que recibieron la triple terapia estándar.

Todos los pacientes recibieron micofenolato, tacrolimus y prednisona como terapia de mantenimiento, según nuestro protocolo clínico, si no había contraindicación para alguno de ellos.

6.2. Muestras

6.2.1. Muestras de biopsias renales

Se recogieron muestras de biopsias renales en tres tiempos: pre-implantación (biopsia del donante), a los 4 meses (± 2 m) y a los 12 meses (± 2 m) post-trasplante renal (biopsias de protocolo). Se obtuvieron 2 cilindros de cada

muestra. El primero fue congelado a -80° y luego procesado para el análisis de la expresión génica a nivel de ARNm de diferentes proteínas implicadas en la inflamación y fibrosis por PCR a tiempo real. El segundo cilindro fue incluido en parafina para analizar el grado de inflamación y fibrosis desde el punto de vista anatomopatológico según la clasificación de Banff, así como evaluar el infiltrado de macrófagos mediante tinción de CD68 por inmunohistoquímica.

Un total de 261 muestras de biopsias renales fueron recogidas, de las cuales 50 fueron excluidas: 32 por muestra insuficiente, 18 por problemas de tinción. Por lo tanto, se analizaron 211 biopsias renales, 69 procedían de donantes y 142 de receptores. Para el estudio de expresión de ARNm, se incluyeron 68 muestras basales: 47 de DCs y 21 de DVs. A los 4 meses se analizaron 49 muestras (26 de DCs y 23 de DVs), y a los 12 meses se analizaron 40 (15 de DCs y 25 de DVs). Para el análisis histopatológico se obtuvieron 174 muestras de biopsias: 49 basales o pre-implantacionales (32 DCs y 17 DVs), 69 a los 4 meses (37 DCs y 32 DVs) y 56 muestras a los 12 meses post trasplante (26 DCs y 30 DVs) (Figura 11).

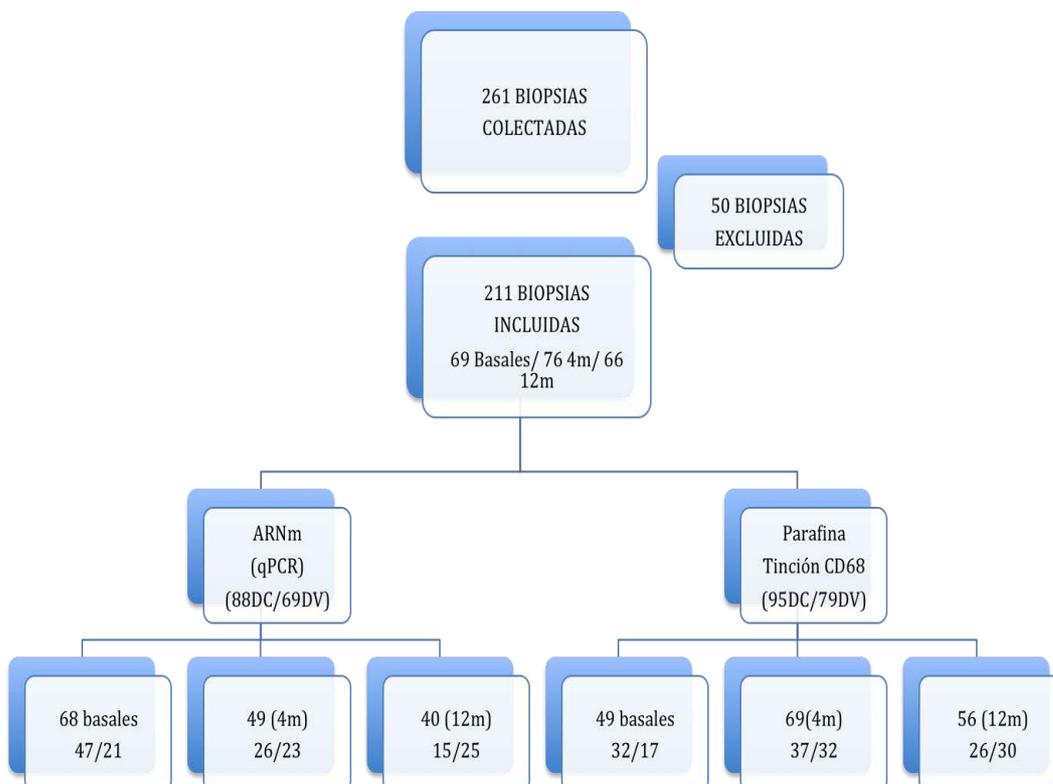


Fig. 11: Algoritmo de la recogida de muestras de biopsias renales en tres tiempo (basales, 4 y 12 meses post trasplante), separados por grupos: donante cadáver (DC) y donante vivo (DV). Un cilindro de la muestra se procesó para análisis de expresión génica por PCR cuantitativa y el otro cilindro fue incluido en parafina para tinción de CD68 por inmunohistoquímica.

6.2.2 Muestras para el análisis clínico

Se recogieron muestras de sangre y orina en diferentes momentos para el análisis clínico: a los 4, 12 y 24 meses de evolución, así como al último control. La estimación de la tasa de filtrado glomerular (TFG) se realizó aplicando la fórmula MDRD (por el acrónimo inglés de “*Modificación of Diet in Renal Disease*”) con la creatinina trazable (Roche®). La proteinuria se evaluó mediante la medición de orina de 24 horas o evaluando el cociente de proteína/creatinina en orina. También se analizaron los niveles séricos de tacrolimus en los respectivos tiempos.

7. Biopsia renal

Las biopsias pre-implantacionales fueron realizadas por el cirujano y se obtuvieron mediante biopsia cortical en cuña y las biopsias post-trasplante se realizaron de manera percutánea, guiadas por ecografía, con agujas de 18G y bajo anestesia local.

Un patólogo cualificado evaluó la histología, y las secciones se puntuaron según la escala de Remuzzi o la clasificación de Banff (109). En ambos tipos de muestra el tejido renal se fijó en formol (tamponado al 4 %) y se incluyó en parafina. Se realizaron tinciones histológicas de 3 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina, con PAS (ácido peryódico de Shiff), tricrómico de Masson y plata metenamina y tinción inmunohistoquímica para el antígeno CD68.

7.1. Escala de Remuzzi

La escala de Remuzzi se aplicó para analizar la fibrosis del injerto en el momento del trasplante. En este estudio, la puntuación de Remuzzi se evaluó sólo con fines de investigación, pero no para la decisión de implantación del

injerto. Dado el escaso número de muestras con puntuación > 5, se decidió dividir en 2 grupos y se analizaron los datos comparando las muestras con puntuación < 4 con las que tenían puntuación ≥ 4 .

7.2. Clasificación de Banff

La clasificación de Banff 2007 (109) se aplicó para cuantificar la inflamación y la fibrosis del injerto a los 4 y 12 meses, evaluando y puntuando "t" (tubulitis), "i" (inflamación intersticial), "ci" (fibrosis intersticial), "ct" (atrofia tubular). Se definió inflamación un i-score ≥ 1 y un t-score ≥ 1 . La presencia de FIAT fue definida como un ci-score ≥ 1 y un ct-score ≥ 1 .

7.3. Tinción inmunohistoquímica para CD68

La inmunohistoquímica aplica los principios inmunológicos al estudio de los tejidos, basándose en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Marcando los anticuerpos podemos amplificar y visualizar al antígeno.

La proteína CD68 pertenece a la familia de glicoproteínas lisosomales (GPL)/proteínas de transporte de membrana plasmática que participan en la endocitosis y/o en el tráfico lisosomal. El CD68 se expresa en la superficie de macrófagos. Los anticuerpos contra el antígeno CD68 son los más usados para la identificación de macrófagos en inmunohistoquímica.

Para la interpretación de la tinción, las células mielomonocíticas marcadas por el anticuerpo muestran tinción citoplasmática difusa o granular.

7.3.1 Procedimiento de tinción

Los cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina se desparafinan y se realiza el tratamiento de recuperación del epítipo por calor usando DakoPTLink. El sistema de visualización usado fue EnVision FLEX. Los pasos de tinción y los tiempos de incubación fueron preprogramados en el software del Autostainer Link e incluyeron el bloqueo del tejido y la adición del anticuerpo primario (*CD68 KP1*, 20'). Las muestras se trataron con peroxidasa y la reacción se visualizó usando el sistema de sustrato de diaminobenzidina (FLEX-DAB + - Sub Chromo, 10' Dako). La contratinción se realizó con hematoxilina usando EnVision FLEX Hematoxylin (Link). Después de la tinción,

los cortes se deshidrataron y se montaron con medio de montaje permanente (DPX).

7.3.2. Análisis de imágenes

El análisis cuantitativo de las células CD68 positivas se realizó mediante aplicación de un software de análisis de imagen (MetaMorph). Se obtuvo una imagen digital mediante un equipo compuesto por un microscopio Nikon Elipse 80i dotado de polarizador regulable y platina motorizada automatizada (Prior) y cámara digital Micropublisher 3.3 cooled 1, con una lente de 20x, sin polarizador.

Se hizo un recuento del número de células positivas para cada anticuerpo anti-CD68 en el intersticio cortical. Los resultados se expresaron como la media del número de células CD68 positivas por mm². Las células intersticiales CD68 positivas en la corteza renal se contaron en al menos 10 campos de gran aumento, excluyendo áreas subcapsulares, glomerulares, peritubulares y vasculares. Los infiltrados nodulares de CD68+ también se excluyeron del recuento.

7.4. Análisis de la expresión de ARNm

7.4.1. Extracción de ARN

Las cuñas y biopsias de tejido renal se estabilizaron en Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Alemania) y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para la homogenización de los tejidos, se utilizó el TissueLyser LT (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se utilizaron microtubos de 2 ml refrigerados en nieve carbónica, a los que se les añadió una esfera de acero inoxidable de 5 mm de diámetro y 800 µl de Tri Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En la mayoría de muestras se necesitaron de 2 a 3 ciclos de 5 minutos a 50 Hz para su completa homogenización.

Para la extracción de ARN, las muestras homogenizadas se transfirieron a un tubo nuevo y se añadieron 160 µl de cloroformo. Después de centrifugar, se recuperó la fase acuosa con el ARN y se mezcló suavemente con 1:1 vol:vol de etanol absoluto. Las muestras se transfirieron a una columna RNeasy (kit

RNeasy Plus Micro, Qiagen) y tras varias etapas de lavado, el ARN se eluyó con 14 μL de agua libre de RNasa.

La integridad del ARN total se evaluó en un gel de agarosa desnaturalizante que permite la evaluación visual de las bandas de ARN ribosomales de 28S y 18S. La concentración de ARN se ajustó a 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$, seguido de almacenamiento a -80°C .

7.4.2. Síntesis de ADNc (Retrotranscripción)

La retrotranscripción del ARN mensajero al ADN monocatenario (ADNc) se realizó de acuerdo con la guía del usuario de Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System, OpenArray Experiments (Life Technologies, Waltham, MA). Se prepararon 10 μl de reacción de transcripción reversa con el High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) por cada 10 μl de muestra de ARN. La retrotranscripción se realizó en placas de 96 pocillos según el siguiente protocolo:

- 1) 10 minutos a temperatura ambiente
- 2) 2 horas a 37°C
- 3) 10 minutos en hielo
- 4) Centrifugado breve a 1200 g
- 5) 10 minutos a 75°C
- 6) 5 minutos en hielo
- 7) Centrifugado breve a 1200 g

Las placas con las muestras de ADNc se guardaron a 4°C .

7.4.3. PCR a tiempo real

El experimento se realizó de acuerdo con el protocolo para ensayos de expresión génica TaqMan (Life Technologies). La PCR se preparó con la 2X TaqMan OpenArray Real Time PCR Master Mix (Cat No. 4.462.159, Life Technologies), 3.6 μl de DNAc y 3.9 μl de agua. Esta mezcla se preparó en una placa de OpenArray de 384 pocillos y se pipeteó en cada placa OpenArray usando el sistema OpenArray AccuFill. Cada placa OpenArray pudo analizar 168 ensayos para 16 muestras. La PCR se cuantificó con el sistema QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

8. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media \pm SD (desviación típica) y porcentajes, según corresponda. Las diferencias en las variables de los donantes y receptores entre los grupos (DC vs DV), fueron analizadas usando el test t de Student, para comparar dos variables continuas y el análisis de varianza (ANOVA), cuando se trataba de más de dos variables continuas. Cuando nuestros datos no siguieron una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov), se utilizaron pruebas no paramétricas como la prueba U de Mann-Whitney y la correlación de Spearman. Se aplicó el test de Chi cuadrado para comparar variables nominales. Para correlacionar la expresión génica con la inflamación, la fibrosis renal y con la intensidad del infiltrado de células CD68+, se realizó el análisis de correlación de Spearman y se calcularon la correlación y su valor de p.

Los resultados obtenidos fueron analizados según el sistema estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) y SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 10.0 y los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Por otra parte, la determinación de la supervivencia del injerto, censurando y sin censurar el éxito del receptor con injerto funcionando, se realizó usando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y la comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba de log-rank.

Se realizó un análisis univariante usando el modelo de regresión de Cox para evaluar la correlación entre variables clínicas, de laboratorio e histológicas con la función del injerto, tanto en el grupo de DC como en el grupo de DV. Para el análisis multivariante se utilizó el modelo de regresión lineal múltiple. La linealidad de la relación entre las variables independientes y la variable dependiente (análisis gráfico), la independencia de residuos y errores de predicción (prueba de Durbin-Watson), la normalidad de la distribución (prueba de Kolmogorov-Smirnov), multicolinealidad (VIF y Tolerance) y la homogeneidad de varianzas (análisis gráfico) se analizaron y se encontraron genéricamente correctas. Las variables cualitativas fueron transformadas en

variables “dummy”. En el análisis multivariante se introdujeron inicialmente todas las variables que presentaban correlaciones significativas con las variables dependientes (creatinina y MDRD). Posteriormente se eliminaron todas las variables que tenían valores de VIF superiores a 4 en las estadísticas de colinealidad. Este análisis estadístico fue efectuado con el SPSS versión 24.0 para Windows.

9. Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundació Puigvert. Todos los pacientes incluidos fueron adecuadamente informados del procedimiento y firmaron su consentimiento informado previo a la biopsia. En todo momento se aplicó la Declaración de Helsinki.

VI. RESULTADOS

10. Características basales de los donantes y receptores

Se incluyeron 125 pacientes (70 DC/ 55 DV) en el estudio. Las características basales de donantes y receptores y sus antecedentes clínicos y analíticos están resumidos en la Tabla 1.

Entre los donantes de cadáver y vivo, se han observado diferencias significativas en cuanto a la edad del donante ($p = 0,001$), siendo los DV más jóvenes que los DC y en el tiempo de isquemia fría ($15,2 \pm 5,2$ horas versus $2,2 \pm 1,2$ horas, $p < 0,0001$), que fue significativamente más prolongado en los injertos procedentes de DC. Se observaron también diferencias significativas con respecto a tasa de filtrado glomerular (TFG) del donante, siendo significativamente mayor en el grupo de DV ($p = 0,03$). Del mismo modo, el porcentaje de DCE fue mayor entre los DC que los de DV (68,5% vs 20%, $p < 0,0001$).

En cuanto a las características basales de los receptores, los que recibieron injertos procedentes de DC eran significativamente mayores en el momento del trasplante (56 ± 12 vs 45 ± 13 años) y habían estado más tiempo en TRS pre-trasplante ($p < 0,0001$) comparado con los receptores de DV. Como podía esperarse, se observaron también diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a FRI ($p < 0,0001$), puesto que apenas 2 (3,6%) pacientes procedentes de DV presentaron FRI frente a 28 (40%) de los pacientes de DC. Por otra parte, el 65,6% de estos pacientes con FRI fueron receptores de DCE, mientras que el resto, el 34,4%, se correspondió a donantes con criterios estándar ($p = 0,02$) (Figura 12).

Cuarenta y ocho receptores de DC (68 %) y 39 de DV (71%) recibieron timoglobulina o basiliximab como terapia de inducción. No hubo diferencias significativas en cuanto a la terapia de inducción, ni en cuanto al número de incompatibilidades HLA entre ambos grupos.

Tabla 1: Características basales de los donantes (A) y de los receptores (B)

N = 125	DC (n = 70)	DV (n = 55)	p
(A) Donantes			
Género : V/M (n)	45/25	18/37	0,0003
Edad (años)	58,3 ± 13,9	51 ± 10,8	0,001
Tiempo de isquemia fría (horas)	15,2 ± 5,2	2,2 ± 1,2	<0,0001
TFG MDRD-4 (ml/min/1,73m ²)	92,2 ± 31,3	105 ± 26,6	0,03
Causas de muerte (n):			
ACV hemorrágico/isquémico	37/7		
Anoxia cerebral	3	-	-
TCE	12		
Asistolia (Maastricht II)	9		
Otras	2		
DCE n (%)	48 (68,5%)	10 (20%)	<0,0001
(B) Receptores			
Género : V/M (n)	40/30	19/36	0,01
Edad al trasplante (años)	56 ± 12	45 ± 13	0,0006
Tiempo en TRS (meses)	44,3 ± 26	6,0 ± 15,2	< 0,0001
Causas de ERC primaria (n):			
Cardiovascular	15	9	
Glomerulopatía	20	17	
Hereditaria	9	6	
Nefropatía Intersticial	5	6	
Desconocida	18	12	
Otras	3	5	
IS (n): Inducción ¹ /Triple terapia ²	48/22	39/16	ns
FRI n (%)	28 (40%)	2 (3,6%)	< 0,0001

Los datos se presentan como media ± desviación estándar o frecuencia (%).

¹Terapia de inducción: timoglobulina o basiliximab seguido de triple terapia.

²Triple terapia: tacrolimus, micofenolato mofetil y prednisona.

Los resultados se consideraron significativos con una p < 0,05.

Abr: DV: Donante vivo, DC: Donante cadáver, V: varón, M: Mujer, TFG: tasa de filtrado glomerular, ACV: accidente cerebro-vascular, TCE: traumatismo craneoencefálico, DCE: donante con criterios expandidos, TRS: terapia renal sustitutiva, ERC: enfermedad renal crónica, IS: inmunosupresión, FRI: función retrasada del injerto.

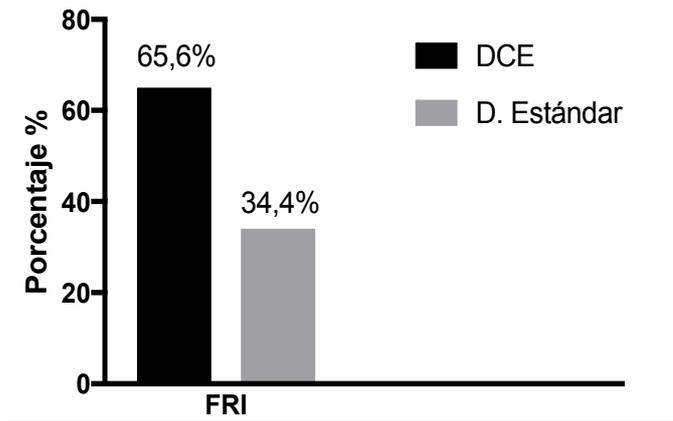


Fig. 12: Comparación entre DCE y Donante Estándar en cuanto a FRI.

La barra negra corresponde a DCE y la barra gris a los donantes estándar, los resultados se expresan como frecuencia (%). La significación estadística se alcanza con una $p < 0,05$.

Abr: FRI: función retrasada del injerto, DCE: donante con criterios expandidos, D. Estándar: donante estándar.

11. Histopatología

Se analizaron las biopsias renales preimplante teniendo en cuenta la escala de Remuzzi. La puntuación total < 4 fue observada en el 88,8% de las muestras de DV y en el 81,9% de las muestras de DC (Figura 13A). Esta puntuación se asoció con la función renal a medio y largo plazo en DC de modo que las muestras con puntuación < 4 mostraron mayor TFG a los 12 meses ($p = 0,040$) y a los 24 meses ($p = 0,026$) post-trasplante comparado con las muestras con puntuación ≥ 4 . De la misma forma, una mayor puntuación de Remuzzi se correlacionó con el mayor número de células CD 68 positivas en las biopsias basales ($p 0,012$; $r = + 0,36$). Los pacientes DCE presentaron una puntuación de Remuzzi mayor que los donantes con criterio estándar ($1,77 \pm 1,62$ vs $0,65 \pm 0,9$; $p 0,004$).

Las biopsias renales de los receptores fueron analizadas a los 4 ± 2 y 12 ± 2 meses del trasplante mediante la clasificación de Banff. A los 4 meses se observó inflamación en un 41% de las muestras de DC y en un 20% de las muestras de DV (Figura 13B). El porcentaje de inflamación según la clasificación de Banff a los 4 meses se asoció con un menor filtrado glomerular a los 12 ($p = 0,026$) y 24 meses ($p = 0,017$), y con el último control ($p = 0,011$).

Igualmente se asoció con una mayor expresión de TGF- β 1 ($p = 0,032$) e IL-1 β ($p = 0,045$) a los 4 meses y con el número de células CD68 positivas basal ($p = 0,004$) en las muestras de DC. En cuanto a la fibrosis se observó en un 50% de las muestras de DC y en un 32% de las muestras de DV (Figura 13B).

En la clasificación de Banff de las biopsias renales a los 12 meses se observó inflamación en un 59% de las muestras de DC y en un 13% de las muestras de DV ($p = 0,01$). En cuanto a la fibrosis se observó en un 71% de las muestras de DC y en un 35% de las muestras de DV ($p = 0,03$) (Figura 13C).

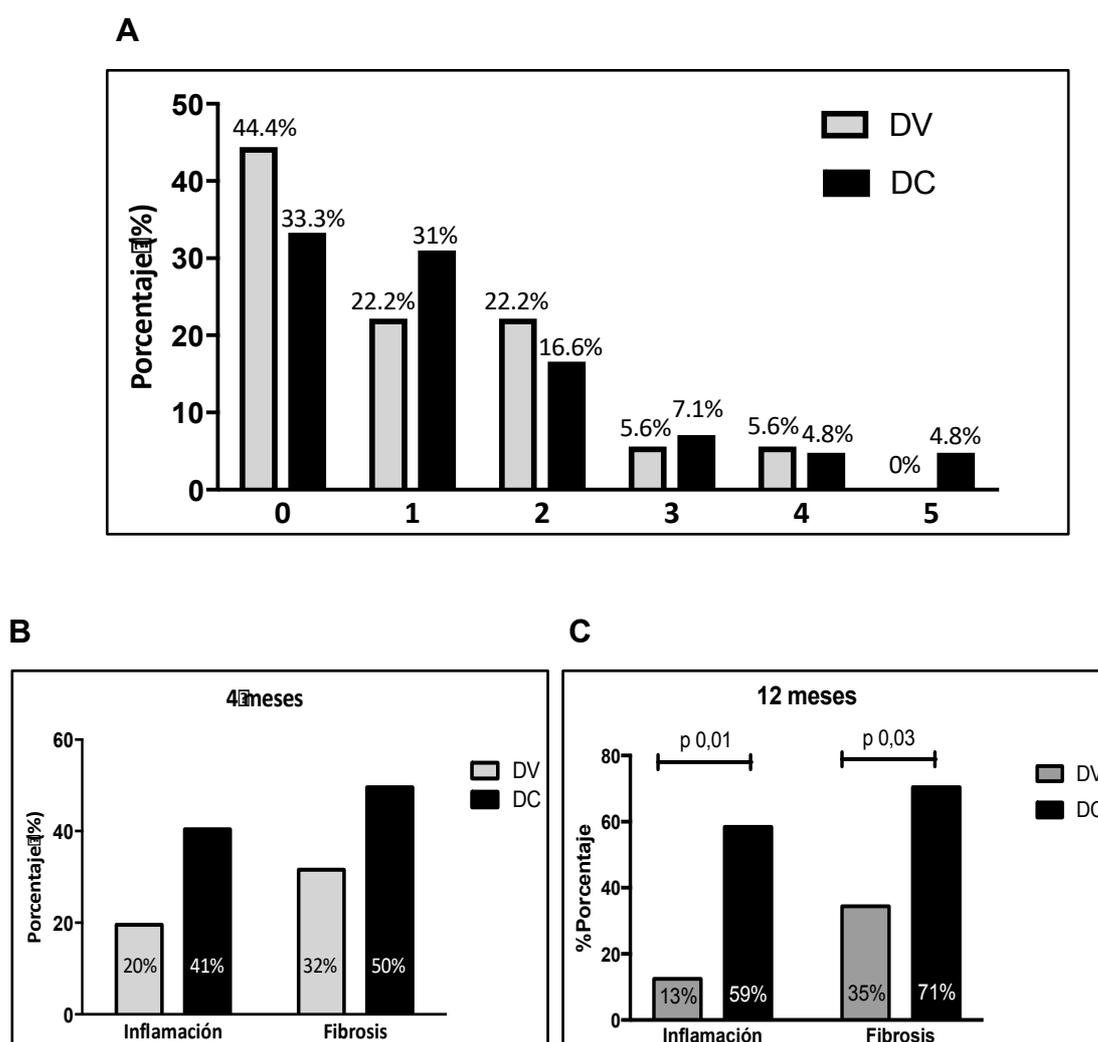


Figura 13: Resultados histopatológicos. En las figuras están representados los pacientes de DC en barras negras y los de DV en barras grises. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas con una $p < 0.05$.

Puntuación de Remuzzi en las biopsias de donantes. Los resultados están expresados en frecuencia (%) de pacientes que corresponden a cada puntuación de la escala de Remuzzi y se compararon ambos grupos (A). **Clasificación de Banff de las biopsias post trasplante.** Los

resultados se expresan en frecuencia (%) de los pacientes que presentan una puntuación de Banff de inflamación y fibrosis mayor de 1 a los 4 meses (**B**) y a los 12 meses (**C**).

La mayor puntuación del Banff de inflamación a los 12 meses del trasplante se correlacionó con el número de células CD68 positivas a este mismo tiempo ($p = 0,001$, $r + 0,57$). La expresión génica de algunas proteínas relacionadas con la reparación y la fibrosis a los 4 meses post trasplante, tales como TGF- β 1 ($p = 0,04$, $r +0,71$), CD163 ($p = 0,007$, $r +0,83$) y IL4R ($p = 0,004$, $r +0,71$), se correlacionó con un mayor grado de fibrosis a los 12 meses según la Clasificación de Banff, en las muestras de DC.

12. Expresión génica de proteínas proinflamatorias

12.1. Inflamación en biopsias renales de donantes

Cuando se analizaron las muestras preimplantacionales, se observó que en los injertos de DC había una mayor expresión de proteínas proinflamatorias, incluidos ICAM-1 ($p < 0,0001$), MCP-1 ($p = 0,0003$), IL-1 β ($p = 0,0106$), TNF- α ($p = 0,0308$), y factores de transcripción como STAT1 ($p < 0,0001$) y NF- κ B ($p = 0,026$) comparados con los injertos de DV. De la misma manera, la expresión del receptor de superficie CD80, característico de macrófagos M1, fue más elevado en injertos de DC ($p = 0,045$) con respecto a los injertos de DV. Además, los injertos de DC presentaban una mayor expresión génica de marcadores de superficie de monocitos, tales como CD14 ($p = 0,0011$) y CD16 ($p < 0,0001$) que los injertos de DV (Figura 14).

12.2. Inflamación en biopsias renales de protocolo

A los 4 meses post trasplante, la expresión génica de TNF- α , STAT1, NF- κ B, CD80 y CD86 se mantuvo elevada en las muestras de DC y aumentó significativamente en las muestras de DV ($p = 0,002$, $p < 0,0001$, $p = 0,002$, $p = 0,004$ y $p = 0,032$, respectivamente). Por otro lado, algunos inductores de la inflamación, a través de la vía M1, disminuyeron a los 4 meses después del trasplante en muestras de DC (ICAM-1, $p < 0,0001$; MCP-1, $p = 0,003$; IL-1 β , $p = 0,0326$), y a su vez permanecieron sin cambios en las muestras de DV (Figura 14).

A los 12 meses post trasplante los mismo marcadores inflamatorios permanecieron elevados en las muestras de DV y algunos de ellos presentaron un incremento significativo en las muestras de DC (TNF- α , $p=0,0012$; STAT1, $p = 0,011$; NF-kB, $p 0,03$; CD80, $p = 0,005$; CD86, $p < 0.0001$) (Figura 14).

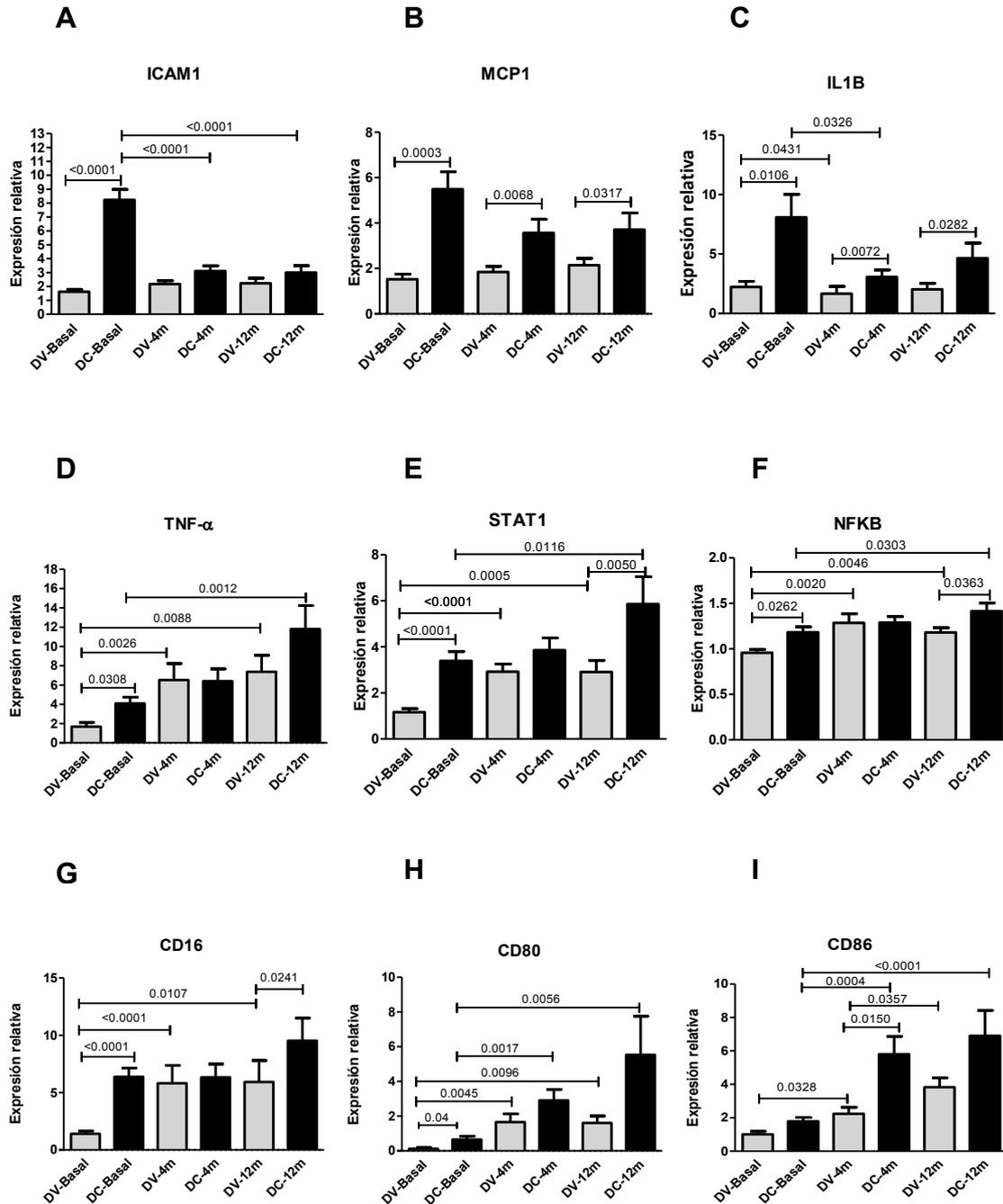


Fig. 14: Análisis de expresión génica de ARN-m en biopsias renales de DC y DV en tres tiempos: preimplante, 4 y 12 meses post trasplante. Datos de expresión génica de marcadores inflamatorios incluidos ICAM1 (A), MCP1 (B), IL1 β (C), TNF- α (D), STAT1 (E),

NFKB (F), CD16 (G), CD80 (H), CD 86 (I) se normalizaron usando la expresión media de tres controles endógenos (GUSB, GAPDH, y B-tubulina). En las figuras están representados los pacientes de DC en barras negras y los de DV en barras grises y se compararon ambos grupos en los diferentes tiempos: basal, 4 meses y 12 meses post-trasplante.

12.3. Correlación entre la expresión génica de proteínas pro-inflamatorias y la función renal a medio y largo plazo

En las muestras de DC, la expresión basal de los genes evaluados no se correlacionó con la TFG en ninguno de los tiempos analizados. Por el contrario, la expresión génica de varias proteínas pro-inflamatorias, tales como ICAM1, MCP1, IL-1 β , TNF- α , STAT1 y NF-KB, a los 4 meses después del trasplante en injertos de DC mostró una correlación negativa estadísticamente significativa con la TFG a medio y a largo plazo (Tabla 2A). A su vez, cuando se analizó el incremento de inflamación en las muestras de DC (expresado como la diferencia de expresión génica a los 4 meses y la expresión basal), se observó una correlación negativa con la TFG a medio y a largo plazo (Tabla 3A).

Con respecto a los injertos de DV, en general ni la expresión génica de estos marcadores inflamatorios a los 4 meses post trasplante ni el incremento de la inflamación se correlacionaron con la TFG a largo plazo (Tablas 2B y 3B).

Tabla 2: Correlaciones entre la expresión génica a los 4 meses con la función renal a medio y a largo plazo.

A

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
4 MESES DC	24 Meses		Último control (5,8 \pm 1 a)	
	p	rho Spearman	p	rho Spearman
ICAM1	0,0473	-0,4089	0,0007	-0,6429
MCP1	0,0212	-0,4677	0,0011	-0,6239
IL-1 β	0,0187	-0,4760	0,0003	-0,6739
TNF- α	0,0209	-0,4686	0,0202	-0,4709
STAT1	0,0086	-0,5709	0,0003	-0,7174
NFKB	0,0128	-0,5459	0,0343	-0,4335
CD80	0,2065	-0,2674	0,0421	-0,4179
CD86	0,0357	-0,4306	0,0007	-0,6442
CD14	0,0513	-0,4023	0,0003	-0,6790
CD16	0,0181	-0,4780	<0,0001	-0,7404

B

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
4 MESES DV	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
	p	rho Spearman	p	rho Spearman
ICAM1	0,0708	-0,3836	0,2853	0,2327
MCP1	0,0111	-0,5192	0,5556	-0,1296
IL-1 β	0,1427	-0,3154	0,6102	-0,1122
TNF- α	0,6778	-0,0915	0,3286	0,2132
STAT1	0,0001	-0,7808	0,1250	-0,3371
NFKB	0,6188	0,2123	0,0868	0,3736
CD80	0,2655	0,2422	0,4783	0,1556
CD86	0,1699	-0,2963	0,7825	-0,0609
CD14	0,1062	-0,3456	0,8488	-0,0421
CD16	0,0506	-0,4123	0,7095	0,0821

Tabla 3: Correlaciones de la diferencia entre la expresión génica a los 4 meses y basal con la función renal a medio y a largo plazo.

A

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
Δ 4M - basal DC	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
	p	rho Spearman	p	rho Spearman
ICAM1	0,0026	-0,7593	0,0673	-0,5220
MCP1	0,0003	-0,8473	0,0024	-0,7637
IL-1 β	0,0102	-0,6823	0,0007	-0,8132
TNF- α	0,0241	-0,6190	0,0346	-0,5879
STAT1	0,0476	-0,2937	0,5733	-0,8438
NFKB	0,7298	-0,1012	0,0147	-0,6703
CD80	0,1972	-0,3824	0,0252	-0,6154
CD86	0,8373	-0,0633	0,3344	-0,2912
CD14	0,1323	-0,4402	0,2309	-0,3571
CD16	0,0398	-0,5750	0,0037	-0,7418

Δ (incremento): expresado como la diferencia entre la expresión génica a los 4 meses y la expresión génica basal.

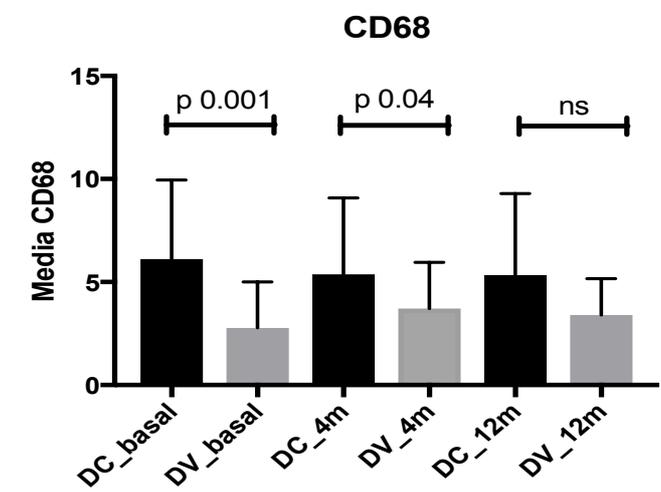
B

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
Δ4M - basal	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
DV	p	rho Spearman	p	rho Spearman
ICAM1	0.3558	-0.3500	0.3807	-0.3333
MCP1	0.6368	-0.1833	0.7650	0.1276
IL-1β	0.4175	-0.3096	0.2950	-0.3933
TNF-α	0.7980	-0.1000	0.4064	-0.3167
STAT1	0,3536	-0,4286	0,5948	0,2500
NFKB	0,2897	-0,4685	0,6698	0,1982
CD80	0.5996	0.2034	0.7946	0.1017
CD86	0.0671	0.6333	0.0418	0.6830
CD14	0.8984	-0.0500	0.4328	0.3000
CD16	1.0000	0.0000	0.8984	-0.0500

13. Infiltrado de macrófagos

Los injertos procedentes de DC presentaron un mayor infiltrado de macrófagos CD68 positivos que los de injertos de DV en el momento de la implantación (p = 0,001). A los 4 meses post trasplante, las células CD68 positivas permanecieron elevadas en receptores de DC y aumentaron significativamente en receptores de DV. A pesar de este último aumento en DV, las diferencias entre los grupos permanecieron significativas (p = 0,04) (Figura 15).

A



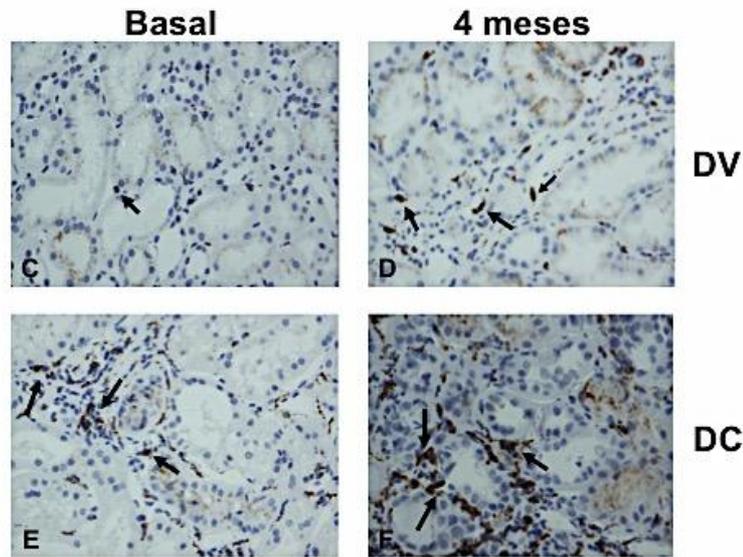


Figura 15: Análisis del infiltrado inflamatorio de CD68 por conteo automático de células por campo del tejido renal de DC (barras negras) y DV (barras grises). Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar y fueron comparados en los diferentes tiempos: basal, 4 y 12 meses post-trasplante (A). Muestra representativa del infiltrado de células CD68 positivas en los injertos de DV y DC pre-implantacionales (C y E) y a los 4 meses post trasplante (D y F). Se realizó test de Mann-Whitney para análisis estadístico entre ambos grupos. La significación estadística se alcanzó con una $p < 0.05$.

13.1. Correlación entre el infiltrado de macrófagos y la función renal a medio y largo plazo

El infiltrado basal de macrófagos CD68+ en los injertos de DC se correlacionó inversamente con la TFG a medio y largo plazo (24 meses: $r = -0,625$, $p = 0,006$; último control [media de $5,8 \pm 1,0$ años]: $r = -0,551$, $p = 0,005$), pero no se apreció correlación con el incremento del infiltrado a los 4 meses (Figura 11A). Sin embargo, en las muestras de DV, se observó una correlación entre la TFG a medio plazo (24 meses) y el incremento de células CD68+ entre los tiempos basal y 4 meses post trasplante (Figura 16B).

A los 4 y 12 meses, el infiltrado de macrófagos CD68+ no se correlacionó con la función renal ni en las muestras de DC ni en las muestras de DV.

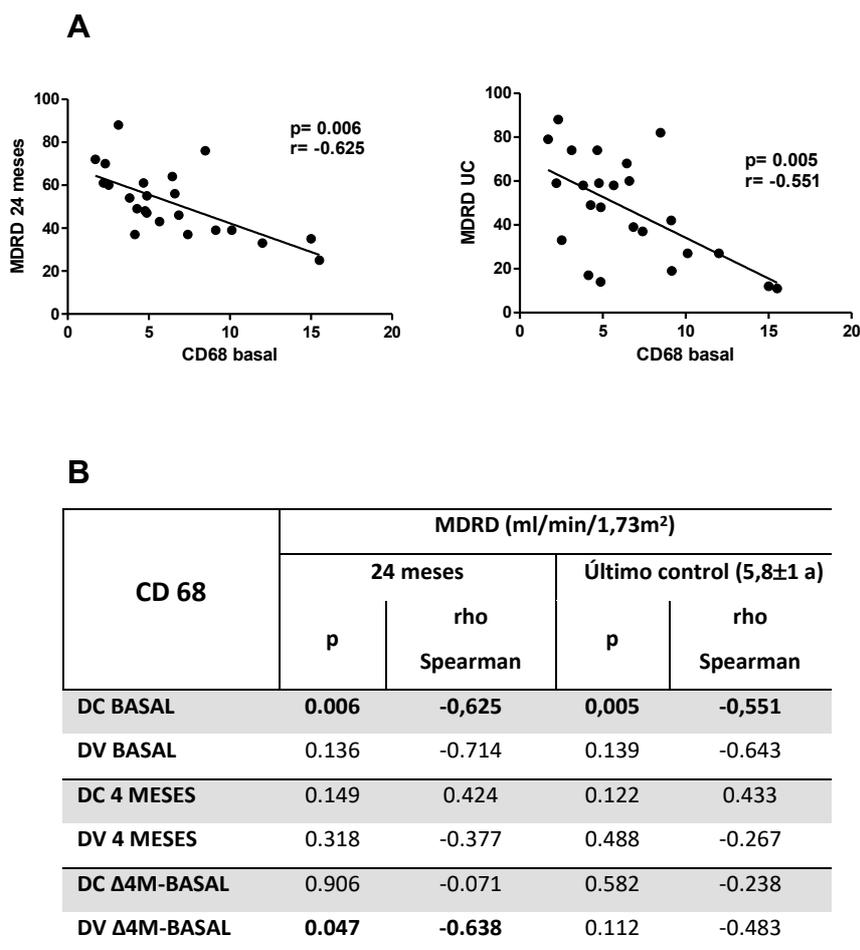


Figura 16: Correlación de Spearman entre el número de células CD68+ y la TFG (MDRD). La figura **16A** representa gráficamente la correlación entre el infiltrado células CD68+ preimplantacional y la TFG (MDRD) en muestras de DC, a los 24 meses y en el último control (UC). En la figura **16B** se expresa la correlación entre el incremento (desde basal hasta los 4 m) del número de células CD68+ con la TFG a los 24 meses post-TR y al UC, en ambos grupos.

14. Expresión génica de proteínas pro-fibróticas

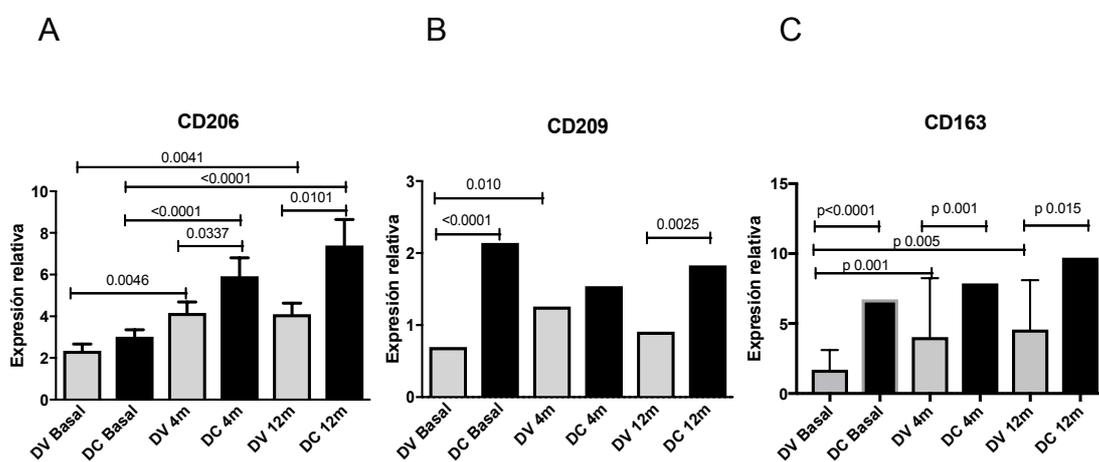
14.1. Fibrosis en biopsias renales de donantes

Cuando se analizaron las muestras preimplantacionales, se observó que los injertos de DC ya presentaban una mayor expresión de proteínas anti-inflamatorias como el IL4R ($p = 0,0046$), IL10 ($p = 0,0109$) y TGF- β 1 ($p = 0,0005$), de factores de transcripción como el STAT6 ($p = 0,03$) y SNAIL1 ($p = 0.0012$), así como de marcadores de superficie de macrófagos M2, tales como CD209 y CD163 (ambos $p < 0,0001$), comparados con las muestras de DV (Figura 17).

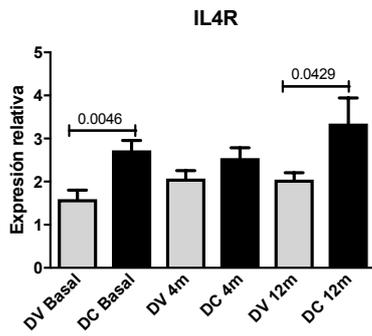
14.2. Fibrosis en biopsias renales de protocolo

A los 4 meses post trasplante la expresión de marcadores de superficie de macrófagos-M2 como CD206, CD209 y CD163, permanecieron elevadas en los injertos de DC, y se observó un incremento significativo de estos marcadores en las muestras de DV ($p = 0,0046$, $p = 0,010$, $p = 0,0017$ respectivamente). A este tiempo, la expresión génica de los inductores de TEM aumentaron significativamente en ambos grupos pero permanecieron significativamente más elevados en los injertos de DC: α -SMA ($p = 0,023$), fibronectina ($p = 0,019$), vimentina ($p = 0,0013$), TIMP1 ($p = 0,002$). Además, se observó que los injertos de DC presentaban una mayor expresión génica del factor de transcripción inductor de TEM [SNAIL-1 ($p = 0,0073$)], de metaloproteinasas, tal como MMP14 ($p = 0,011$) y colágeno-4 ($p = 0,04$) (Figura 17).

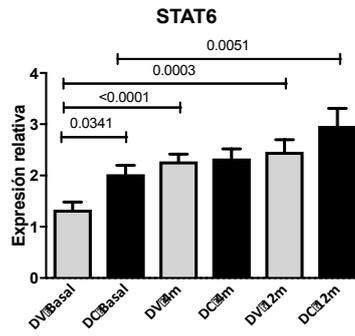
A los 12 meses post trasplante, la expresión de los mismo marcadores permanecieron elevados en ambos grupos pero siguen significativamente más elevados en los injertos de DC, incluidas las proteínas anti-inflamatorias inductoras de la activación de macrófagos M2, tales como IL4R ($p 0,042$), IL10 ($p = 0,039$) y TGF- β 1 ($p = 0,020$) (Figura 17).



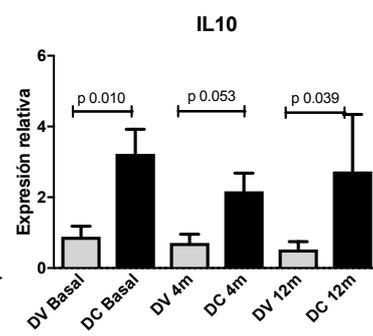
D



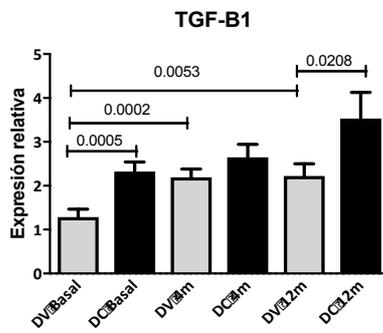
E



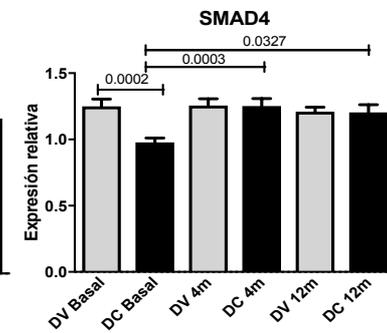
F



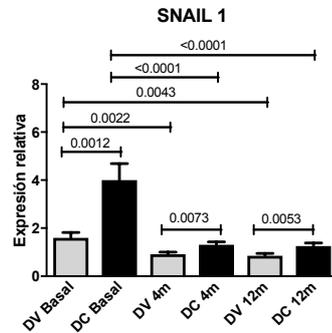
G



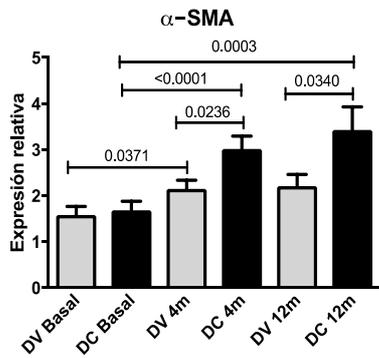
H



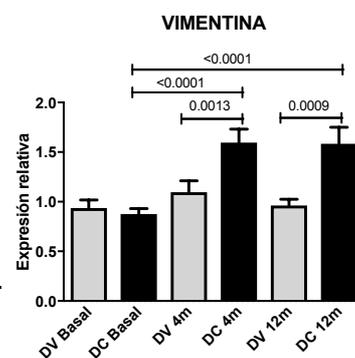
I



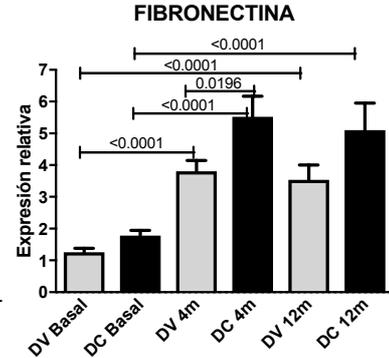
J



L



M



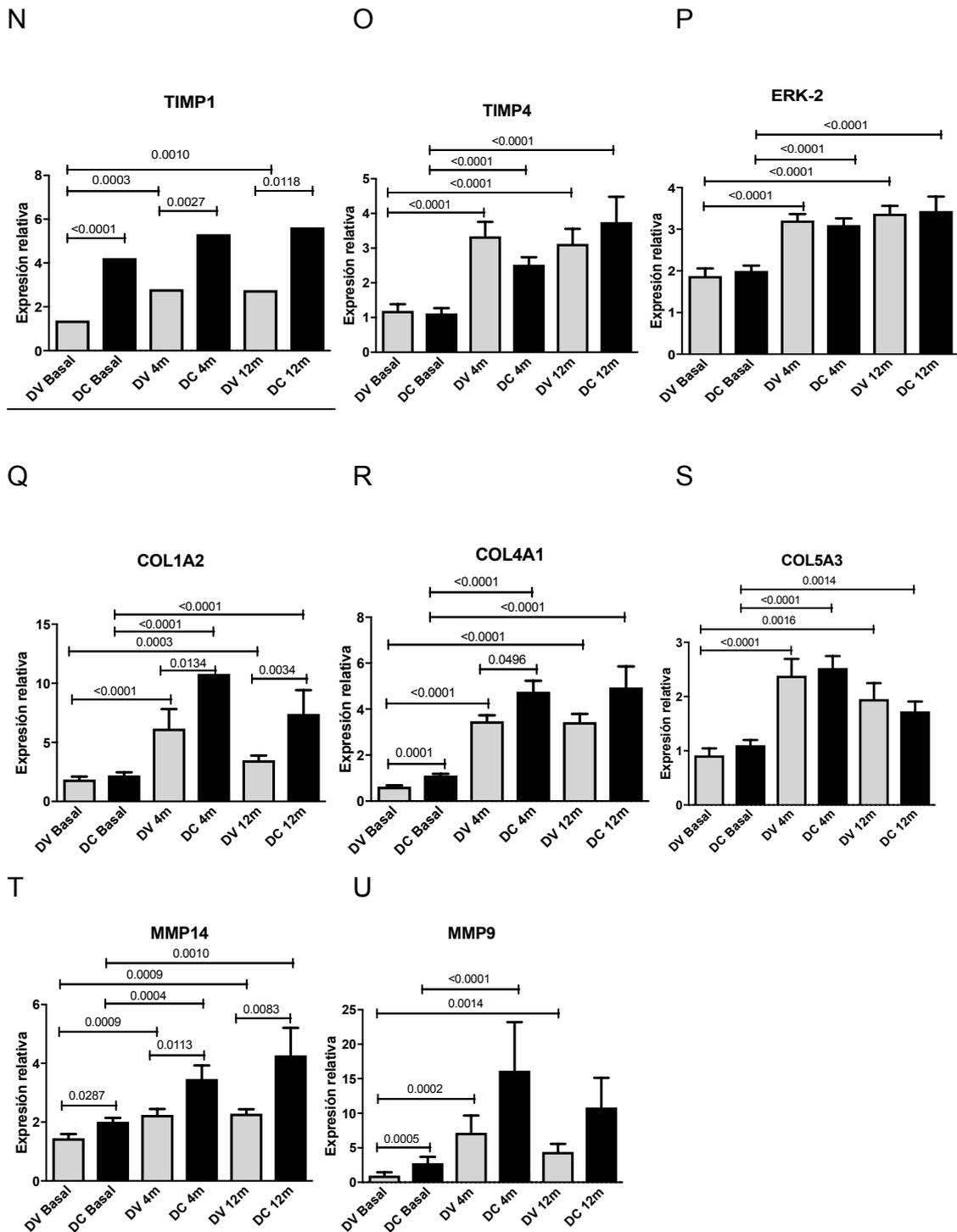


Figura 17 : Análisis de expresión génica de ARN-m en biopsias renales de DC (barras negras) y DV (barras grises) en tres tiempos: preimplante, 4 meses y 12 meses post trasplante. Datos de expresión génica relativa de marcadores pro-fibróticos incluidos CD206 (A), CD209 (B), CD163 (C), IL4R (D), STAT6 (E), IL10 (F), TGF- β 1 (G), SMAD4 (H), SNAIL1 (I), α SMA (J), vimentina (L), fibronectina (M), TIMP1 (N), TIMP4 (O), ERK-2 (P), COL1A2 (Q), COL4A1 (R), COL5A3 (S), MMP14 (T), MMP9 (U); se normalizaron usando la expresión media de tres controles endógenos (GUSB, GAPDH, y B-tubulina).

14.3. Correlación entre la expresión génica de proteínas pro-fibróticas y la función renal a medio y largo plazo.

En general, en las muestras de DC, la expresión génica de varias proteínas pro-fibróticas, tales como TGF- β , fibronectina, vimentina y α -SMA, a los 4 meses después del trasplante, exhibieron una correlación negativa estadísticamente significativa con TFG (MDRD) a largo plazo (Tabla 4A).

Por el contrario, la expresión génica de los mismo marcadores de fibrosis, en las muestras de DV, no presentaron correlación con la función renal a la largo plazo y solo TGF- β 1 y CD163 correlacionaron con la TFG a los 24 meses (Tabla 4B).

Cuando se analizó el incremento de la expresión génica de estos marcadores pro-fibróticos a los 4 meses en las muestras de DC, se observó una correlación negativa con la TFG a medio y a largo plazo. En los injertos de DV este incremento de la expresión génica de dicho marcadores no se correlacionó con la TFG a largo plazo (Tabla 5B).

Tabla 4: Correlaciones entre la expresión génica a los 4 meses con la función renal a medio y a largo plazo de las proteínas pro-fibróticas.

A

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
4 MESES	24 Meses		Último control (5,8 \pm 1 a)	
DC	p	rho Spearman	p	rho Spearman
CD209	0,0323	-0,4380	0,0471	-0,4091
CD163	0,0231	-0,4619	0,0010	-0,6281
CD206	0,0035	-0,5725	0,0012	-0,6204
IL-4R	0,0214	-0,4672	<0,0001	-0,7112
STAT6	0,0639	-0,4220	0,0038	-0,6036
TGF- β	0,0026	-0,5860	0,0000	-0,8287
α -SMA	0,0426	-0,4171	0,0070	-0,5358
Fibronectina	0,1182	-0,3275	0,0007	-0,6437
Vimentina	0,1086	-0,3359	0,0233	-0,4613

B

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
4 MESES	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
DV	p	rho Spearman	p	rho Spearman
CD209	0,8912	-0,0302	0,5676	-0,1257
CD163	0,0264	-0,4621	0,2747	-0,2378
CD206	0,2823	-0,2341	0,5958	-0,1167
IL-4R	0,3159	-0,2188	0,8683	0,0366
STAT6	0,0103	-0,5351	0,0836	-0,3772
TGF-β	0,0079	-0,5395	0,9643	-0,0099
α-SMA	0,6289	-0,1064	0,1132	0,3394
Fibronectina	0,0537	-0,4073	0,9002	0,0277
Vimentina	0,4146	-0,1787	0,5902	-0,1185

Tabla 5: Correlaciones de la diferencia entre la expresión génica a los 4 meses y basal con la función renal a medio y a largo plazo de las proteínas pro-fibróticas.

A

MDRD (ml/min/1,73m ²)				
Δ4M - basal	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
DC	p	rho Spearman	p	rho Spearman
CD209	0,0315	-0,6200	0,3541	-0,2937
CD163	0,0233	-0,6217	0,1744	-0,4011
CD206	0,0500	-0,5530	0,1497	-0,4231
IL-4R	0,0034	-0,7455	0,0112	-0,6758
STAT6	0,2254	-0,3604	0,4796	-0,2046
TGF-β	0,0210	-0,6300	0,0490	-0,5549
α-SMA	0,0958	-0,4814	0,1618	-0,4121
Fibronectina	0,0258	-0,6135	<0,0001	-0,9231
Vimentina	0,0196	-0,6355	0,0367	-0,5824

B

Δ4M - basal	MDRD (ml/min/1,73m²)			
	24 Meses		Último control (5,8±1 a)	
	p	rho Spearman	p	rho Spearman
DV				
CD209	0.2861	0.4000	0.0298	0.7167
CD163	1.0000	0.0000	0.6059	-0.2000
CD206	0.9661	-0.0167	0.7650	-0.1167
IL-4R	0.9661	-0.0167	0.7980	0.1000
STAT6	0,6615	0,2143	0,2000	0,5714
TGF-β	0.7650	-0.1167	0.8647	0.0667
α-SMA	0,9661	0.0167	0.9661	-0.0167
Fibronectina	0.4600	-0.2833	1.0000	0.0000
Vimentina	0.4064	-0.3167	0.0424	-0.6833

15. Correlación entre las variables clínicas con la función renal a largo plazo en el donantes cadáver

Inicialmente, el modelo lineal de regresión univariante con las variables clínicas indican que la edad del donante ($r = -0,555$, $p < 0,0001$), la edad del receptor ($r = -0,335$, $p = 0,014$), el tiempo de isquemia fría ($r = -0,318$, $p = 0,023$), la FRI ($r = -0,423$, $p = 0,002$) y ser DCE ($r = -0,450$, $p = 0,001$) son variables que predicen el último MDRD (ver Tabla 18). Sin embargo, en el análisis multivariante, incluidas las variables clínicas, histológicas y el análisis de ARNm, los factores independientes se reducían a los presentados en la tabla 7. Finalmente, el análisis multivariante indica que el TGF-β1 a los 4 meses es el mejor predictor bioquímico de MDRD a largo plazo ($r = -0,57$, $p 0,004$) y que la combinación de las variables FRI y TGF-β1 a los 4 meses explica casi un 50% de la función del injerto a largo plazo ($R^2 = 0,487$) (Figura 19). Durante el seguimiento no se observaron diferencias significativas cuanto a los niveles de tacrolimus entre ambos grupos.

Tabla 18: Análisis univariante de las variables clínicas

Variable		Creatinina_24M	MDRD_24M	Creatinina_FINAL	MDRD_FINAL
DCE	<i>Rho</i>	0,280*	-0,456	0,240	-0,450**
	<i>p</i>	0,042	0,001	0,083	0,001
FRI	<i>Rho</i>	0,512**	-0,540**	0,347*	-0,423**
	<i>p</i>	0,000	0,000	0,011	0,002
Edad (donante)	<i>Rho</i>	0,251	-0,470**	0,291*	-0,555**
	<i>p</i>	0,069	0,000	0,034	0,000
Sexo (donante)	<i>Rho</i>	0,062	-0,123	0,116	-0,179
	<i>p</i>	0,660	0,380	0,409	0,201
TIF (horas)	<i>Rho</i>	0,162	-0,338*	0,084	-0,318*
	<i>p</i>	0,255	0,015	0,556	0,023
Edad (receptor)	<i>Rho</i>	0,113	-0,302*	0,072	-0,335*
	<i>p</i>	0,419	0,028	0,610	0,014
Sexo (receptor)	<i>Rho</i>	0,197	-0,006	0,031	0,085
	<i>p</i>	0,157	0,963	0,823	0,544
Tiempo en TRS (a)	<i>Rho</i>	0,169	-0,221	0,091	-0,106
	<i>p</i>	0,225	0,113	0,519	0,448

* La correlación es significativa con una $p < 0,05$.

** La correlación es significativa con una $p < 0,01$.

Abr. *Rho*: correlación de Pearson, a : años, TIF: tiempo de isquemia fría, FRI: función retrasada del injerto, DCE: donantes con criterios expandidos.

Tabla 19: Coeficientes del análisis multivariante

Variable	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		
	B	Error Std	Beta	t	p
DCE	-6,973	5,510	-0,168	-1,265	0,230
FRI	-10,359	4,547	-0,321	-2,278	0,042*
TIF (h)	-0,830	0,733	-0,161	-1,132	0,280
TNF- α _4M	-0,128	0,367	-0,057	-0,348	0,734
CD80_4M	-0,592	0,660	-0,138	-0,896	0,388
TGF- β 1_4M	-5,432	1,552	-0,573	-3,500	0,004**

* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

B: coeficiente de regresión no estandarizado. Beta : coeficiente de regresión estandarizado.

16. Supervivencia renal

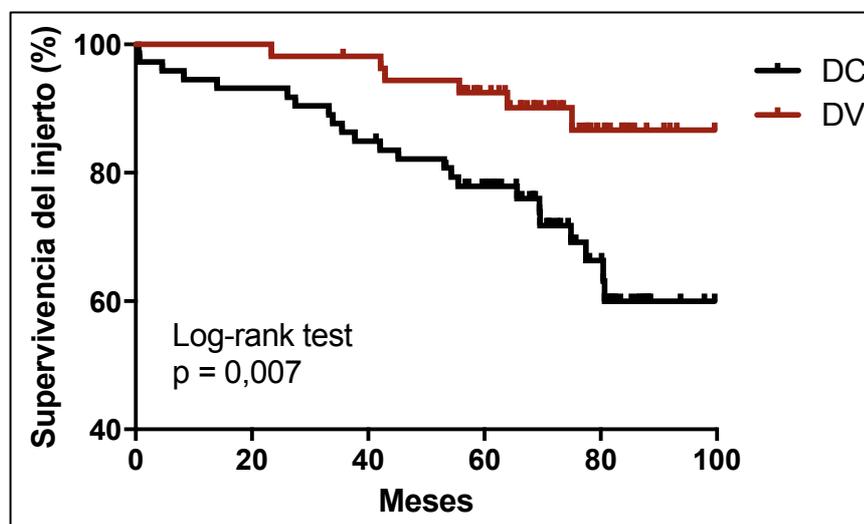
Se analizó la supervivencia del injerto de los pacientes estudiados. Veintiséis de los receptores (21%) perdieron el injerto en $4,2 \pm 1,8$ años. Las causas principales de pérdida del injerto fueron la disfunción crónica del injerto DCI (73%) y la muerte con injerto funcionando (27%). La media del tiempo de seguimiento fue de $5,8 \pm 1,0$ años.

La curva de supervivencia del injerto, sin censurar la muerte del receptor con riñón funcionando como causa de pérdida, se muestra en la Figura 20A. La supervivencia del injerto fue mayor en los receptores de DV que en los receptores de DC (86,6% versus 59,9%, respectivamente, $p = 0,007$ por log-rank), con un seguimiento de 99,6 meses ($8,2 \pm 1,2$ años).

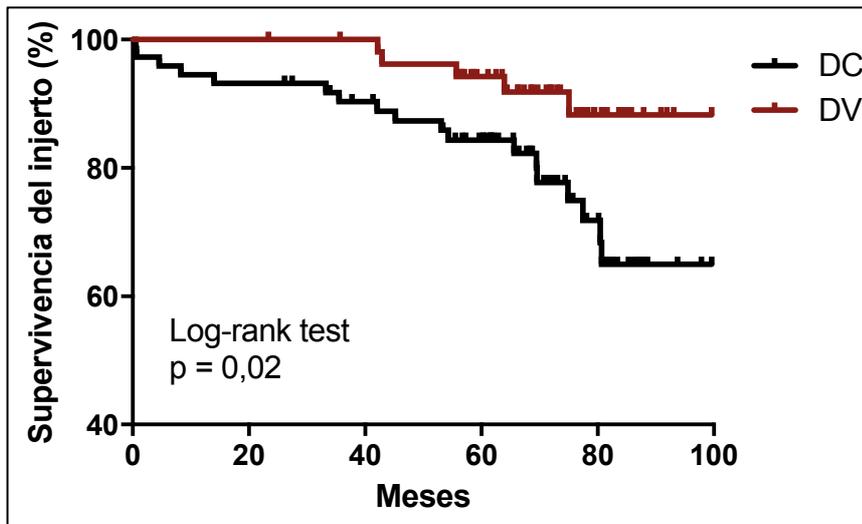
Si realizamos la curva de supervivencia del injerto censurando los *éxitus* de los receptores con injerto funcionando (Figura 20B), observamos un mayor porcentaje de supervivencia de ambos grupos (88,2% versus 64,9%). Sin embargo, la supervivencia del injerto continua siendo mayor en los receptores de DV comparado con los de DC ($p = 0,02$ por log-rank). Las tasas de supervivencia del injerto a los 5 y 8 años están resumidas en la tabla 21.

Tras censurar los casos de muerte con injerto funcionando, la tasa de supervivencia del injerto a los 99,6 meses fue de 70,7% versus 62,2%, en el grupo de DEST y DCE, respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,03$) (Figura 20C).

A



B



C

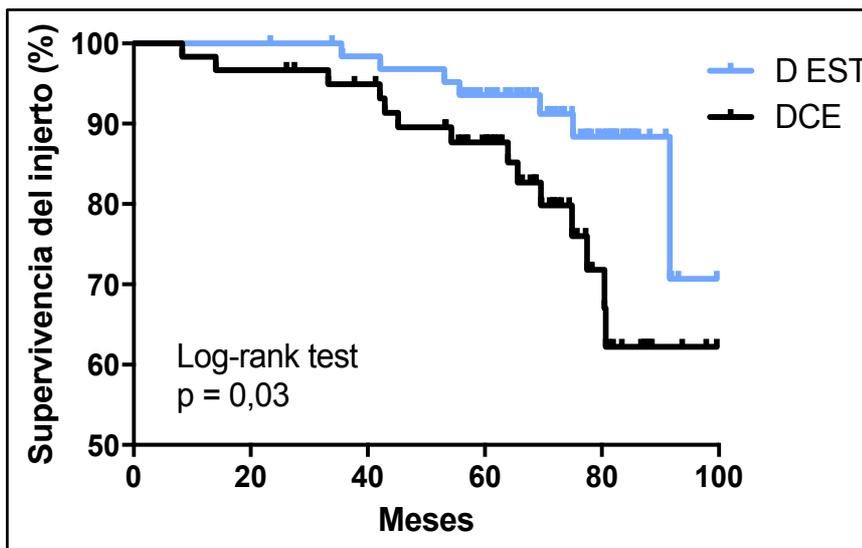


Figura 20: Curvas de Kaplan-Meier que representan el porcentaje de la supervivencia del injerto por unidad de tiempo en meses, aplicando el test de log-rank.

(A) Tasa de supervivencia del injerto, no censurado, para ambos grupos; (B) Tasa de supervivencia del injerto, censurando los fallecimientos de pacientes con injertos normofuncionantes. DV (línea roja) y en DC (línea negra). (C) Tasa de supervivencia del injerto, censurando los fallecimientos, entre donantes EST (línea azul) y DCE (línea negra). Se consideró la obtención de una $p < 0,05$ como nivel de significación y el 95% como intervalo de confianza. **Abr:** DV: donante vivo, DC: donante cadáver, D EST: donante estándar, DCE: donante con criterios expandidos.

Tabla 21: Tasa de supervivencia del injerto, censurando los éxitus.

Tasa de supervivencia	2 años	5 años	8 años
DV	100 %	94,2 %	88 %
DC	93,1 %	84,3 %	65 %

En resumen, en este estudio, los resultados demuestran que la biopsias basales de DC presentaban una mayor expresión génica de proteínas pro-inflamatorias, de receptores de superficie de macrófagos M1 y un mayor reclutamiento e infiltrado de macrófagos (CD68+), comparado con las muestras de DV. A su vez, estas muestras también presentaban una mayor expresión de proteínas pro-fibróticas y de marcadores de superficie de macrófagos M2 (Figura 22).

A los 4 meses después del trasplante, la expresión génica de proteínas pro-inflamatorias permanece elevada en las muestras de DC y presenta un incremento en las muestras de DV. La expresión génica de proteínas inductoras de la TEM aumenta en ambos grupos pero es significativamente más elevada en las muestras de DC (Figura 23).

A los 12 meses post trasplante, se observó un incremento de la expresión de algunas proteínas relacionadas con la inflamación crónica en las muestras de DC y la expresión de proteínas pro-fibróticas persiste significativamente más elevada en DC comparado con DV (Figura 23).

La expresión génica de algunas proteínas pro-fibróticas a los 4 meses post trasplante se correlacionó con un mayor grado de fibrosis a los 12 meses según la Clasificación de Banff, en las muestras de DC (Figura 24).

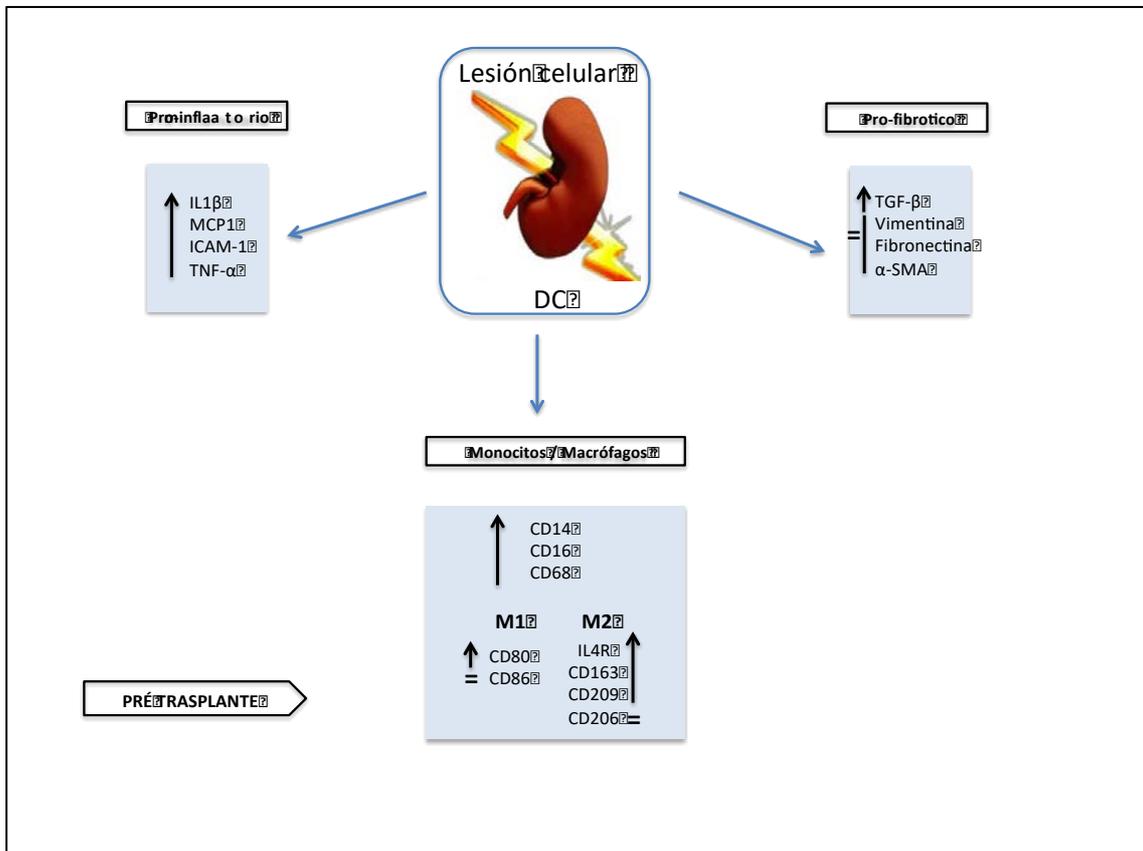


Fig. 22: Resumen esquemático de la inmunohistoquímica y expresión génica de proteínas pro-inflamatorias, pro-fibróticas y de marcadores de superficie de macrófagos M1 y M2 en las muestras basales de DC. (↑) representa una mayor expresión comparado con las muestras de DV y (= |) representa que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

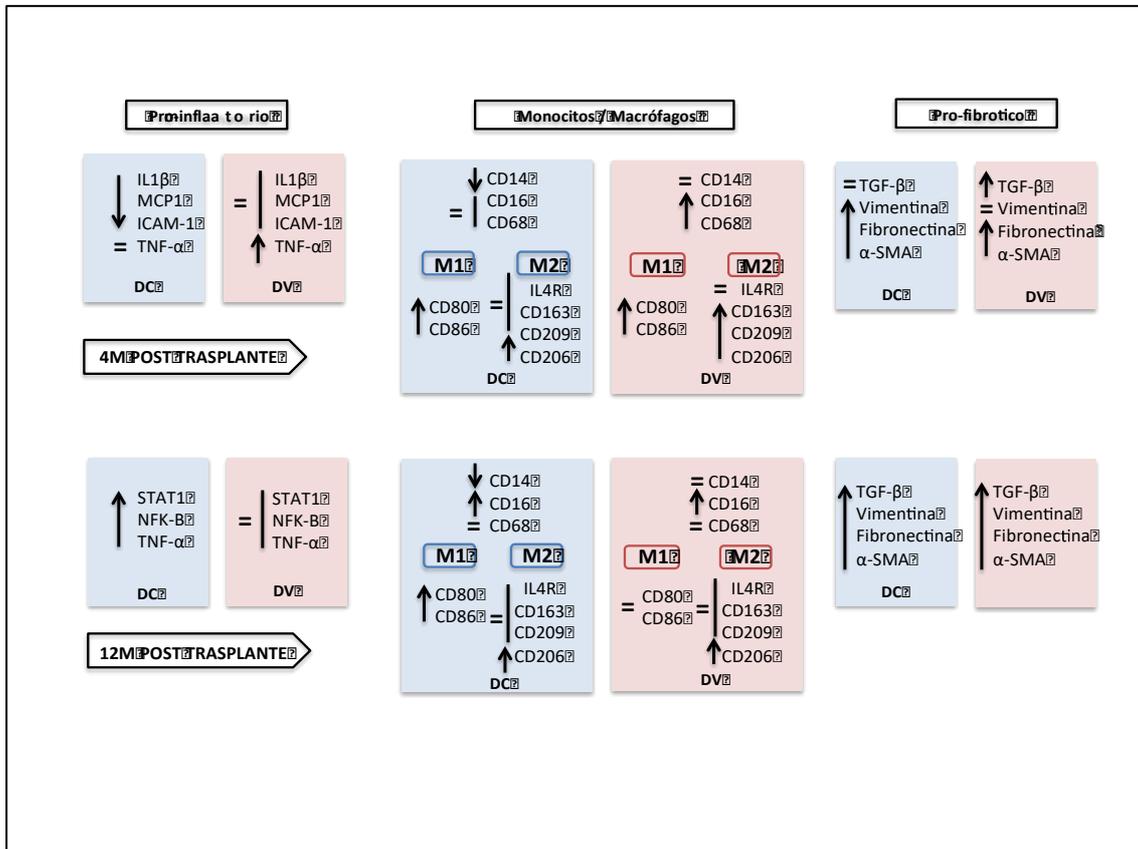


Fig. 23: Resumen esquemático de la de la inmunohistoquímica y expresión génica de proteínas pro-inflamatorias, pro-fibróticas y de marcadores de superficie de macrófagos M1 y M2 a los 4 y 12 meses post-trasplante, en las muestras de DC y de DV. (↑) representa un incremento de la expresión génica comparado con las muestras pre-implante, (↓) representa una disminución significativa de la expresión y (=) representa que no hubo cambios significativos entre los tiempos.

Banff score		CD68 basal	TGF-β1 (4m)	IL4R (4m)	CD163 (4m)
$i \geq 1$ (4m)	p	0,004	0,032	-	-
$ci \geq 1$ y $ct \geq 1$ (12m)	p	-	0,04	0,004	0,007

Fig. 24: Resumen de la relación entre la puntuación de Banff de inflamación y el infiltrado de células CD68+ basal y entre la puntuación de Banff de fibrosis y la expresión génica de marcadores de superficie de macrófagos M2.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio confirmamos, como está ampliamente demostrado, que el TR de DC tiene peor supervivencia que el trasplante procedente de DV (18,20,22,40,278,279) y analizamos múltiples factores clínicos, histopatológicos y mediadores moleculares potencialmente lesivos, no sólo post-trasplante renal, sino que además extendemos dichos análisis al período preimplantacional (basal). De hecho, esta mejor supervivencia del injerto en los receptores de DV ha sido atribuida, al menos en parte, a las mejores u óptimas condiciones de los injertos procedentes de donantes sanos asociadas a un menor tiempo de isquemia fría (21,41). Obviamente, los injertos procedentes de DC experimentan períodos prolongados de almacenamiento en frío y además estos donantes pueden sufrir eventos traumáticos o noxas asociadas al manejo de cuidados intensivos, a la causa de la muerte y al daño fisiopatológico asociado al proceso de fallecimiento (280). Además tanto los donantes como los receptores de injertos cadáver son más añosos y con varias comorbilidades que pueden ser atribuibles al mayor tiempo en TRS (278,279,281–283).

El elevado porcentaje de FRI en nuestra población se podría explicar por el mayor número de DCE, ya que la edad mayor de 60 años se ha relacionado claramente con una mayor incidencia de FRI (38,284–288). Aunque el uso de injertos procedentes de DCE haya aumentado y permitido la disminución de las listas de espera, existe un cierto grado de preocupación sobre la función subóptima del injerto con este tipo de donantes (289,290) y su asociación con la disminución de la supervivencia a largo plazo (286,291–294). De hecho, nuestros resultados demuestran, tanto en nuestro análisis univariante como multivariante, que no sólo la presencia de FRI está estrechamente asociada de modo independiente a la función renal a largo plazo sino que además los DCE tienen menor supervivencia en comparación con los donantes estándar.

Numerosos factores *pre-trasplante* parecen incidir en la supervivencia del injerto, en general, nuestros resultados sugieren que el estado inflamatorio inicial, el infiltrado precoz de macrófagos y, principalmente, la inflamación sostenida presente en los DC pueden jugar un papel importante en la función del injerto a largo plazo.

Ya había sido descrito que, en los injertos renales de DC, la inflamación precede a la implantación del órgano y ese daño temprano de los órganos cadavéricos los haría más susceptibles a eventos fisiopatológicos e inmunológicos dañinos después del trasplante (22,141). Así, es conocido que tras la muerte encefálica del donante, se producen una serie de alteraciones con liberación de citocinas y catecolaminas que generan una disfunción endotelial (295). Estudios previos realizados en modelos animales (140,296–298) y algunos realizados en humanos (141,299,300) observaron una mayor expresión génica de citoquinas inflamatorias en los riñones de los donantes durante la muerte cerebral. En un estudio muy reciente, Mazeti-Felicio y cols. (301) observaron que los DCE presentaban una mayor expresión génica de citoquinas inflamatorias en las biopsias pre-implantacionales en comparación con DEST, sugiriendo que esta diferencia podría estar relacionada con la activación de la inmunidad innata (mediada por células T) independiente del complejo mayor de histocompatibilidad, inducido por isquemia y desencadenado por la inflamación.

Además, este aumento de la inflamación basal se ha asociado significativamente con un tiempo de isquemia fría más largo debido a la activación de una secuencia compleja de eventos que sostendrían el daño renal (p. ej. Inducido por radicales libres) y también a través de la liberación de diversas citoquinas proinflamatorias (280,302). La LIR puede así condicionar desde una disfunción inicial leve del injerto trasplantado hasta, en mayor grado, una disfunción que condicione una limitación de la supervivencia del injerto (49).

En nuestro estudio, de los pocos realizados con biopsias de riñones humanos, los resultados expanden otras observaciones previas mostrando que los inductores de la respuesta inflamatoria inicial, las moléculas de adhesión y reclutamiento de monocitos, los marcadores de superficie de macrófagos M1 y las citoquinas proinflamatorias producidas por dichos macrófagos, presentan una mayor expresión en injertos de DC en comparación con los de DV en el momento del trasplante. Estos resultados confirman que hay una activación inflamatoria importante en los injertos de DC antes de la implantación y este argumento está reforzado por la observación de que estos injertos presentaron

un elevado número de macrófagos CD68 positivos intersticiales evaluados por inmunohistoquímica.

En este sentido, otros estudios previos describieron que el infiltrado de macrófagos a nivel glomerular, peritubular y/o perivascular, evaluados post-TR, se correlacionó con una peor función renal al analizar el rechazo del aloinjerto, independientemente del tipo de donante (303–308). Del mismo modo, en un estudio reciente, Brasën y cols. (309) analizaron 67 biopsias renales de protocolo a las 6 semanas post-trasplante y observaron que el mayor infiltrado intersticial de CD68+ se correlacionó inversamente con la menor TFG y directamente con el número de rechazos a los 4 años post trasplante. En otros tipos de trasplante, estudios como el de Jassem y cols. (310) en biopsias *hepáticas pre-implante*, mostraron diferencias significativas en el infiltrado de macrófagos CD68+ entre DC y DV; sin embargo este infiltrado no se correlacionó con la función del injerto hepático durante la estancia hospitalaria después del trasplante.

Es importante resaltar que en nuestro estudio, no solo hemos comparado el infiltrado intersticial de macrófagos entre los dos *tipos diferentes de donantes*, DC y DV, sino además hemos demostrado que el mayor infiltrado de macrófagos CD68+ en los injertos de DC *pre-implantación* presentó una correlación negativa significativa con la función del injerto *a largo plazo*. Esta observación expande los hallazgos de Brasën y cols. mencionados, que fueron descritos en biopsias de protocolo tempranas post-TR y con un período de seguimiento más corto (309). Todo ello, parece poner en evidencia el impacto del estado inflamatorio renal ya antes del trasplante en la futura función del injerto. Por otro lado, nuestros resultados con las muestras de DV revelarían que el aumento del infiltrado de macrófagos que se produce después del trasplante (y que no alcanza la intensidad de la infiltración de los DC) está muy probablemente asociado a eventos post-trasplante que parecen afectar a la función renal a medio plazo pero no a largo plazo.

Cuando analizamos el proceso inflamatorio que ya está activado en el momento de la implantación encontramos concordancia con otros estudios como el de Kim y cols. que compararon la expresión de varias citoquinas inflamatorias en el momento de la implantación y observaron una mayor expresión génica de TNF- α , IFN- γ e IL-10 en injertos de DC (311). Otros

estudios que analizaron el impacto de la inflamación pre-implante en el DC, también demostraron una mayor expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (141,299,312,313) y de MCP-1 (314), comparado con los injertos de DV; sin embargo, estos estudios no analizaron la relación entre la expresión de las moléculas mencionadas con la función renal a *largo* plazo. Nuestros resultados proporcionan una nueva información al mostrar que los riñones procedentes de DC presentan no solo mayor expresión génica de dichas citoquinas pro-inflamatorias antes de la implantación sino que también evidencian el impacto del infiltrado de macrófagos basal sobre la evolución del injerto a largo plazo.

A los 4 meses del trasplante, la inflamación parece persistir en los riñones procedentes de DC. El incremento de inflamación, así como del infiltrado de CD68+ en estas muestras, se correlacionaron con la función renal a largo plazo para la mayoría de estas proteínas. Por ejemplo, hemos observado una mayor expresión de TNF- α en las muestras basales de biopsias de DC comparado con DV y esta expresión incrementó progresivamente y de forma significativa en el primer año del trasplante en los DC. Los macrófagos M1, a través de TNF- α , pueden perpetuar la inflamación, condicionando el empeoramiento del proceso de cicatrización de lesiones inflamatorias (315), por lo que, el mantenimiento de la inflamación estaría así involucrado en el pronóstico del injerto. Sumándose a todos estos hallazgos, al analizar las muestras a los 4 meses post-trasplante según la clasificación de Banff, se observó que la persistencia de inflamación en las biopsias de DC también se correlacionaba con el infiltrado de macrófagos basal y la vez con la menor TFG a largo plazo. Todo ello, es indicativo del efecto de la persistencia del estado inflamatorio basal en la función de estos injerto.

Por otro parte, llama la atención que a pesar de un aumento significativo de la expresión génica de proteínas pro-inflamatorias en los receptores de DV, este incremento no influyó significativamente en la función renal a largo plazo. Globalmente, todas estas observaciones sugieren que no sólo la inflamación inherente al trasplante, causada por mecanismos inmunológicos, por infecciones o por inmunosupresores nefrotóxicos, condicionan la mala

evolución del injerto, sino que la persistencia del estado inflamatorio inicial también parece tener un papel relevante en el pronóstico del injerto.

Por otra parte, es bien conocido que la fibrosis renal casi siempre está precedida por una inflamación crónica (104,105,316,317). En estudios realizados con biopsias de protocolo seriadas, se observó que la presencia de tubulitis e infiltrado intersticial en la primera biopsia se asoció con un mayor riesgo de progresión de FI/AT en la segunda biopsia, sugiriendo que la inflamación precoz del injerto es un factor de riesgo para la progresión de las lesiones crónicas (61,116,318–321).

En nuestro estudio también hemos mostrado cómo el DC, antes de la implantación del injerto, ya presentaba una mayor expresión de receptores de macrófagos pro-fibróticos, tales como el IL4R, CD209, CD163, de citoquinas pro-fibróticas como TGF- β 1 y de factores de transcripción inductores de TEM, como el SNAIL1 y STAT6. De modo que hemos demostrado que la inflamación, el reclutamiento de monocitos y la coexistencia de activación de los macrófagos por las vías M1 y M2 ya ocurren en los riñones de DC antes del trasplante y que estos eventos no se detectan en las muestras de DV. El tipo de donante, por lo tanto, implicaría el desarrollo de una serie de sucesos diferenciales que condicionarían una infiltración de macrófagos con distintos fenotipos, y que podrían tener un impacto distinto en la inflamación y en la reparación posterior del riñón.

Como hemos comentado anteriormente, los macrófagos también juegan un papel relevante en la resolución de la inflamación (224). De este modo, en condiciones normales, la inducción de un estado de activación M2 es necesaria para la proliferación celular y la reparación después de un daño tisular, seguido de una fase de resolución inmunosupresora con el fin de evitar el desarrollo de fibrosis crónica progresiva (224,225). Sin embargo, ante una lesión persistente y una inflamación sostenida, la infiltración mantenida de macrófagos M2 puede resultar en el reclutamiento de fibroblastos, así como la síntesis excesiva y la remodelación del tejido conectivo (155). En este contexto, los macrófagos M2c pueden producir un aumento en la secreción de TGF- β 1, entre otras a través de la vía de señalización STAT6 que induce un aumento de la expresión de sus

receptores TGFBR2 y TGFBR1, así como de la expresión de otros genes ligados a la generación de fibrosis (248).

Nuestros resultados, a los 4 meses post-trasplante, no sólo muestran que la inflamación persiste en los riñones procedentes de DC sino que a la vez se incrementa de modo significativo la expresión génica de citoquinas pro-fibróticas, inductoras de la TEM (i.e. α -SMA, proteína que se expresa en los miofibroblastos), y de remodelación-regulación de la MEC (i.e. TIMP1, inhibidor de las MMPs), moléculas que permanecen en general significativamente más elevadas en los injertos de DC y se correlacionan inversamente con la función renal a largo plazo. Estos datos, junto con el incremento significativo de expresión génica de marcadores de células mesenquimales como fibronectina y vimentina, y finalmente de proteínas del colágeno sugeriría la inducción y mantenimiento del proceso de fibrosis. Además, mostramos cómo el fenotipo de los macrófagos M2, a este tiempo, se correlaciona con la fibrosis a los 12 meses, según la clasificación de Banff y con la función renal a largo plazo en las muestras de DC. Estos resultados corroboran y amplían significativamente las conclusiones de estudios previos que demuestran que la infiltración de macrófagos en biopsias de aloinjertos renales se asocia a la FI/AT posterior y a la supervivencia del injerto (94,118,322,323).

En este sentido, un estudio reciente con biopsias de protocolo obtenidas al año post-TR de Toki y cols. (94) mostró que el mayor infiltrado de macrófagos M2 (co-expresión de CD206 y CD68) se correlacionaba con una mayor inflamación, con la progresión de la fibrosis y a la vez con una peor función renal a los 3 años post trasplante mientras que otro estudio (324) sugirió que la inflamación subclínica junto a la fibrosis intersticial progresiva en aloinjertos renales puede conducir a la disfunción del injerto.

Por otro lado, cuando analizamos las muestras procedentes de DV, se observó que la inflamación y la fibrosis estuvieron prácticamente ausentes en las muestras basales. En este grupo, la falta de correlación entre el incremento de la expresión génica de los macrófagos M2 durante los 4 meses post-trasplante y la función del injerto, sugiere que la fibrosis, cuando está precedida de inflamación, parece tener una peor evolución o, dicho de otro modo

formulándose a la inversa, que la fibrosis, cuando no está precedida de inflamación, podría tener una mejor evolución o pronóstico. De hecho, ya se ha descrito previamente en biopsias de protocolo que los pacientes con inflamación y fibrosis tenían una peor supervivencia del injerto comparado con los pacientes que sólo muestran inflamación o fibrosis (85,103,119,324–326) pero en la mayoría de estos estudios tampoco se analizaron muestras basales para poder subrayar la potencial importancia de la activación inflamatoria preimplantacional que hemos mostrado.

En el trasplante renal, los eventos inflamatorios tempranos son considerados esenciales en el reclutamiento y la diferenciación de miofibroblastos. En estudios de fibrosis, quimiocinas como MCP-1 y CCL3 son importantes en el reclutamiento de macrófagos y miofibroblastos (327) y éstos, a su vez, son un componente central de la respuesta inflamatoria temprana asociada a la fibrosis intersticial y a la pérdida del injerto (94,307,328). Nuestros resultados mostraron una mayor expresión génica de MCP-1 en los injertos de DC, desde el momento preimplantacional hasta el primer año post-trasplante, comparado con los DV y se correlacionó inversamente de modo significativo con la TFG a medio pero también a largo plazo. De hecho, MCP-1 parece estar involucrado no solo en el reclutamiento de monocitos, sino también en el inicio, perpetuación y progresión del daño intersticial y en la fibrosis (329). En base a esto, un aumento de la expresión de MCP-1 podría ser indicativo de una peor función del injerto.

Asimismo, la persistencia casi constante de la expresión de proteínas inflamatorias durante el primer año en las biopsias procedentes de DC, parecería confirmar que la inflamación no resuelta después de una lesión persistente es un inductor importante de fibrogénesis, ya que crea un círculo vicioso de inflamación, daño tisular y fibrosis. En este sentido, a los 12 meses post-trasplante, observamos que la expresión de proteínas pro-fibróticas persiste significativamente más elevada en DC comparado con DV. Además en los injertos de DC, el incremento de la expresión génica de marcadores de proteínas de la MEC, como α -SMA y vimentina, así como la disminución de la expresión de MMP9, sugerirían la presencia de un desequilibrio a favor del

depósito excesivo y prolongado de MEC y/o insuficiente degradación. Este desequilibrio sería el responsable final del proceso de fibrogénesis que, en último término, puede llegar a comprometer la integridad mecánica y funcional del injerto renal. En este sentido, es importante destacar que nuestros resultados muestran en el análisis multivariante que, entre las múltiples variables de expresión génica analizadas, la expresión de TGF- β_1 a los 4 meses del trasplante sería el único predictor *independiente* de la función renal a largo plazo. En realidad, es ampliamente conocido y aceptado que el TGF- β_1 desempeña un papel importante en la fibrogénesis (330) y varios estudios realizados en animales han establecido el TGF- β como el factor patógeno predominante o "regulador principal" en el desarrollo de la fibrosis renal. Asimismo, múltiples estudios previos sobre biopsias de protocolo de injertos renales post-trasplante concuerdan en que la fibrosis intersticial se correlaciona con una peor función y supervivencia del injerto (70,81,104,331–336). Por otra parte es de resaltar que, en las últimas décadas, la incidencia de rechazo agudo ha disminuido considerablemente (337) y la supervivencia del injerto a corto plazo también ha mejorado debido al desarrollo de nuevas pautas inmunosupresoras. Este beneficio, sin embargo, no se refleja en una mejoría significativa de la supervivencia del injerto a largo plazo (64,338,339).

A pesar de los avances en la inmunosupresión, a día de hoy, no hay una terapia capaz de controlar de modo significativo el desarrollo de la fibrosis (123). Por otra parte, *no* es un argumento en contra del papel relevante del TGF- β el hecho de que se hayan mostrado poco viables las terapias dirigidas directamente contra el mismo, dadas las múltiples acciones pleiotrópicas (a veces incluso contradictorias) de esta citoquina. Tampoco están totalmente esclarecidos los mecanismos que enlazan la inflamación y la fibrosis del injerto renal, ni las vías de señalización por las cuales la inflamación promueve fibrosis. Quizá podríamos mejorar sustancialmente las tasas de supervivencia a largo plazo del injerto a través de la clarificación de estos mecanismos o el estudio de las vías específicas de señalización asociadas (y sobre las que aportamos datos preliminares).

Mientras tanto, ante la ausencia de una terapia antifibrótica directa eficaz, nuestros datos demuestran también (análisis multivariante) la importancia de la prevención de los múltiples factores que condicionan la FRI, al menos en los

trasplantes procedentes de DC, con el fin de mejorar la función renal a largo plazo y subrayan la potencial importancia del estado inflamatorio precoz y persistente.

Es posible que, en el futuro, con la optimización de las condiciones para la recuperación de órganos así como el desarrollo y tratamiento con inhibidores de moléculas proinflamatorias y/o profibróticas más específicas, especialmente *antes* de la implantación del injerto en DC, se pueda mejorar los resultados del trasplante renal de cadáver hacia las tasas de éxito observadas en el trasplante de DV.

Finalmente mencionar que este estudio tiene ciertas limitaciones, fundamentalmente inherentes a la recogida de muestras. Debido a problemas técnicos, contraindicaciones médicas de la biopsia, o no consentimiento del paciente, no pudimos recoger las muestras en los 3 momentos (basal, 4m y 12m) de todos los pacientes. Además, en algunas biopsias sólo fue posible obtener un cilindro de cada muestra. De manera que, no tenemos una representación de la evolución en el tiempo de cada paciente. Por otra parte debemos reconocer que, aparte de la variabilidad inherente a un solo observador o a las limitaciones técnicas de la PCR cuantitativa, no se confirmó el resultado de las técnicas de expresión génica con la cuantificación de las proteínas estudiadas a través de técnicas de inmunoensayo. Por último, la elección de las moléculas analizadas se han limitado a las que se ajustaban a la hipótesis propuesta, a las experiencias personales o líneas previas de trabajo del grupo y *no* por las técnicas de “microarrays” (excesivamente caras) que permitirían analizar la expresión diferencial de un mucho mayor número de moléculas.

Por otra parte, como fortalezas principales, a diferencia de la mayoría de publicaciones previas, hemos analizado cuantitativamente en las biopsias de protocolo la progresión de la *inflamación* y *fibrosis* en un mismo estudio y, además, éste se realizó desde el momento preimplantacional hasta el año post-trasplante, comparando diferentes tipos de donantes y con un largo tiempo de evolución. Además, se usaron no sólo técnicas inmunohistoquímicas y las clásicas de anatomía patológica (incluyendo Remuzzi y Banff), sino

además, técnicas complejas cuantitativas de biología molecular que permitieron la cuantificación de un gran número de moléculas y marcadores celulares que, por su naturaleza, precisan de amplificación previa. En este sentido se proporcionan incluso datos preliminares sobre diferentes vías de señalización intracelulares. Por otra parte, el número de pacientes incluidos (DV y DC) en nuestra serie es mayor que en muchos de los estudios previos publicados y la inclusión de DV como grupo de control nos permite no sólo generar hipótesis sino también realizar inferencias sobre potencial causalidad con mayor robustez estadística, incluyendo incluso análisis multivariante que está ausente en numerosos estudios.

En conclusión, nuestros resultados confirman que los macrófagos desempeñan un papel importante en la mediación de la inflamación persistente y la inducción de fibrosis, especialmente en receptores de DC, a través de la producción de TGF- β_1 . El incremento de TGF- β_1 se produce ya en el período temprano post-trasplante (primeros 4 meses) y se asocia, a diferencia de otros estudios y de modo *independiente*, a la función renal a largo plazo del mismo modo que la FRI. En conjunto, nuestros datos sugieren que la presencia de un estado inflamatorio inicial (ya previo al trasplante) podría condicionar el futuro del injerto no sólo a corto sino también a largo plazo. Un control más específico de la inflamación del donante podría suponer, por lo tanto, un potencial terapéutico para minimizar la fibrosis renal progresiva y mejorar los resultados del trasplante renal de DC hacia las tasas de éxito observadas en el trasplante de DV.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se confirma el peor pronóstico a largo plazo de los receptores que reciben un injerto procedente de DC.
2. En los receptores de DC la inflamación precede la implantación y esta inflamación persiste durante el primer año post-trasplante. La persistencia de la inflamación en este tipo de donantes se asocia a un aumento de la fibrosis y una peor función del injerto a medio y a largo plazo.
3. En el DC existe una relación entre el fenotipo M2 de los macrófagos y la fibrosis, así como con la evolución de la función renal del injerto a largo plazo.
4. En nuestro estudio, la inducción temprana de la inflamación en el receptor de DC incluye la activación de la vía intracelular clásica $TNF\alpha$ - $NF\kappa B$, el reclutamiento e infiltración de monocitos/macrófagos, así como la actividad de factores inductores del cambio de fenotipo de macrófagos.
4. Tanto la FRI como la expresión génica de $TGF-\beta_1$ a los 4 meses post-trasplante se relacionaron independientemente con la función renal a largo plazo.
5. Las vías de activación antiinflamatorias de los macrófagos y el aumento de $TGF-\beta_1$ se asocian al desarrollo de fibrosis y contribuyen significativamente a las diferencias de pronóstico a largo plazo entre DC y DV.

IX. LINEAS DE FUTURO

- ✓ Determinar si la inflamación previa al trasplante en el **DCE** condiciona una peor supervivencia comparado con los donantes estándar y DV.

- ✓ Realizar estudios de expresión de proteínas y analizar las vías intracelulares que están implicadas en el desarrollo de inflamación y fibrosis del injerto renal.

- ✓ Determinar el perfil inflamatorio a nivel serológico y el fenotipo de los monocitos circulante del donante y su relación con el pronóstico del injerto tras el trasplante.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Levey AS, Eckardt K-U, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int. Elsevier*; 2005 Jun 1;67(6):2089–100.
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA. American Medical Association*; 2007 Nov 7;298(17):2038.
3. Otero A, Gayoso P, Garcia F, De Francisco ÁL. Epidemiology of chronic renal disease in the Galician population: Results of the pilot Spanish EPIRCE study. *Kidney Int. Elsevier*; 2005 Dec 1;68(Suppl 99):S16–9.
4. Stevens LA, Coresh J, Levey AS. CKD in the Elderly—Old Questions and New Challenges: World Kidney Day 2008. *Am J Kidney Dis. W.B. Saunders*; 2008 Mar 1;51(3):353–7.
5. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med. Massachusetts Medical Society*; 2004 Sep 23;351(13):1296–305.
6. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: Identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis. Elsevier*; 1996 Mar 1;27(3):347–54.
7. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int. Elsevier*; 1995 Jan 1;47(1):186–92.
8. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *N Engl J Med. Massachusetts Medical Society*; 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
9. Arrieta J. Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal(Hemodiálisis, Diálisis Peritoneal y Trasplante) en España. *Rev Nefrol. 2010;1(Supl Ext 1):37–47.*
10. Cosio FG, Pesavento TE, Kim S, Osei K, Henry M, Ferguson RM. Patient survival after renal transplantation: IV. Impact of post-transplant diabetes. *Kidney Int. Elsevier*; 2002 Oct 1;62(4):1440–6.
11. Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chavers B, Foley R, Gilbertson D, et al. United States Renal Data System 2006 Annual Data Report Abstract. *Am J Kidney Dis. 2007 Jan;49(1 Suppl 1):A6–7.*
12. Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen S-C. United States Renal Data

- System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl.* Nature Publishing Group; 2015 Jun;5(1):2–7.
13. Rao PS, Schaubel DE, Wei G, Fenton SSA. Evaluating the Survival Benefit of Kidney Retransplantation. *Transplantation.* 2006 Sep 15;82(5):669–74.
 14. Ojo A, Wolfe RA, Agodoa LY, Held PJ, Port FK, Leavey SF, et al. Prognosis after primary renal transplant failure and the beneficial effects of repeat transplantation: multivariate analyses from the United States Renal Data System. *Transplantation.* 1998 Dec 27;66(12):1651–9.
 15. Murray J, Merrill J, Harrison J. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum.* 1955;6:432–6.
 16. MERRILL JP, MURRAY JE, HARRISON JH, GUILD WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc.* 1956 Jan 28;160(4):277–82.
 17. Gil-Vernet JM, Caralps A. Human renal homotransplantation. New surgical technique. *Urol Int.* Karger Publishers; 1968;23(3):201–23.
 18. Mange KC, Joffe MM, Feldman HI. Effect of the Use or Nonuse of Long-Term Dialysis on the Subsequent Survival of Renal Transplants from Living Donors. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):726–31.
 19. Fehrman-Ekholm I, Thiel G. Long-term risks after living kidney donation. *Living Donor Kidney Transplantation.* CRC Press; 2005. p. 99–112.
 20. Kasiske BL, Snyder JJ, Matas AJ, Ellison MD, Gill JS, Kausz AT. Preemptive kidney transplantation: the advantage and the advantaged. *J Am Soc Nephrol.* American Society of Nephrology; 2002 May 1;13(5):1358–64.
 21. Guirado L, Vela E, Clèries M, Díaz JM, Facundo C, García-Maset R, et al. [Why renal transplant from living donors gives better results than cadaver renal transplant?]. *Nefrologia.* 2008;28(2):159–67.
 22. Koo DDH, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle S V. Cadaver versus living donor kidneys: Impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int.* Elsevier; 1999 Oct 1;56(4):1551–9.
 23. Caballero, F. MR. Manual de Donación y Trasplante de Órganos Humanos [Internet]. 2015. p. cap 16. Available from: <http://www.coordinaciontrasplantes.org/index.php/indice-de-capitulos>
 24. Singhal AK, Sheng X, Drakos SG, Stehlik J. Impact of Donor Cause of Death on Transplant Outcomes: UNOS Registry Analysis. *Transplant Proc.* 2009 Nov;41(9):3539–44.
 25. Reich DJ, Mulligan DC, Abt PL, Pruett TL, Abecassis MMI, D'Alessandro A, et al. ASTS recommended practice guidelines for controlled donation after cardiac

- death organ procurement and transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9(9):2004–11.
26. Donación en asistolia en España. Documento de Consenso Nacional. 2012. p. 65–6.
 27. Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML, et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transplant.* 2002 Sep;2(8):701–11.
 28. Memoria de Actividad. ONT [Internet]. 2017. p. 3. Available from: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria Donación 2017.pdf>
 29. Zhu D, Everly MJ. Deceased donor kidney transplantation in the United States from 1988 to 2011: an analysis of the OPTN/UNOS registry. *Clin Transpl.* 2012;1–12.
 30. McLaren A, Jassem W, Gray D, Fuggle S, Welsh K, Morris P. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant.* Wiley/Blackwell (10.1111); 1999 Mar 1;13(3):266–72.
 31. Morris P. Results of renal transplantation, Principles and practice. 4th ed. Philadelphia, Saunders: *Kidney Transplantation*; 1994. 504–523 p.
 32. 32 Registre de malalts renals de Catalunya [Internet]. [cited 2018 Sep 12]. Available from: http://trasplantaments.gencat.cat/web/.content/minisite/trasplantament/registres_activitat/registre_de_malalts_renals/arxiu/Informe-estadistic-RMRC-2016.pdf
 33. Serón D, Arias M, Campistol JM, Morales JM, Spanish Chronic Allograft Nephropathy Study Group. Late renal allograft failure between 1990 and 1998 in Spain: a changing scenario. *Transplantation.* 2003 Dec 15;76(11):1588–94.
 34. Moreso F, Hernández D. Has the survival of the graft improved after renal transplantation in the era of modern immunosuppression? *Nefrologia.* 2013 Jan 18;33(1):14–26.
 35. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3 Suppl 4:114–25.
 36. Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA, et al. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis.* 2000 Jul;36(1):153–9.
 37. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, et al. Deceased-Donor Characteristics and the Survival Benefit of Kidney Transplantation. *JAMA.* 2005 Dec 7;294(21):2726.

38. Chavalitdhamrong D, Gill J, Takemoto S, Madhira BR, Cho YW, Shah T, et al. Patient and graft outcomes from deceased kidney donors age 70 years and older: an analysis of the Organ Procurement Transplant Network/United Network of Organ Sharing database. *Transplantation*. 2008 Jun 15;85(11):1573–9.
39. Meier-Kriesche H-U, Cibrik DM, Ojo AO, Hanson JA, Magee JC, Rudich SM, et al. Interaction Between Donor and Recipient Age in Determining the Risk of Chronic Renal Allograft Failure. *J Am Geriatr Soc*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2002 Jan 1;50(1):14–7.
40. Cecka JM. Outcome statistics of renal transplants with an emphasis on long-term survival. *Clin Transplant*. 1994 Jun;8(3 Pt 2):324–7.
41. Fraser SM, Rajasundaram R, Aldouri A, Farid S, Morris-Stiff G, Baker R, et al. Acceptable Outcome After Kidney Transplantation Using “Expanded Criteria Donor” Grafts. *Transplantation*. 2010 Jan;89(1):88–96.
42. Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, Okechukwu CN, Wolfe RA, Leichtman AB, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J Am Soc Nephrol*. American Society of Nephrology; 2001 Mar 1;12(3):589–97.
43. Singhal AK, Sheng X, Drakos SG, Stehlik J. Impact of donor cause of death on transplant outcomes: UNOS registry analysis. *Transplant Proc*. 2009 Nov;41(9):3539–44.
44. Shin M, Moon HH, Kim JM, Park JB, Kwon CHD, Joh J-W, et al. Implication of Donor–Recipient Age Gradient in the Prognosis of Graft Outcome After Deceased-Donor Kidney Transplantation. *Transplant Proc*. Elsevier; 2013 Oct 1;45(8):2907–13.
45. Pérez-Flores I, Sánchez-Fructuoso A, Calvo N, Marques M, Anaya S, Ridaio N, et al. Preemptive kidney transplant from deceased donors: an advantage in relation to reduced waiting list. *Transplant Proc*. 2007 Sep;39(7):2123–4.
46. Goldfarb-Rumyantzev AS, Hurdle JF, Scandling JD, Baird BC, Cheung AK. The Role of Pretransplantation Renal Replacement Therapy Modality in Kidney Allograft and Recipient Survival. *Am J Kidney Dis*. 2005 Sep;46(3):537–49.
47. Goh A. Graft survival trends in kidney transplants: an analysis of the UNOS database. *Clin Transpl*. 2009;41–54.
48. Cai J, Terasaki PI. The current trend of induction and maintenance treatment in patient of different PRA levels: a report on OPTN/UNOS Kidney Transplant Registry data. *Clin Transpl*. 2010;45–52.
49. Subirá Ríos D, Rodríguez Martínez D, Dulin E, García Bordas J, Alvarez Fernández E, del Cañizo López JF, et al. [Ischemia-reperfusion syndrome and

- role of preservation graft technique after laparoscopic versus open nephrectomy in a experimental model of living donor kidney transplant]. *Actas Urol Esp*. 2008 Jan;32(1):119–27.
50. Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int*. Elsevier; 2002 Jul 1;62(1):311–8.
 51. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997 Apr 15;63(7):968–74.
 52. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *Am J Transplant*. 2001 Jul;1(2):115–20.
 53. NAPRTCS 2010 Annual Transplant Report [Internet]. 2010 [cited 2018 Sep 13]. Available from: https://web.emmes.com/study/ped/annlrept/2010_Report.pdf
 54. Senel FM, Karakayali H, Moray G, Haberal M. Delayed graft function: predictive factors and impact on outcome in living-related kidney transplantations. *Ren Fail*. 1998 Jul;20(4):589–95.
 55. Ghadiani MH, Peyrovi S, Mousavinasab SN, Jalalzadeh M. Delayed graft function, allograft and patient survival in kidney transplantation. *Arab J Nephrol Transplant*. 2012 Jan;5(1):19–24.
 56. Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, Schiff J, Cattran DC, Cole EH, et al. Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol*. American Society of Nephrology; 2010 Jan 1;21(1):153–61.
 57. Resende L, Guerra J, Santana A, Mil-Homens C, Abreu F, da Costa AG. Influence of Dialysis Duration and Modality on Kidney Transplant Outcomes. *Transplant Proc*. 2009 Apr;41(3):837–9.
 58. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, Haloń A, Mazanowska O, Gomońkiewicz A, et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation – clinical and molecular study. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016 Dec 3;6(1):36118.
 59. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* (London, England). Elsevier; 2004 Nov 13;364(9447):1814–27.
 60. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic Allograft Nephropathy: Current Concepts and Future Directions. *Transplantation*. 2006 Mar 15;81(5):643–54.
 61. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003 Dec

- 11;349(24):2326–33.
62. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int.* 1996 Feb;49(2):518–24.
 63. Humar A, Kerr S, Gillingham KJ, Matas AJ. Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation.* 1999 Oct 27;68(8):1200–3.
 64. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of Improvement in Renal Allograft Survival Despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates Over the Most Recent Era. *Am J Transplant.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2004 Mar 1;4(3):378–83.
 65. Vereerstraeten P, Abramowicz D, de Pauw L, Kinnaert P. Absence of deleterious effect on long-term kidney graft survival of rejection episodes with complete functional recovery. *Transplantation.* 1997 Jun 27;63(12):1739–43.
 66. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy (?CAN?). *Am J Transplant.* 2007 Mar;7(3):518–26.
 67. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *Am J Transplant.* 2009 Mar;9(3):527–35.
 68. Haas M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 May;23(3):245–50.
 69. Williams WW, Taheri D, Tolkoﬀ-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol.* 2012 Jan 10;8(2):110–21.
 70. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int.* 1997 Jan;51(1):310–6.
 71. Hergesell O, Felten H, Andrassy K, Kuhn K, Ritz E. Safety of ultrasound-guided percutaneous renal biopsy-retrospective analysis of 1090 consecutive cases. *Nephrol Dial Transplant.* Oxford University Press; 1998 Apr 1;13(4):975–7.
 72. Shapiro R, Randhawa P, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Jain A, et al. An analysis of early renal transplant protocol biopsies--the high incidence of subclinical tubulitis. *Am J Transplant.* 2001 May;1(1):47–50.
 73. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans J-L, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation.* 2003 Sep;76(6):969–73.

74. Manno C, Strippoli GFM, Arnesano L, Bonifati C, Campobasso N, Gesualdo L, et al. Predictors of bleeding complications in percutaneous ultrasound-guided renal biopsy. *Kidney Int.* 2004 Oct;66(4):1570–7.
75. Whittier WL, Korbet SM. Timing of complications in percutaneous renal biopsy. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan;15(1):142–7.
76. Garcia del Moral R. *Nefrología Clínica*. 4th ed. Panamericana, editor. 2013. 231-42 p.
77. Gaber LW, Gaber AO, Tolley EA, Hathaway DK. Prediction by postrevascularization biopsies of cadaveric kidney allografts of rejection, graft loss, and preservation nephropathy. *Transplantation.* 1992 Jun;53(6):1219–25.
78. Lee S, Kim JS, Cho MH, Chae DW, Kim HJ, Nam ES, et al. Relationship of renal implantation biopsies and acute rejection during the immediate posttransplantation period. *Transplant Proc.* 1998 Nov;30(7):3070–1.
79. Karpinski J, Lajoie G, Cattran D, Fenton S, Zaltzman J, Cardella C, et al. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation.* 1999 Apr 27;67(8):1162–7.
80. Eapen G, Hinduja A, Abraham G, Kuruvilla S, Panicker V, Thirumalai R, et al. Does implantation biopsy help in predicting renal allograft management and outcome? *Transplant Proc.* 2000 Nov;32(7):1795.
81. Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation.* 1999 May 15;67(9):1222–30.
82. Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, Duquesnoy R, Fung J, Shapiro R, et al. Biopsy of marginal donor kidneys: correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation.* 2000 Apr 15;69(7):1352–7.
83. Howie AJ, Ferreira MAS, Lipkin GW, Adu D. Measurement of chronic damage in the donor kidney and graft survival. *Transplantation.* 2004 Apr 15;77(7):1058–65.
84. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, et al. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation.* 2001 Feb 27;71(4):515–23.
85. Cosio FG, Grande JP, Larson TS, Gloor JM, Velosa JA, Textor SC, et al. Kidney Allograft Fibrosis and Atrophy Early After Living Donor Transplantation. *Am J Transplant.* 2005 May;5(5):1130–6.
86. Chapman JJ. Longitudinal analysis of chronic allograft nephropathy: Clinicopathologic correlations. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(99):S108–12.
87. Maggiore U, Cravedi P. The marginal kidney donor. *Curr Opin Organ*

- Transplant. 2014 Aug;19(4):372–80.
88. Lledó-García E, Riera L, Passas J, Paredes D, Morales JM, Sánchez-Escuredo A, et al. Spanish consensus document for acceptance and rejection of kidneys from expanded criteria donors. *Clin Transplant*. 2014 Oct;28(10):1155–66.
 89. Serón D, Anaya F, Marcén R, del Moral RG, Martul EV, Alarcón A, et al. [Guidelines for indicating, obtaining, processing and evaluating kidney biopsies]. *Nefrologia*. 2008;28(4):385–96.
 90. Remuzzi G, Grinyò J, Ruggenenti P, Beatini M, Cole EH, Milford EL, et al. Early experience with dual kidney transplantation in adults using expanded donor criteria. Double Kidney Transplant Group (DKG). *J Am Soc Nephrol*. 1999 Dec;10(12):2591–8.
 91. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, et al. Long-Term Outcome of Renal Transplantation from Older Donors. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2006 Jan 26;354(4):343–52.
 92. Zadrazil J, Krejeří K, Bachleda P, Al-Jabry S. Protocol biopsy of donor kidney in renal transplantation. *Ann Transplant*. 2004;9(4):8–11.
 93. Brouard S, Renaudin K, Souillou J-P. Revisiting the Natural History of IF/TA in Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Apr;11(4):647–9.
 94. Toki D, Zhang W, Hor KLM, Liuwantara D, Alexander SI, Yi Z, et al. The Role of Macrophages in the Development of Human Renal Allograft Fibrosis in the First Year After Transplantation. *Am J Transplant*. 2014 Sep 1;14(9):2126–36.
 95. Serón D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. *Kidney Int*. 2007 Sep;72(6):690–7.
 96. Arias M, Serón D, Moreso F, Bestard O, Praga M. Chronic Renal Allograft Damage: Existing Challenges. *Transplantation*. 2011 May;91(Supplement):S4–25.
 97. Chapman JR. Do protocol transplant biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Nov;21(6):580–6.
 98. Burdick JF, Beschorner WE, Smith WJ, McGraw D, Bender WL, Williams GM, et al. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation*. 1984 Dec;38(6):679–84.
 99. Solez K i. m., Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. Elsevier; 1993 Aug 1;44(2):411–22.
 100. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation*. 1994

- Jan;57(2):208–11.
101. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural History, Risk Factors, and Impact of Subclinical Rejection in Kidney Transplantation. *Transplant J*. 2004 Jul;78(2):242–9.
 102. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noël LH, et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 1998 Jun 15;65(11):1506–9.
 103. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):1046–52.
 104. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation*. 1995 Feb 27;59(4):511–4.
 105. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant*. 1999 Dec;13(6):441–6.
 106. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant*. 2007 Sep;7(9):2124–32.
 107. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation*. 1995 Aug 27;60(4):334–9.
 108. Pokorná E, Vítko S, Chadimová M, Schüch O, Ekberg H. Proportion of glomerulosclerosis in procurement wedge renal biopsy cannot alone discriminate for acceptance of marginal donors. *Transplantation*. 2000 Jan 15;69(1):36–43.
 109. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2008 Apr 1;8(4):753–60.
 110. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Sis B, Hidalgo LG, Matas AJ, et al. Inflammation Lesions in Kidney Transplant Biopsies: Association with Survival Is Due to the Underlying Diseases. *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):489–99.
 111. Wu K, Budde K, Schmidt D, Neumayer H-H, Rudolph B. Pathologic characteristics of early or late acute cellular rejection and outcome after kidney transplant. *Exp Clin Transplant*. 2014 Aug;12(4):314–22.
 112. Brown CC, Sebire NJ, Wittenhagen P, Shaw O, Marks SD. Clinical significance

- of isolated v lesions in paediatric renal transplant biopsies: muscular arteries required to refute the diagnosis of acute rejection. *Transpl Int*. 2014 Feb;27(2):170–5.
113. Haas M. Pathologic features of antibody-mediated rejection in renal allografts: an expanding spectrum. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 May;21(3):264–71.
 114. Hall IE, Reese PP, Weng FL, Schroppel B, Doshi MD, Hasz RD, et al. Preimplant Histologic Acute Tubular Necrosis and Allograft Outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Mar 7;9(3):573–82.
 115. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Mar;13(3):779–87.
 116. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O’Connell PJ, Chapman JR, Allen RDM. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation*. 2004 Aug 15;78(3):434–41.
 117. Serón D, Moreso F, Ramón JM, Hueso M, Condom E, Fulladosa X, et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2000 May 15;69(9):1849–55.
 118. Park WD, Griffin MD, Cornell LD, Cosio FG, Stegall MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol*. *American Society of Nephrology*; 2010 Nov 2;21(11):1987–97.
 119. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):747–52.
 120. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet (London, England)*. 1968 Aug 17;2(7564):363–6.
 121. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society AWG of the IINN and the RP, Roberts ISD, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int*. Elsevier; 2009 Sep 1;76(5):546–56.
 122. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Jeffery J, Birk P, et al. Quantitation of allograft fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Pediatr*

- Transplant. 1999 Nov 1;3(4):257–70.
123. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting Subsequent Decline in Kidney Allograft Function from Early Surveillance Biopsies. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2005 Oct 1;5(10):2464–72.
 124. Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, Taskinen E, Paavonen T, Navarro M, et al. Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Mar;14(3):773–9.
 125. Farris AB, Alpers CE. What is the best way to measure renal fibrosis?: A pathologist's perspective. *Kidney Int Suppl*. Elsevier; 2014 Nov 1;4(1):9–15.
 126. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. Kluwer Academic Publishers; 1979 Jul;11(4):447–55.
 127. Moreso F, Serón D, Vitriá J, Grinyó JM, Colomé-Serra FM, Parés N, et al. Quantification of interstitial chronic renal damage by means of texture analysis. *Kidney Int*. Elsevier; 1994 Dec 1;46(6):1721–7.
 128. Diaz Encarnacion MM, Griffin MD, Slezak JM, Bergstralh EJ, Stegall MD, Velosa JA, et al. Correlation of Quantitative Digital Image Analysis with the Glomerular Filtration Rate in Chronic Allograft Nephropathy. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2004 Feb 1;4(2):248–56.
 129. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr 1;8(4):753–60.
 130. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2010 Mar 1;10(3):464–71.
 131. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2012 Mar;12(3):563–70.
 132. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian J Nephrol*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2010 Jan;20(1):2–8.
 133. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and

- Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2014 Feb 1;14(2):272–83.
134. Mueller A, Schnuelle P, Waldherr R, van der Woude FJ. Impact of the Banff '97 classification for histological diagnosis of rejection on clinical outcome and renal function parameters after kidney transplantation. *Transplantation*. 2000 Mar 27;69(6):1123–7.
 135. Arias-Cabrales C, Redondo-Pachón D, Pérez-Sáez MJ, Gimeno J, Sánchez-Güerri I, Bermejo S, et al. Renal graft survival according to Banff 2013 classification in indication biopsies. *Nefrologia*. 2016 Nov;36(6):660–6.
 136. Goldsby, R. R. *Patología estructural y funcional. Inflamación aguda y crónica*. 5th ed. Mc Graw Hill, editor. 7 p.
 137. Haugen E, Nath KA. The Involvement of Oxidative Stress in the Progression of Renal Injury. *Blood Purif*. 1999;17(2–3):58–65.
 138. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev*. Nikan Research Institute; 2015;4(2):20–7.
 139. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Physiol*. 2003;285(2):F191–8.
 140. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, de Vos P, Girbes AR, et al. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation*. 1999 Dec 27;68(12):1884–90.
 141. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JAB, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HGD, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation*. 2004 Oct 15;78(7):978–86.
 142. van der Hoeven JAB, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1874–82.
 143. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ . *Annu Rev Immunol*. 1997 Apr;15(1):749–95.
 144. Sakatsume M, Igarashi K, Winestock KD, Garotta G, Larner AC, Finbloom DS. The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17528–34.

145. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1–2):1–24.
146. Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993 Apr;11(1):571–611.
147. Vaday GG, Franitza S, Schor H, Hecht I, Brill A, Cahalon L, et al. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):885–92.
148. Baldwin AS. THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol*. 1996 Apr;14(1):649–81.
149. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr;27(1):519–50.
150. Dinarello CA. The Role of the Interleukin-1–Receptor Antagonist in Blocking Inflammation Mediated by Interleukin-1. *N Engl J Med*. 2000 Sep 7;343(10):732–4.
151. Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2007 Apr 1;48(4):751–62.
152. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995 Feb;38(2):151–60.
153. Heiberg MS, Koldingsnes W, Mikkelsen K, Rødevand E, Kaufmann C, Mowinckel P, et al. The comparative one-year performance of anti-tumor necrosis factor α drugs in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: Results from a longitudinal, observational, multicenter study. *Arthritis Rheum*. 2008 Feb 15;59(2):234–40.
154. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*. 2000 Dec;15(3–4):290–301.
155. Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):213–7.
156. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in Renal Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011 May 1;22(5):802–9.
157. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2015 Mar 19;372(12):1138–49.
158. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep. European*

- Molecular Biology Organization; 2008 Apr;9(4):322–6.
159. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2009 Jun 1;119(6):1438–49.
 160. Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, et al. Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23514–23.
 161. Haraguchi M. The role of the transcriptional regulator snail in cell detachment, reattachment and migration. *Cell Adh Migr.* Taylor & Francis; 2009;3(3):259–63.
 162. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.* 2003 Nov 15;112(10):1486–94.
 163. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002 Aug 1;110(3):341–50.
 164. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2003 Dec;112(12):1776–84.
 165. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2006 Feb 1;7(2):131–42.
 166. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* Nature Publishing Group; 2007 Jun 17;7(6):415–28.
 167. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun 1;119(6):1429–37.
 168. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis. *J Cell Biol.* 2002 Jan 21;156(2):299–314.
 169. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang H-R, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* American Association for the Advancement of Science; 2005 Mar 11;307(5715):1603–9.
 170. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):423–8.

171. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*. 2015. p. 247–54.
172. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2004 Mar 24;90(6):1265–73.
173. Jordà M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci*. The Company of Biologists Ltd; 2005 Aug 1;118(Pt 15):3371–85.
174. PARSONS SL, WATSON SA, BROWN PD, COLLINS HM, STEELE RJC. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg*. Wiley-Blackwell; 1997 Feb 1;84(2):160–6.
175. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011 Jul;38(7):441–50.
176. Ma L-J, Yang H, Gaspert A, Carlesso G, Barty MM, Davidson JM, et al. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol*. 2003 Oct;163(4):1261–73.
177. Wipff P-J, Rifkin DB, Meister J-J, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol*. Rockefeller University Press; 2007 Dec 17;179(6):1311–23.
178. Goto Y, Manabe N, Uchio-Yamada K, Yamaguchi-Yamada M, Inoue N, Yamamoto Y, et al. Augmented cytoplasmic Smad4 induces acceleration of TGF- β 1 signaling in renal tubulointerstitial cells of hereditary nephrotic ICGN mice with chronic renal fibrosis; possible role for myofibroblastic differentiation. *Cell Tissue Res*. Springer-Verlag; 2004 Feb 1;315(2):209–21.
179. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int*. Elsevier; 2011 May 1;79(9):944–56.
180. Micallef L, Vedrenne N, Billet F, Coulomb B, Darby IA, Desmoulière A. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenes Tissue Repair* 2012 51. BioMed Central; 2012 Jun 6;5(1):S5.
181. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2012 Jul 1;18(7):1028–40.
182. Grande MT, López-Novoa JM. Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2009 Jun 1;5(6):319–28.
183. Duffield JS, Park KM, Hsiao L-L, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al.

- Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2005 Jul 1;115(7):1743–55.
184. Lin S-L, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *Am J Pathol.* Elsevier; 2008 Dec 1;173(6):1617–27.
 185. Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA, Duffield JS. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Physiol.* American Physiological Society Bethesda, MD; 2013 Apr;304(7):C591–603.
 186. Lee CH, Shah B, Moiola EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2010 Sep 1;120(9):3340–9.
 187. Bellini A, Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Investig.* Nature Publishing Group; 2007 Sep 2;87(9):858–70.
 188. Rockey DC, Housset CN, Friedman SL. Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1993 Oct 1;92(4):1795–804.
 189. Eddy AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl.* Elsevier; 2014 Nov 1;4(1):2–8.
 190. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* World Health Organization; 1972;46(6):845–52.
 191. Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. *Immunol Today.* 1994 Mar;15(3):100–2.
 192. Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, Anderson DA, Schroeder DA, Wong MH, et al. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2006 Aug 29;103(35):13156–61.
 193. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002 Dec;63(12):1164–71.
 194. Valledor AF, Borràs FE, Cullell-Young M, Celada A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol.* 1998 Apr;63(4):405–17.
 195. Stout RD, Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory

- disease. *Front Biosci.* 1997 May 1;2:d197-206.
196. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol. The Society for Leukocyte Biology*; 2009 Nov;86(5):1105–9.
 197. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*; 2008 Nov 3;118(11):3522–30.
 198. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010 Sep 24;33(3):375–86.
 199. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group*; 2011 Nov 14;11(11):723–37.
 200. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004 Sep;76(3):509–13.
 201. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group*; 2008 Dec 1;8(12):958–69.
 202. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity. Cell Press*; 2014 Jul 17;41(1):14–20.
 203. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
 204. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23–35.
 205. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 1993 Mar 19;259(5102):1739–42.
 206. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol. Elsevier Masson*; 1998 Sep 10;149(7–8):685–8.
 207. Weber C, Belge K-U, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol. Wiley-Blackwell*; 2000 May 1;67(5):699–704.
 208. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity. Cell Press*; 2003 Jul 1;19(1):71–82.

209. Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, Martinez-Pomares L, Gordon S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity *ex vivo*. *Eur J Immunol*. 2003 Aug;33(8):2090–7.
210. Chamorro S, Revilla C, Gómez N, Álvarez B, Alonso F, Ezquerro Á, et al. *In vitro* differentiation of porcine blood CD163– and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology*. Urban & Fischer; 2004 Aug 23;209(1–2):57–65.
211. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec 1;5(12):953–64.
212. Xiao X, Gaffar I, Guo P, Wiersch J, Fischbach S, Peirish L, et al. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Apr 1;111(13):E1211–20.
213. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Sep 2];104(1):27–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519085>
214. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):787–95.
215. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. IFN- γ Induces IL-12 mRNA Expression by a Murine Macrophage Cell Line, J774. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Feb 15;198(3):857–61.
216. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1057–69.
217. Yu F, Wu L-H, Tan Y, Li L-H, Wang C-L, Wang W-K, et al. Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kidney Int*. 2010 May;77(9):820–9.
218. Bai T, Chen C-C, Lau LF. Matricellular protein CCN1 activates a proinflammatory genetic program in murine macrophages. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2010 Mar 15;184(6):3223–32.
219. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec 1;5(12):953–64.
220. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. Elsevier Current Trends; 2004 Dec 1;25(12):677–86.
221. Wilson HM, Walbaum D, Rees AJ. Macrophages and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004 May;13(3):285–90.

222. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73(2):209–12.
223. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *Eur J Immunol.* Wiley-Blackwell; 2011 Jun 1;41(6):1531–4.
224. Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* 2014 Mar;219(3):172–8.
225. Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2015 Feb 19;30(2):199–209.
226. Seder RA, Paul WE. Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by CD4+ T Cells. *Annu Rev Immunol.* 1994 Apr;12(1):635–73.
227. Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S, Capron M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000 Jul;68(1):125–30.
228. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annu Rev Immunol.* 1999 Apr;17(1):701–38.
229. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):549–55.
230. Zhang M-Z, Wang X, Wang Y, Niu A, Wang S, Zou C, et al. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney Int.* Elsevier; 2017 Feb 1;91(2):375–86.
231. Fertin C, Nicolas JF, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol.* 1991;37(8):823–9.
232. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol.* 1994 Apr 1;152(7):3606–14.
233. Doucet C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2129–39.
234. Marone G, Florio G, Petraroli A, de Paulis A. Dysregulation of the IgE/Fc epsilon RI network in HIV-1 infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107(1):22–30.
235. Wynn TA. IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2003 Apr [cited 2018 Sep 2];21(1):425–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615888>

236. Zurawski SM, Vega F, Huyghe B, Zurawski G, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J. European Molecular Biology Organization*; 1993 Jul;12(7):2663–70.
237. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):809–21.
238. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol.* 2010 Aug 15;185(4):2044–50.
239. Anders H-J, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int.* 2011 Nov;80(9):915–25.
240. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. I NTERLEUKIN -10 AND THE I NTERLEUKIN -10 R ECEPTOR. *Annu Rev Immunol.* 2001 Apr;19(1):683–765.
241. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology.* 1998 Dec;28(6):1597–606.
242. Arai T, Abe Y, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, et al. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. 2000.
243. Demols A, Van Laethem J-L, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, et al. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2002 Jun;282(6):G1105–12.
244. Jung M, Sola A, Hughes J, Kluth DC, Vinuesa E, Viñas JL, et al. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney Int.* 2012 May;81(10):969–82.
245. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. Epstein FH, editor. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350–8.
246. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature.* 1988 Jul 21;334(6179):260–2.
247. Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, et al. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5707–19.

248. Border WA, Noble NA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994 Nov 10;331(19):1286–92.
249. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 1992 Nov 26;360(6402):361–4.
250. Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1997 Dec 1;100(11):2697–713.
251. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest*. 1997 Aug 15;100(4):768–76.
252. Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009 Jan 11;19(1):71–88.
253. Hill GS. Hypertensive nephrosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 May;17(3):266–70.
254. Cardiovascular P, Pathology R. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Transforming Growth Factor- β 1/Smad Signaling Pathways Modulates the Development of Fibrosis in Adriamycin-Induced Nephropathy. *Am J Pathol*. 2006;169:1527–40.
255. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jan 1;2(1):46–53.
256. Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, et al. Mice Lacking Smad3 Are Protected Against Cutaneous Injury Induced by Ionizing Radiation. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):1057–68.
257. Eddy AA. Progression in Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005 Oct;12(4):353–65.
258. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. *Annu Rev Immunol*. 2006 Apr;24(1):99–146.
259. Khimji A, Rockey DC. Endothelin—Biology and disease. *Cell Signal*. 2010 Nov;22(11):1615–25.
260. Böttinger EP. TGF- β in Renal Injury and Disease. *Semin Nephrol*. 2007 May;27(3):309–20.
261. Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;995:1–10.

262. Gong D, Shi W, Yi S, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.* 2012 Jun 15;13(1):31.
263. Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 2007 May 1;178(9):5899–911.
264. Ranganathan P V, Jayakumar C, Mohamed R, Dong Z, Ramesh G. Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production. *Kidney Int.* 2013;83:1087–98.
265. Kurts C, Panzer U, Anders H-J, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol.* 2013 Sep 16;13(10):738–53.
266. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection? *Transplantation.* 2007 Nov 15;84(9):1071–4.
267. Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J Immunol.* American Association of Immunologists; 1998 Nov 15;161(10):5217–25.
268. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi B-S, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Feb 1;22(2):317–26.
269. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol.* 2009 Jan;130(1):41–50.
270. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):486–91.
271. Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2010 Oct 1;10(10):712–23.
272. Humphreys BD, Bonventre J V. The contribution of adult stem cells to renal repair. *Néphrologie & Thérapeutique.* Elsevier Masson; 2007 Mar 1;3(1):3–10.
273. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre J V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994 May 1;93(5):2175–88.

274. Kluth DC. Pro-resolution properties of macrophages in renal injury. *Kidney Int.* 2007 Aug;72(3):234–6.
275. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2002 Aug 1;110(3):341–50.
276. Eddy AA. Progression in Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* W.B. Saunders; 2005 Oct 1;12(4):353–65.
277. Sean Eardley K, Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int.* Elsevier; 2005 Aug 1;68(2):437–55.
278. Noppakun K, Cosio FG, Dean PG, Taler SJ, Wauters R, Grande JP. Living donor age and kidney transplant outcomes. *Am J Transplant.* 2011 Jun;11(6):1279–86.
279. Goldfarb-Rumyantzev AS, Hurdle JF, Scandling JD, Baird BC, Cheung AK. The role of pretransplantation renal replacement therapy modality in kidney allograft and recipient survival. *Am J Kidney Dis.* 2005 Sep;46(3):537–49.
280. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10):3279–88.
281. Troppmann C, Ormond DB, Perez R V. Laparoscopic (vs open) live donor nephrectomy: a UNOS database analysis of early graft function and survival. *Am J Transplant.* 2003 Oct;3(10):1295–301.
282. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2003;3 Suppl 4:114–25.
283. Irish WD, Katz E. Cold machine perfusion or static cold storage of kidneys: why the debate continues. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):1955–6.
284. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, Owen AB, Brennan DC, Bailly JE, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2967–74.
285. Veroux M, Grosso G, Corona D, Mistretta A, Giaquinta A, Giuffrida G, et al. Age is an important predictor of kidney transplantation outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(4):1663–71.
286. Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, et al. Deceased-Donor Characteristics and the Survival Benefit of Kidney Transplantation. *JAMA.* American Medical Association; 2005 Dec 7;294(21):2726.

287. Prommool S, Jhangri GS, Cockfield SM, Halloran PF. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol. American Society of Nephrology*; 2000 Mar 1;11(3):565–73.
288. Moreso F, Serón D, Gil-Vernet S, Riera L, Fulladosa X, Ramos R, et al. Donor age and delayed graft function as predictors of renal allograft survival in rejection-free patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Apr;14(4):930–5.
289. Stratta RJ, Rohr MS, Sundberg AK, Armstrong G, Hairston G, Hartmann E, et al. Increased kidney transplantation utilizing expanded criteria deceased organ donors with results comparable to standard criteria donor transplant. *Ann Surg. Lippincott, Williams, and Wilkins*; 2004 May;239(5):688-95; discussion 695-7.
290. Johnston TD, Thacker LR, Jeon H, Lucas BA, Ranjan D. Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. *Clin Transplant*. 2004 Aug;18(s12):28–32.
291. Melk A, Schmidt BMW, Braun H, Vongwiwatana A, Urmson J, Zhu L-F, et al. Effects of Donor Age and Cell Senescence on Kidney Allograft Survival. *Am J Transplant*. 2008 Dec 19;9(1):114–23.
292. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant. Wiley/Blackwell* (10.1111); 2003 Apr;3(s4):114–25.
293. Whiting JF. Clinical and economic outcomes of the use of expanded criteria donors in renal transplantation. *Semin Dial*. 2000;13(5):316–9.
294. Mezrich JD, Pirsch JD, Fernandez LA, Foley DP, Bellingham JM, Odorico JS, et al. Differential Outcomes of Expanded-Criteria Donor Renal Allografts According to Recipient Age. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Jul 1;7(7):1163–71.
295. Bos EM, Leuvenink HGD, van Goor H, Ploeg RJ. Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney Int*. 2007 Oct;72(7):797–805.
296. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation*. 2000 Feb 15;69(3):405–10.
297. van Der Hoeven JAB, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. 2003 Nov;64(5):1874–82.
298. Schuurs TA, Gerbens F, van der Hoeven JAB, Ottens PJ, Kooi KA, Leuvenink HGD, et al. Distinct transcriptional changes in donor kidneys upon brain death induction in rats: insights in the processes of brain death. *Am J Transplant*. 2004

- Dec;4(12):1972–81.
299. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle S V. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1551–9.
 300. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JAB, Leuvenink HGD, van der Heide JJH, van Goor H, et al. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplant Proc.* 2005 Jan;37(1):367–9.
 301. Mazeti-Felicio CM, Caldas HC, Fernandes-Charpiot IMM, Dezotti CZ, Baptista MASF, Abbud-Filho M. Preimplantation Kidney Biopsies of Extended Criteria Donors Have a Heavier Inflammatory Burden Than Kidneys From Standard Criteria Donors. *Transplant Direct.* 2017 Jul;3(7):e180.
 302. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int. Elsevier*; 2015 Feb 1;87(2):343–9.
 303. Häyry P, von Willebrand E. Monitoring of human renal allograft rejection with fine-needle aspiration cytology. *Scand J Immunol.* 1981;13(1):87–97.
 304. Burkhard K, Hofmann GO, Bosnecker A, Hillebrand G, Illner WD, Petersen P, et al. Early infiltration of renal allografts with 27E10-positive macrophages and graft outcome. *Transpl Int.* 1994;7:577–9.
 305. Ramos EL, Barri YM, Croker BP, Clapp WL, Peterson JC, Wilcox CS. Thromboxane synthase expression in renal transplant patients with rejection. *Transplantation.* 1995 Feb 27;59(4):490–4.
 306. Yanagisawa T, Otsubo O, Shimada T, Nozaki H, Takahashi I, Inou T, et al. Relationship between macrophage infiltration of renal allografts and chronic renal impairment. *Transplant Proc.* 1997 Nov;29(7):2783–6.
 307. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 2005 Oct;68(4):1866–74.
 308. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford EAS, Wright EC, Mannon RB, et al. Monocyte Infiltration and Kidney Allograft Dysfunction During Acute Rejection. *Am J Transplant.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2008 Mar 1;8(3):600–7.
 309. Bräsen JH, Khalifa A, Schmitz J, Dai W, Einecke G, Schwarz A, et al. Macrophage density in early surveillance biopsies predicts future renal transplant function. *Kidney Int.* 2017 Aug;92(2):479–89.
 310. Jassem W, . Koo DD., Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle S V. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor

- livers before transplant¹. *Transplantation*. 2003 Jun;75(12):2001–7.
311. Kim YS, Lim CS, Kim S, Lee JS, Lee S, Kim ST, et al. Cadaveric renal allograft at the time of implantation has the similar immunological features with the rejecting allograft. *Transplantation*. 2000 Oct 15;70(7):1080–5.
 312. Fuggle S V, Koo DD. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation*. 1998 Mar 27;65(6):763–9.
 313. Schwarz C, Regele H, Steininger R, Hansmann C, Mayer G, Oberbauer R. The contribution of adhesion molecule expression in donor kidney biopsies to early allograft dysfunction. *Transplantation*. 2001 Jun 15;71(11):1666–70.
 314. de Vries DK, Lindeman JHN, Ringers J, Reinders MEJ, Rabelink TJ, Schaapherder AFM. Donor Brain Death Predisposes Human Kidney Grafts to a Proinflammatory Reaction after Transplantation. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2011 May 1;11(5):1064–70.
 315. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Mar 1;121(3):985–97.
 316. Guijarro C, Egido J. Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease. *Kidney Int*. Elsevier; 2001 Feb 1;59(2):415–24.
 317. Krensky AM, Ahn Y-T. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007 Mar 1;3(3):164–70.
 318. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Bröcker V, et al. Infiltrates in Protocol Biopsies from Renal Allografts. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2007 Feb 1;7(2):356–65.
 319. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim Y-S, et al. Clinical Significance of an Early Protocol Biopsy in Living-Donor Renal Transplantation: Ten-Year Experience at a Single Center. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2005 Jun 1;5(6):1354–60.
 320. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkera HA, Mekeel KL, Moss AA, Mulligan DC, et al. Impact of Subclinical Inflammation on the Development of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2010 Mar 1;10(3):563–70.
 321. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, Aubert O, Duong van Huyen J-P, Rabant M, et al. Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol*. American Society of Nephrology; 2015 Jul 2;26(7):1721–31.
 322. Pilmore HL, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW, Eris JM. Early up-

- regulation of macrophages and myofibroblasts: a new marker for development of chronic renal allograft rejection. *Transplantation*. 2000 Jun 27;69(12):2658–62.
323. Serón D, O'Valle F, Moreso F, Gomà M, Hueso M, Grinyó JM, et al. Immunophenotype of infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies from tacrolimus-versus cyclosporine-treated patients. *Transplantation*. 2007 Mar 15;83(5):649–52.
324. Gago M, Cornell LD, Kremers WK, Stegall MD, Cosio FG. Kidney Allograft Inflammation and Fibrosis, Causes and Consequences. *Am J Transplant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2012 May 1;12(5):1199–207.
325. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*. Cell Press; 2015 Feb 26;160(5):816–27.
326. García-Carro C, Dörje C, Åsberg A, Midtvedt K, Scott H, Reinholt FP, et al. Inflammation in Early Kidney Allograft Surveillance Biopsies With and Without Associated Tubulointerstitial Chronic Damage as a Predictor of Fibrosis Progression and Development of De Novo Donor Specific Antibodies. *Transplantation*. 2017 Jun;101(6):1410–5.
327. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):199–210.
328. Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Munivenkatappa R, Ramos E, Nogueira J, Sailey C, et al. Glomerular inflammation in renal allografts biopsies after the first year: cell types and relationship with antibody-mediated rejection and graft outcome. *Transplantation*. 2010 Dec 27;90(12):1478–85.
329. Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest*. 1999 Jan 1;103(1):73–80.
330. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2016;12(6):325–38.
331. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int*. Elsevier; 1992 Jan 1;41(1):155–60.
332. Isoniemi H, Taskinen E, Häyry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation*. 1994 Dec 15;58(11):1195–8.
333. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant*. 1995 Apr;9(2):79–84.

334. Nicholson ML, McCulloch TA, Harper SJ, Wheatley TJ, Edwards CM, Feehally J, et al. Early measurement of interstitial fibrosis predicts long-term renal function and graft survival in renal transplantation. *Br J Surg.* 1996 Aug;83(8):1082–5.
335. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation.* 1998 Dec 27;66(12):1736–40.
336. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2326–33.
337. Saran R, Li Y, Robinson B, Ayanian J, Balkrishnan R, Bragg-Gresham J, et al. US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2015 Jul;66(1 Suppl 1):Svii, S1-305.
338. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. *Am J Transplant.* 2011 Mar;11(3):450–62.
339. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am J Transplant.* 2011 Jun;11(6):1226–35.

XI. ANEXOS

PUBLICACIÓN RELACIONADA CON LA TESIS:

“Early Macrophage Infiltration and Sustained Inflammation in Kidneys From Deceased Donors Are Associated With Long-Term Renal Function.”

Guillén-Gómez E., Dasilva I., Silva I., Arce Y., Facundo C., Ars E., Breda A., Ortiz A., Guirado L., Ballarín JA., Díaz-Encarnación MM.

Am J Transplant. 2017 Mar; 17(3):733-743.

American Journal of Transplantation 2016; XX: 1-11
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2016 The American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.13998

Early Macrophage Infiltration and Sustained Inflammation in Kidneys From Deceased Donors Are Associated With Long-Term Renal Function

E. Guillén-Gómez^{1,2,†}, I. Dasilva^{2,3,†}, I. Silva^{2,4},
Y. Arce^{2,5}, C. Facundo^{2,4}, E. Ars^{1,2}, A. Breda^{2,6},
A. Ortiz⁷, L. Guirado^{2,4}, J. A. Ballarín^{2,3} and
M. M. Díaz-Encarnación^{2,3,*}

¹Molecular Biology Laboratory, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

²UAB, REDinREN, Fundació Renal Inigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Institut Investigació Biosanitària Sant Pau, Barcelona, Spain

³Nephrology Department, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

⁴Renal Transplant Unit, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

⁵Pathology Laboratory, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

⁶Urology Department, Fundació Puigvert, Barcelona, Spain

⁷IS-Fundación Jiménez Díaz/UAM, REDinREN, Madrid, Spain

Corresponding author: Montserrat M. Díaz-Encarnación, mmdz@fundacio-puigvert.es

[†]Both authors equally contributed.

Kidney transplants from living donors (LDs) have a better outcome than those from deceased donors (DDs). Different factors have been suggested to justify the different outcome. In this study, we analyzed the infiltration and phenotype of monocytes/macrophages and the expression of inflammatory and fibrotic markers in renal biopsy specimens from 94 kidney recipients (60 DDs and 34 LDs) at baseline and 4 months after transplantation. We evaluated their association with medium- and long-term renal function. At baseline, inflammatory gene expression was higher in DDs than in LDs. These results were confirmed by the high number of CD68-positive cells in DD kidneys, which correlated negatively with long-term renal function. Expression of the fibrotic markers vimentin, fibronectin, and α -smooth muscle actin was more elevated in biopsy specimens from DDs at 4 months than in those from LDs. Gene expression of inflammatory and fibrotic markers at 4 months and difference between 4 months and baseline correlated negatively with medium- and long-term renal function in DDs. Multivariate analysis point to transforming growth factor- β 1 as the best predictor of long-term renal function in DDs. We conclude that early macrophage infiltration, sustained

inflammation, and transforming growth factor- β 1 expression, at least for the first 4 months, contribute significantly to the difference in DD and LD transplant outcome.

Abbreviations: DD, deceased donor; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ESRD, end-stage renal disease; ICAM, intercellular adhesion molecule; IL, interleukin; IRI, ischemia-reperfusion injury; LD, living donor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; NF- κ B, nuclear factor κ B; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor

Received 26 April 2016, revised 28 July 2016 and accepted for publication 29 July 2016

Introduction

Kidney transplantation is the treatment of choice for the majority of patients with end-stage renal disease (ESRD). Dialysis extends life expectancy but has drawbacks. Waiting time on dialysis is associated with worse outcomes after living donor (LD) and deceased donor (DD) kidney transplantations, resulting in decreased patient and graft survival (1,2). In clinical renal transplantation, allografts from related LDs have superior graft function and survival compared with those from DDs (3). Kidney transplantation entails a period of ischemia-reperfusion injury (IRI) during organ retrieval, preservation, and implantation, and it is possible that early damage to DD organs may render them more susceptible to harmful physiological and immunological events after transplantation (4,5). Immediately after transplantation, deceased renal allografts may display a nonspecific inflammatory response associated with prolonged cold IRI (6). IRI induces recruitment of inflammatory cells within the allograft, which may cause amplify organ damage. Renal cell death and ischemia create a proinflammatory environment and generate reactive oxygen species, driving cytokine release and further inflammation (7). Macrophages infiltrate the graft during IRI and acute and chronic rejection (8,9) and are associated with poor short-term outcome during rejection (10,11). However, infiltrating macrophages are functionally heterogeneous. Evidence suggests that there is a temporal association between

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Año 2016:

Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología 2016.

Comunicación oral.

Nefrología; vol 36, Supl 1, 2016. Pag 6. Abstract 2.

doi:10.3265/Nefrologia.pre2016.Sep.n36.vS1

2

INFLAMACIÓN E INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL INJERTO RENAL

I. DASILVA¹, E. GUILLÉN-GOMÉZ², I. SILVA³, C. FACUNDO³, L. GUIRADO³, J. BALLARÍN¹, M. DÍAZ-ENCARNACIÓN¹

•••

¹NEFROLOGÍA. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA),²BIOLOGÍA MOLECULAR. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA),³UNIDAD TRASPLANTE RENAL. FUNDACIÓ PUIGVERT. IIB SANT PAU. REDINREN (BARCELONA)

Introducción: Los trasplantes renales de donantes vivos (DV) presentan mejor función renal del injerto y mayor supervivencia en comparación con los de donantes cadáveres (DC). Hay pocos datos publicados que comparen la condición inflamatoria de los riñones en el momento de la donación y su influencia en la disfunción crónica del injerto, aunque es conocido que, inmediatamente después del trasplante, injertos renales de DC presentan una respuesta inflamatoria asociada con el tiempo de isquemia fría y lesión por reperfusión.

El objetivo de este estudio fue evaluar el estado inflamatorio y la expresión de factores fibróticos en los riñones de DC y DV y su asociación con la función renal (FR) a largo plazo.

Materiales y métodos: Se analizaron la infiltración y el fenotipo de los macrófagos y la expresión de marcadores inflamatorios y fibróticos en biopsias de 94 injertos renales (60 DC/34 DV) en el momento del trasplante y 4 meses después. La infiltración de macrófagos se evaluó mediante la tinción con CD68, mientras que la expresión de diferentes marcadores fibróticos e inflamatorios se realizó mediante PCR cuantitativa.

Resultados: Se observó mayor expresión de marcadores inflamatorios en muestras preimplantacionales de DC en comparación con DV. Estos resultados fueron confirmados por el elevado número de células CD68 positivas en los injertos renales de DC ($p=0,007$), que correlacionaron negativamente con la FR a largo plazo. En las biopsias de 4 meses de DC, se observó una mayor expresión de marcadores pro-fibróticos, como vimentina, fibronectina y α -SMA. La expresión génica de marcadores inflamatorios y fibróticos a los 4 meses y la diferencia entre los 4 meses y basal, correlacionaron de forma negativa con la FR a medio y largo plazo. A los 4 meses, la infiltración de macrófagos continúa elevada en DC, la expresión génica de inflamación empieza a disminuir mientras que hay un aumento de la expresión de marcadores pro-fibróticos. Por otro lado, en DV se observa un incremento de la inflamación, aunque sigue siendo menor que en los injertos de DC. El análisis multivariante muestra al TGF- β 1 como el mejor predictor independiente de la función renal a largo plazo en DC.

Conclusiones: Se observa un mayor incremento en el infiltrado de macrófagos en riñones preimplantacionales de DC en comparación con DV. Este infiltrado precoz de macrófagos y la inflamación sostenida, estimula la fibrosis a través de la vía del TGF- β 1, y todo ello contribuye significativamente a la diferencia de pronóstico entre DC y DV.

Año 2016:

Congreso Europeu de Nefrologia: ERA/EDTA 2016.

Comunicación oral.

“INFLAMMATION AND MACROPHAGE INFILTRATION IN THE RENAL ALLOGRAFT “

I. DaSilva, E. Guillén-Gomez, I. Silva, C. Facundo, L. Guirado. J. Ballarin, M. Diaz-Encarnación.

Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 31, Issue suppl_1, 1 May 2016, Pages i308, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw177.10>
14 May 2016.



Volume 31, Issue suppl_1
May 2016

Comments (0)

< Previous Next >

SP639

INFLAMMATION AND MACROPHAGE INFILTRATION IN THE RENAL ALLOGRAFT ^{FREE}

Iara Dasilva, Elena Guillén-Gómez, Irene Silva, Carme Facundo, Lluís Guirado,
Jose Aurelio Ballarín, Montserrat Díaz-Encarnación

Nephrology Dialysis Transplantation, Volume 31, Issue suppl_1, 1 May 2016, Pages i308,
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfw177.10>

Published: 14 May 2016

Introduction and Aims: In renal transplantation, kidneys from living-related donors (LD) have superior graft function and survival than cadaveric donors (CD). Studies have demonstrated that immediately after transplant, CD allografts may experience a nonspecific inflammatory response associated with prolonged cold ischemia and reperfusion injury. There are few studies conducted in humans that analyze the graft inflammatory condition at the time of donation and its influence in chronic graft dysfunction. The aim of this study was to assess donor inflammatory condition and its relationship with long-term kidney function.

Methods: 68(49 CD/19 LD) donor's renal biopsies, 49 receptor at 4 months (26 CD/23 LD) and 40 at 12 months were included, two samples were taken, one was paraffin embedded and the second was processed for RNA. 47 samples (30 CD; 17 LD) before and 47 samples 4 month after transplant were analyze to assess macrophage infiltration by immunohistochemistry CD68 staining.

Results: Kidney from CD had significantly higher macrophage infiltration than kidneys from LD at the time of implantation ($p=0,007$) and at 4 months after transplantation ($p=0,02$). Expression of inflammatory markers was observed in

Año 2016:

Congreso Americano de Nefrología: ASN 2016.

Oral-Postér.

JASN abstract supplent, 2016.

Congreso Americano de Nefrología.

Comunicación oral.

ASN-kidney Week 2016_Chicago- Oral

J Am Soc Nephrol Vol 27: Nov 2016

SA-OR052. Differences in Inflammation and Fibrosis in Deceased and Living Renal Donors Determine Long-Term Renal Function — *Montserrat M. Diaz Encarnacion, Elena Guillen-Gomez, Iara Karlla Dasilva, Yolanda Arce, Jose Ballarin.* Barcelona, Spain.

SA-OR052

Differences in Inflammation and Fibrosis in Deceased and Living Renal Donors Determine Long-Term Renal Function *Montserrat M. Diaz Encarnacion, Elena Guillen-Gomez, Irene Silva, Iara Karlla Dasilva, Yolanda Arce, Jose Ballarin. Fundacio Puigvert.*

Background: It is known that living donor (LD) transplants present better outcome than deceased ones (DD). Renal fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) is the best predictor of renal function and it could be induced by chronic inflammation. The aim of this study is to analyze the influence of donors in renal outcome.

Methods: Pre-implantational (basal) and 4 month biopsies were analyzed by Remuzzi and Banff scores, respectively. Inflammation and fibrosis markers were quantified by qPCR and IHQ. The aim of this study is to analyze the influence of donors in renal outcome.

Results: Our results show that basal inflammation measured by CD68 positive cells (24 mo, $p=0.006$ and 5 yr, $p=0.005$) and Remuzzi score (24 mo, $p=0.0003$; 5 yr, $p=0.0468$) correlate with medium- and long-term renal function in DD, whereas we did not find it in LD. At 4 months, Banff'05 inflammation (24 mo, $p=0.010$ and 5 yr, $p=0.0233$) and inflammatory and fibrosis markers in DD correlated with medium- and long-term renal function (IL-1 β , 24 mo, $p=0.0187$ and 5 yr, $p=0.0003$; ICAM-1, 24 mo, $p=0.0473$ and 5 yr, $p=0.0007$; MCP-1, 24 mo, $p=0.0212$ and 5 yr, $p=0.0011$ and TNF- α , 24 mo, $p=0.0209$ and 5 yr, $p=0.0202$; TGF- β 1, 24 mo, $p=0.0026$ and 5 yr, $p<0.0001$; fibronectin, 5 yr, $p=0.0007$). On the other hand, in LD, 4 months fibrosis but not inflammation, correlated with renal function only at 24 months, but none of the markers studied by qPCR did it. Moreover, sustained inflammation and fibrosis (Δ 4M-basal) correlated with medium- and long-term renal function (MCP1, $p=0.0003$; TNF- α , $p=0.0241$; IL-1 β , $p=0.0102$ and ICAM-1, $p=0.0026$; TGF- β 1, $p=0.0210$; fibronectin, $p=0.0258$).

Conclusions: In conclusion, early and sustained inflammation in DD are predictors of long-term graft outcome and could be essential in dissimilarities between DD and LD renal outcome.

Funding: Government Support - Non-U.S.

BECAS:

- ✓ El estudio fue parcialmente subvencionado por la beca FIS **PI 12/01524** del Instituto de Salud Carlos III.

