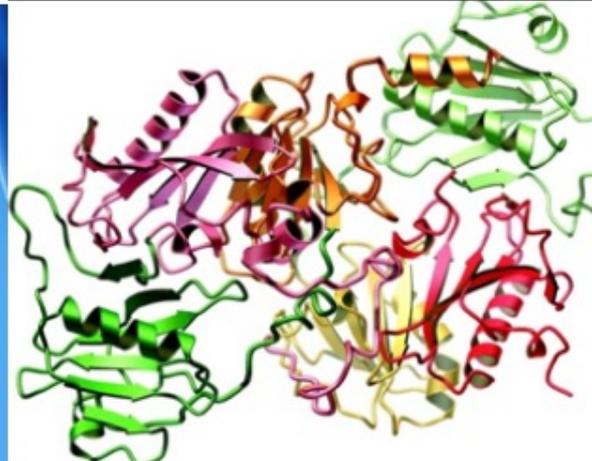
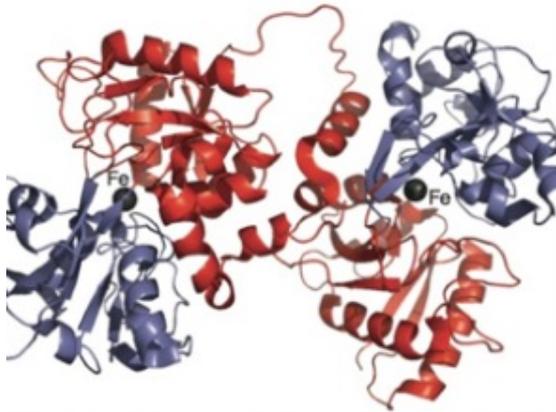




VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE RIESGO EN EL DONANTE Y EN EL RECEPTOR



TESIS DOCTORAL
2015

INMACULADA HDEZ. BEJARANO

SIEMPRE, POR Y PARA MI FAMILIA



Dña. María Jesús Monte Río, Doctora Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

INFORMA

Que el presente trabajo, elaborado por la Lda. en Farmacia Inmaculada Hernández Bejarano para optar al grado de Doctor, con el título **“Análisis de la evolución del trasplante renal mediante la identificación de biomarcadores de riesgo en el donante y en el receptor”**, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores D. Carlos Gómez-Alamillo, Dña. Ana Isabel Morales Martín, Dña. Marta Prieto Vicente y Dña. M^a Ángeles Ramos Barrón, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a 16 de diciembre de 2015.

Fdo.: María Jesús Monte Río



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

D. Carlos Gómez-Alamillo, Doctor en Medicina y Cirugía. Médico especialista en Medicina Interna y Nefrología. Investigador Colaborador del Grupo consolidado de Investigación del Trasplante y Autoinmunidad perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL) de Cantabria integrado en la Red de Investigación Renal (REDINRED).

INFORMA

Que el trabajo titulado **“Análisis de la evolución del trasplante renal mediante la identificación de biomarcadores de riesgo en el donante y en el receptor”**, presentado por Dña. Inmaculada Hernández Bejarano, ha sido realizado bajo su dirección y cumple todos los requisitos científicos y metodológicos necesarios para ser defendido como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Santander, a 3 de diciembre de 2015.

Fdo.: Carlos Gómez-Alamillo



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Dña. Ana Isabel Morales Martín, Profesora Titular Doctora del Área de Toxicología de la Universidad de Salamanca y perteneciente al Grupo de Investigación de Fisiopatología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca.

INFORMA

Que el trabajo titulado **“Análisis de la evolución del trasplante renal mediante la identificación de biomarcadores de riesgo en el donante y en el receptor”**, presentado por Dña. Inmaculada Hernández Bejarano, ha sido realizado bajo su dirección y cumple todos los requisitos científicos y metodológicos necesarios para ser defendido como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a 3 de diciembre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'A' and 'M' followed by a horizontal line.

Fdo.: Ana Isabel Morales Martín



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Dña. Marta Prieto Vicente, Profesora Contratada Doctora del Área de Toxicología de la Universidad de Salamanca y perteneciente al Grupo de Investigación de Fisiopatología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca.

INFORMA

Que el trabajo titulado **“Análisis de la evolución del trasplante renal mediante la identificación de biomarcadores de riesgo en el donante y en el receptor”**, presentado por Dña. Inmaculada Hernández Bejarano, ha sido realizado bajo su dirección y cumple todos los requisitos científicos y metodológicos necesarios para ser defendido como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a 3 de diciembre de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marta Prieto Vicente'.



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Dña. M^a Ángeles Ramos Barrón, Doctora en Medicina y Cirugía. Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Facultativo de Servicio de Urgencias de Atención Primaria de Cantabria. Investigadora Colaboradora del Grupo consolidado de Investigación del Trasplante y Autoinmunidad perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL) de Cantabria integrado en la Red de Investigación Renal (REDINRED).

INFORMA

Que el trabajo titulado **“Análisis de la evolución del trasplante renal mediante la identificación de biomarcadores de riesgo en el donante y en el receptor”**, presentado por Dña. Inmaculada Hernández Bejarano, ha sido realizado bajo su dirección y cumple todos los requisitos científicos y metodológicos necesarios para ser defendido como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Santander, a 3 de diciembre de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'I. Bejarano'.

Fdo.:

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. D. Manuel Arias Rodríguez y al Dr. D. José Miguel López Novoa, por hacer posible esta colaboración y hacer realidad este proyecto.

A los directores de este trabajo, el Dr. D. Carlos Gómez-Alamillo, la Dra. Dña. Ana Isabel Morales Martín, la Dra. Dña. Marta Prieto Vicente y la Dra. Dña. M^a Ángeles Ramos Barrón por su constante ayuda, permanente paciencia, por sus palabras siempre alentadoras y llenas de ilusión y por su dedicación en la elaboración de esta tesis, así como por todo lo que me han enseñado.

A toda la gente que ha hecho posible lo que hoy se plasma en este trabajo, que es mucha y no quisiera olvidar a nadie:

A todo el Servicio de Nefrología del HUMV, a los residentes a los que interrumpí en las guardias por la persecución de las muestras, a D. Jorge Ruíz Criado por su ayuda en esta ardua tarea al igual que Maru, Camino y Paloma, también al Dr. Emilio Rodrigo Calabia por sus aportaciones al proyecto.

Al Servicio de Coordinación de Trasplantes del HUMV, en especial al Dr. Eduardo Miñambres García por su colaboración y por proporcionarme amablemente todos los datos solicitados.

Al Servicio de Bioquímica del HUMV, en especial a Dña. Elena Cruz Iglesias por toda la ayuda prestada para obtener todos los datos de cistatinas.

A Chelo, que además de ser capaz de sacarte una sonrisa en los días grises de Santander peleó como nadie por las muestras y cuyo trabajo fue esencial, al igual que el de Adalberto y María.

A todos mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Fisiología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca, en especial al área de Toxicología Renal y Cardiovascular. Al Dr. Francisco J. López Hernández ya Dr. Moisés Pescador Garriel por la dedicación de ambos a este proyecto y sus esenciales aportaciones.

A mis amigas, por su apoyo incondicional y terapia de grupo, en la distancia unas y en persona otras, especialmente en la dura recta final.

A mi familia, para la que no tengo palabras suficientes para agradecerles estar ahí, apoyarme, escucharme cuando lo necesitaba, prestarme su tiempo, ayuda y comprensión, porque sin ellos este proyecto no hubiera podido salir adelante y en especial a mis niños.

A todos gracias.

α -GST: Alfa glutatión S transferasa
AAP: Alanino aminopeptidasa
ACN: Anticalcineurínicos.
ACVA: Accidente cerebrovascular.
ADQI: Iniciativa de Calidad de la Diálisis Aguda.
AKI: Lesión renal aguda (del inglés acute kidney injury).
AKIN: Organización Internacional sobre AKI.
AT/FI: Atrofia tubular/fibrosis intersticial.
AVAC: Año de vida ajustado por calidad.
BSA: Albúmina sérica bovina.
C: Control.
CCr: Aclaramiento de creatinina.
CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.
CMIA: Inmunoensayo magnético quimioluminiscente.
Cr: Creatinina.
Cro: Creatinina orina.
Crs: Creatinina en sangre.
CsA: Ciclosporina.
CyC: Cistatina C.
CyCs: Cistatina C en sangre.
DII: Disfunción inicial del injerto.
DCE: Donante con criterios expandidos.
DM: Diabetes mellitus.
DP: Diálisis peritoneal.
DS: Desviación estándar.
ECV: Enfermedad cardiovascular.
EFNa: Excreción fraccional de sodio.
ERC: Enfermedadrenal crónica.
EUprot: Excreción urinaria de proteínas.
FAA: Fumaril acetoacetasa.
FABP: Proteína de unión a ácidos grasos.
FAL: Fosfatasa alcalina.
FG: Filtrado glomerular.
FII: Función inmediata del injerto.
FLI: Función lenta del injerto.
FRA: Fracaso renal agudo.
FRI: Función retardada del injerto.
 γ GT: Gamma glutamil traspeptidasa.
G+CsA: Gentamicina+ciclosporina.
HD: Hemodiálisis.
HLAs: Antígenos leucocitarios humanos.
HR: Hazard ratio.
HRP: Peroxidasa de rábano picante.
HTA: Hipertensión arterial.
IL-18: Interleukina 18.
IL-1B: Interleukina-1B.
I/R: Isquemia referfusión.
IRC: Insuficiencia renal crónica.
IRCT: Insuficiencia renal crónica terminal.
KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes.

LE: Lista de espera.
LDH: Lactato deshidrogenasa.
MCP-1: Proteína monocítica quimiotáctica 1.
MDRD: Ecuación de la Modificación de la Dieta en la Enfermedad Renal.
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
mPTP: Poro de transición mitocondrial.
NGAL: Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos.
NTA: Necrosis tubular aguda.
PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1.
PRA: Panel de anticuerpos reactivos.
PVDF: Difluoruro de polivinilideno.
RA: Rechazo agudo.
RBP: Proteína de unión al retinol.
RIC: Rango intercuartil.
RIFLE: Del inglés riesgo, lesión, fallo, pérdida, IRCT.
SDS: Sodio Dodecil Sulfato.
SDS-PAGE: Sodio Dodecil Sulfato Poli-acrilamida Gel Electroforesis.
TSR: Tratamiento sustitutivo renal.
UNOS: United Network for Organ Sharing.

INTRODUCCIÓN.....	5
1. <u>TRASPLANTE RENAL</u>.....	5
1.1 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.....	5
1.1.1. Epidemiología. Registros de IRC y diálisis.....	6
1.1.2 Registro Nacional de diálisis y trasplante.....	9
1.2 GENERALIDADES DEL TRASPLANTE RENAL.....	10
1.2.1 Registro americano de Trasplantes (USRDS).....	14
1.2.2 Situación en España.Registro de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT)	15
1.2.3 Comparación del trasplante con diálisis en cuanto a supervivencia. Costes.....	17
1.3 HISTOLOGÍA DEL TRASPLANTE.....	20
1.4 PROBLEMAS DE SUPERVIVENCIA DEL INJERTO.....	20
1.4.1 Donante.....	20
1.4.2 Fracaso renal agudo en el trasplante renal.....	23
1.4.2.1 Isquemia/Reperusión (IR)	25
2. <u>DIAGNÓSTICO DEL DAÑO RENAL</u>.....	27
2.1 DETERMINACIONES HABITUALES EN CLÍNICA.....	27
2.1.1 Medida de la filtración glomerular.....	27
2.1.2 Estudio de la composición de la orina.....	29
2.2 PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL AKI.....	31
2.2.1 Nuevos conceptos en el AKI.....	31
2.2.2 Una nueva generación de marcadores sensibles y tempranos al daño renal agudo.....	35
2.2.3 Diagnóstico de la predisposición adquirida al Fracaso Renal Agudo.....	39
 HIPÓTESIS.....	 43
 OBJETIVOS.....	 44

MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. FASE PRECLÍNICA	45
1.1 MODELO EXPERIMENTAL	45
1.2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	47
1.3 RECOGIDA DE MUESTRAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	47
2. FASE CLÍNICA	49
2.1 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	49
2.1.1 Sujetos de estudio	49
2.2 TOMA DE MUESTRAS DE LOS PACIENTES Y EVALUACIÓN CLÍNICA	51
3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	52
3.1 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	52
3.1.1 Determinaciones en animales de experimentación	53
3.1.1.1 Determinación de Creatinina (Cr)	53
3.1.1.2 Determinación del aclaramiento de creatinina (CCr)	53
3.1.1.3 Determinación de la concentración de urea plasmática	54
3.1.1.4 Determinación de la concentración de proteínas en orina	54
3.1.2 Determinaciones en muestras clínicas	55
3.1.2.1 Determinaciones bioquímicas	55
3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES	57
3.2.1 Western blot	57
3.2.2 ELISA	60
3.2.3 Determinación otros marcadores	61
3.3 ANÁLISIS DE OTROS PARÁMETROS CLÍNICOS	61
3.3.1 Estudio de biopsias	61
3.3.2 Estudio de la función renal del donante	63
3.3.3 Riesgo de Función Retardada del Injerto	63

3.3.4 Estudio de la función renal a corto y largo plazo.....	64
4. <u>ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO</u>	65
4.1 ANÁLISIS DE FRECUENCIAS.....	65
4.2 CORRELACIONES.....	66
4.3 ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	66
4.4 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.....	66
RESULTADOS	67
1. <u>FASE PRECLÍNICA</u>	67
1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL.....	67
1.1.1 Cambios fisiopatológicos en los animales de experimentación.....	67
1.1.2 Creatinina plasmática.....	68
1.1.3 Urea plasmática.....	69
1.1.4 Aclaramiento de creatinina.....	70
1.1.5 Proteinuria.....	70
1.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	71
2. <u>FASE CLÍNICA</u>	73
2.1 DISTRIBUCIÓN DE SUJETOS Y MUESTRAS.....	73
2.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES.....	74
2.2.1 Datos de los donantes.....	74
2.2.2 Datos de receptores.....	74
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL DE LOS DONANTES.....	75
2.3.1 Niveles séricos de cistatina C y creatinina.....	75
2.3.2 Descripción del score biopsia de donante.....	76
2.4 CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL TRASPLANTE.....	76
2.4.1 Determinaciones analíticas (creatinina y cistatina C en sangre).....	76
2.4.2 Evolución inicial del injerto.....	78
2.5 ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS.....	80

2.5.1 Análisis de las correlaciones de los biomarcadores en donante con los valores de Crs en receptor.....	80
2.5.2. Correlación de los biomarcadores analizados precozmente en receptor y correlación con la Crs.....	82
<u>2.5.2.1 Biomarcadores a día 1 postrasplante y su relación con los niveles de Crs.....</u>	<u>82</u>
<u>2.5.2.2 Biomarcadores a día 3 postrasplante y relación con niveles de Crs.....</u>	<u>83</u>
2.5.3 Análisis de frecuencias.....	85
2.6 ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES AGRUPANDO A LOS PACIENTES RECEPTORES DEL INJERTO RENAL SEGÚN DIFERENTES PARÁMETROS.....	86
2.6.1 Análisis según el filtrado glomerular del donante.....	86
2.6.2 Análisis según la evolución inicial del injerto.....	88
2.6.3 Análisis según la evolución al año del injerto.....	90
2.7 ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE EN RELACIÓN A LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO.....	92
2.7.1. Evolución inicial del injerto.....	92
2.7.2. Evolución del injerto al año del trasplante.....	94
DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	106

1. TRASPLANTE RENAL

1.1 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

La enfermedad renal crónica (ERC) es un grave problema de salud pública, que se define en las Guías de Práctica Clínica para la Evaluación y el Manejo de la ERC, por la presencia de anomalías en la estructura o en la función renal de manera sostenida durante más de 3 meses⁽¹⁾. En las guías KDOQI de 2002, la insuficiencia renal crónica (IRC)⁽²⁾, se define como la presencia de una función renal alterada basada en una disminución del filtrado glomerular (FG) <60 mL/min/1.73 m² durante más de 3 meses. Más recientemente, en las Guías KDIGO referidas⁽¹⁾, junto al estadiaje de la IRC por la tasa de FG, se añade la presencia de mayor o menor microalbuminuria en orina en tres categorías y con estos dos parámetros, se establece su pronóstico (Tabla1).

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1 Normal to mildly increased <30 mg/g <3 mg/mmol	A2 Moderately increased 30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	A3 Severely increased >300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

Tabla 1. Diagnóstico de ERC por FG y microalbuminuria según *Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)*. Reproducido de *KDIGO*, 2012⁽¹⁾.

La identificación de la presencia y el estadio de la IRC se acompañan de la evaluación precisa de la causa de enfermedad y condiciones de comorbilidad asociadas al paciente⁽¹⁾. La IRC se asocia a elevada morbilidad y mortalidad, por lo que el diagnóstico oportuno y tratamiento tiene el potencial de retrasar la progresión de la enfermedad y reducir las complicaciones⁽²⁾.

La IRC conlleva en muchos casos la pérdida total de la función renal, derivando a una insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) que indefectiblemente conduce a la muerte del paciente si no es reemplazada la función renal mediante depuración extrarrenal (diálisis) o el trasplante de un riñón.

Es de interés señalar que en el caso de los receptores de riñón, éstos deben ser considerados como pacientes con IRC por varias causas: primero, el FG tiende a ser más bajo por ser pacientes monorrenos y además, la toxicidad de los fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina (CsA) o tacrólimus influye en la disminución del FG; en segundo lugar, estudios de biopsias de protocolo demuestran muchas veces daño debido a rechazo agudo (RA) tardío y prácticamente en todos los injertos está presente una atrofia tubular/fibrosis intersticial (AT/FI) en distinto grado, incluso presentando niveles normales de creatinina en sangre (Cr_s)⁽²⁾.

1.1.1 Epidemiología. Registros de IRC y diálisis

En Estados Unidos, la prevalencia de la IRC se incrementó desde 1988-1994 a 1999-2004 del 12 al 14%, pero se ha mantenido estable desde entonces. El mayor incremento tuvo lugar en pacientes en estadio 3 de la enfermedad, del 4.5% al 6.0% en tres períodos de tiempo comparados (Fig 1).

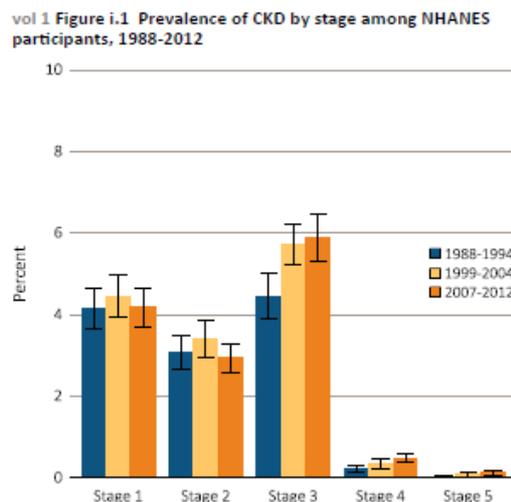


Fig 1. Prevalencia de
Nutrition Examination

Data Source: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1988-1994, 1999-2004 & 2005-2012 participants age 20 & older. Whisker lines indicate 95% confidence intervals. Abbreviations: CKD, chronic kidney disease. This graphic also appears as Figure 1.1.

as National Health and
DS, 2014⁽³⁾.

La edad supone un importante factor de riesgo para la IRC, lo que supone implicaciones prácticas para el diagnóstico, prevención, estratificación de riesgos y tratamiento. La prevalencia de IRC en pacientes mayores de 65 años del último registro americano de enfermos renales (Datos obtenidos del sistema de salud Medicare) de 2012 continuaba aumentando del 10.4% (período 2000-2012) (Fig 2).

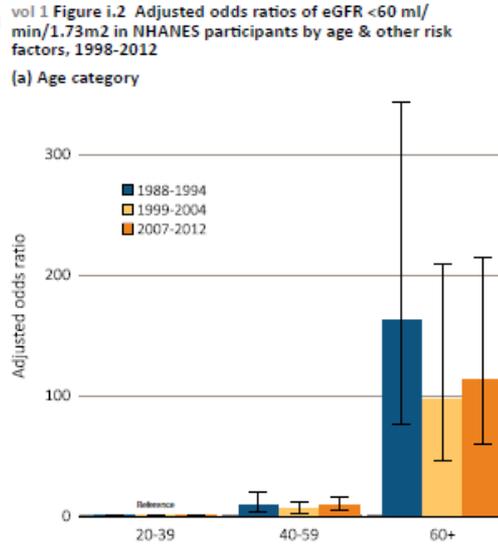


Fig 2. Ratios ajustados de FG <60ml/min/1.73m² según edad (datos NHANES). Reproducido de USRDS, 2014⁽³⁾.

Otros importantes y relevantes factores de riesgo de IRC son la presencia de diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular (ECV), obesidad, hiperlipemias y antecedentes familiares de IRC o fracaso renal agudo (FRA)⁽³⁾ (Fig 3).

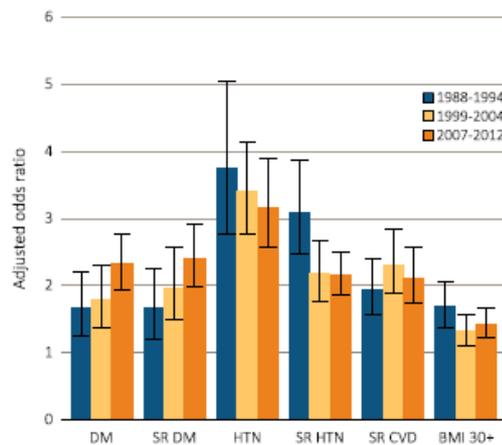


Fig 3. Factores de riesgo de IRC. Abreviaturas: índice de masa corporal (BMI) y HTA reportada (SR HTN) y HTA reportada (SR HTN).

Data Source: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1988-1994, 1999-2004 & 2007-2012 participants age 20 & older; single-sample estimates of eGFR & ACR. Adj: age, sex, & race; eGFR calculated using the CKD-EPI equation. Whisker lines indicate 95% confidence intervals. Abbreviations: BMI, body mass index; CKD, chronic kidney disease; CVD, cardiovascular disease; DM, diabetes mellitus; HTN, hypertension; SR, self-report. This graphic also appears as Figure 1.9.

NHANES de 1988 a 2012. Factores de riesgo de IRC (ECV (CVC), DM, HTA)

Se registran tasas elevadas de mortalidad en pacientes con IRC en comparación con la población general y las tasas aumentan con el estadio de la IRC. Además, la concurrencias de DM, ECV e IRC multiplican el riesgo de muerte del paciente⁽³⁾. Al mismo tiempo, los pacientes con IRC poseen alto riesgo de sufrir ECV y la presencia de la primera, a menudo complica el tratamiento y el pronóstico de la segunda. Así, la prevalencia de cualquier ECV definida según los registros MEDICARE, es dos veces más alta para aquellos pacientes con IRC en comparación con los que no la presentan (69.8% frente al 34.8%)⁽³⁾.

Respecto al tratamiento sustitutivo de la IRC en estadio 5 o IRCT, es decir, pacientes recibiendo diálisis o trasplante, en Estados Unidos durante el año 2012 se registró un 3.7% menos de nuevos casos respecto al año anterior, lo que representa una incidencia de 358.6 de casos por millón de población (pmp) y una prevalencia de 1942.9 pmp al final de 2012. En este mismo año el número de pacientes en diálisis disminuyó en un 3.8%, a pesar de que aproximadamente 5200 pacientes con injerto no funcionante volvieron a diálisis. Los datos anuales de los Centros del sistema Medicare & Medicaid registraron una reducción total del 4% de pacientes que iniciaban diálisis o la retomaban en 2012 respecto al año anterior (Fig 4).

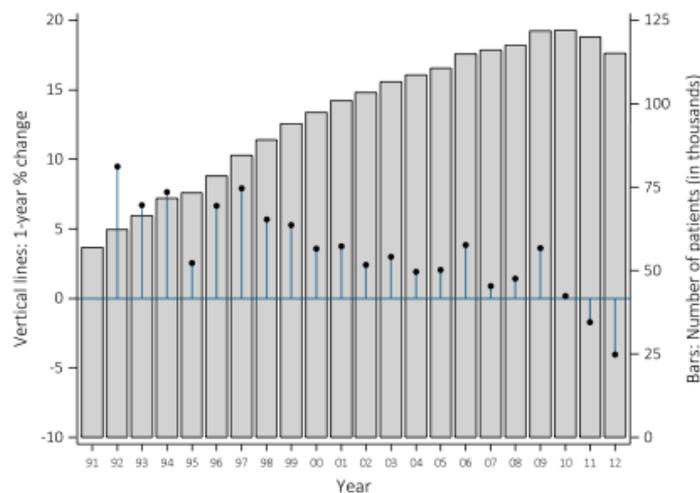


Fig 4. Total de pacientes inicio/vuelta a diálisis (datos Medicare & Medicaid de 1991 a 2012).

Así, aunque la prevalencia de la IRCT continúa incrementándose, las últimas tendencias indican que la tasa de incidencia puede comenzar a disminuir después de haber llegado a una meseta durante algunos años (Fig 5).

vol 2 Figure i.2 Trends in the number of incident cases of ESRD, in thousands, by modality, in the U.S. population, 1980-2012

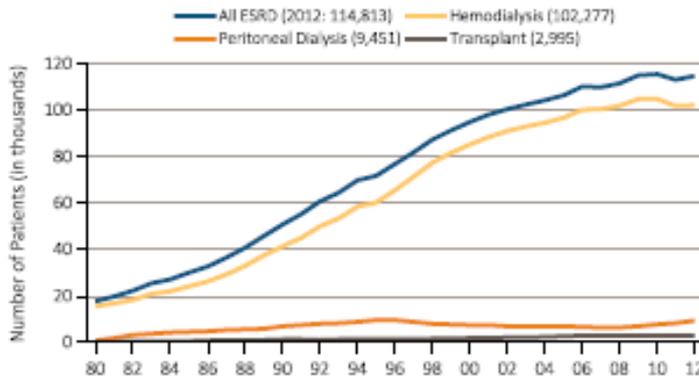


Fig 5. Tendencias estadounidenses

Data Source: Reference table D1. Abbreviations: ESRD, end-stage renal disease. This graphic is also presented as Figure 1.1.

en la población

1.1.2 Registro Nacional de diálisis y trasplante

Según el Registro Español de Enfermos Renales, en 2013, iniciaron tratamiento renal sustitutivo 124.2 pmp. La incidencia global se encuentra estabilizada en los últimos años y existe una gran variabilidad entre Comunidades Autónomas (Fig 6).

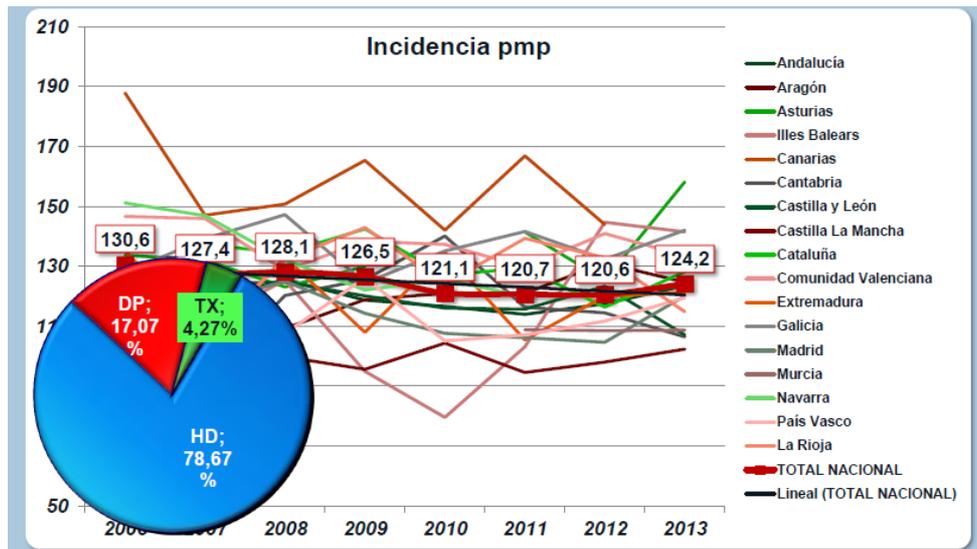


Fig 6. Incidencia global en España de tratamiento sustitutivo en IRC1 desde 2006. Reproducido de Registro Español de Enfermos renales, Informe de diálisis y trasplante 2013.

El 78.7% de los pacientes que iniciaron tratamiento renal sustitutivo en 2013 lo hicieron en hemodiálisis (HD), el 17.1% con diálisis peritoneal (DP) y el 4.3% recibieron un trasplante como primer tratamiento. La mayor incidencia de tratamiento renal sustitutivo se observa en grupos de mayor edad, siendo del 32% en el rango de 45-64 años 26% en el de 65-74 años y 30% en los mayores de 75 años de los tratamientos

iniciados. Los pacientes en tratamiento por IRCT en 2013 suponían una prevalencia de 1122.3 pmp y la modalidad de tratamiento era: HD 42.8%, DP 5.5% y trasplante funcional 51.7% (Fig 7).

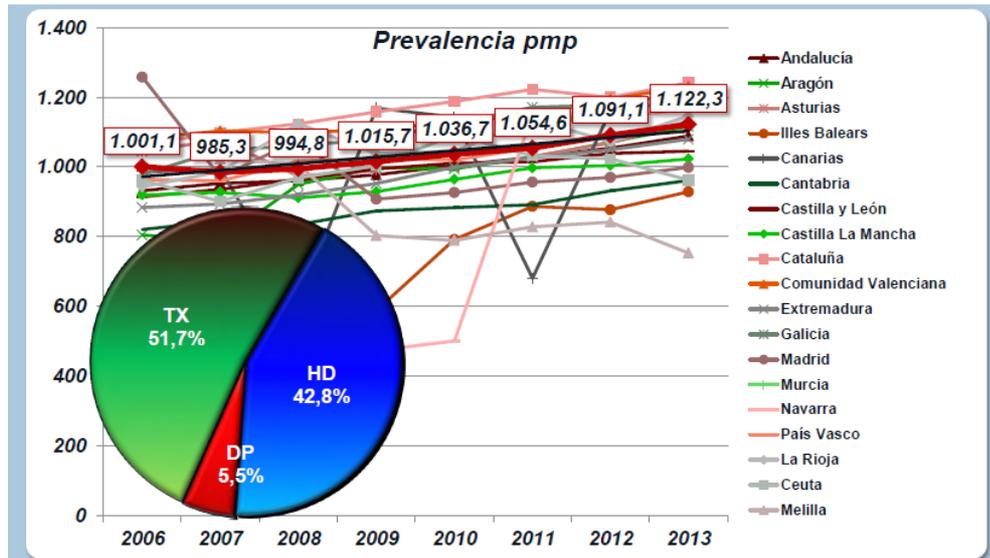


Fig 7. Prevalencia global en España desde 2006. Reproducido de Registro Español de Enfermos renales, Informe de diálisis y trasplante 2013.

La mayor prevalencia de IRCT se encuentra en el grupo de pacientes con edades comprendidas entre 65 y 74 años, hecho repetido en informes anteriores^(4;5).

1.2 GENERALIDADES DEL TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal es el tratamiento de elección para la mayoría de enfermos con IRCT, ya que se asocia con mayores expectativas de supervivencia y mejor calidad de vida en comparación con la diálisis⁽⁶⁻⁸⁾.

Existen dos opciones para el trasplante, de donante vivo, emparentado o no y de donante cadáver. Los trasplantes de donante vivo están asociados a mejores resultados. En cuanto a trasplante de donante cadáver, éste debe estar sin evidencia de disfunción renal irreversible y sin factores de riesgo conocidos de transmitir una potencial enfermedad al receptor. Respecto a la edad máxima del donante, esta puede variar, tendiéndose hoy día a utilizar riñones de donantes añosos, lo que ha dado lugar al concepto de donante con criterios expandidos (DCE). Es en estos casos cuando la

biopsia renal puede ser decisiva para determinar si el riñón es apropiado o no para el trasplante⁽⁹⁾.

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), codifica los antígenos leucocitarios humanos (HLAs) que juegan un papel fundamental en el control de la respuesta inmune. El MHC tiene un elevado grado de polimorfismo, los loci HLA que codifican para los antígenos A, B y DR son los más comúnmente hallados en el trasplante renal, cada uno de los cuales presenta diferentes fenotipos (A1, A24, B8, DR4...), es por esto que se hace necesario el tipaje HLA de donante y receptor. En un principio, los antígenos fueron identificados usando antisueros obtenidos de mujeres multíparas, con el tiempo se descubrieron nuevos antígenos que permitían dividir algunos antígenos HLA en especificidades más estrechas. Así, HLA-A9 fue dividido en HLA-A23 y -A24, HLA-A10 se dividió en HLA-A25, -A26, -A34 y -A66...etc. Aunque el número de antígenos HLA, alelos y combinaciones es muy grande, las frecuencias de antígenos individuales, alelos y combinaciones varían considerablemente, de manera que el antígeno más común HLA es -A2 encontrado aproximadamente en el 50% de los individuos del mundo y aproximadamente el 96% de los caucásicos de ascendencia europea que expresa HLA-A2 tienen el alelo HLA-A*0201. Por lo tanto, algunos antígenos y alelos son comunes y otros raros, de hecho aún no se han establecido frecuencias para la mayoría de los alelos. El grado de histocompatibilidad o grado de similitud entre antígenos HLA de donante y receptor afecta a la supervivencia del injerto a largo plazo, por esa razón la prueba cruzada o análisis de una muestra de sangre o tejido linfático del receptor frente a un panel de antígenos HLA es el paso previo obligado en la selección donante-receptor. El establecimiento de la prueba cruzada de células T citotóxicas como la prueba inmunológica requerida antes del trasplante permite la reducción del rechazo hiperagudo. Inicialmente, se trataba de una prueba que no era ni específica ni lo suficientemente sensible como para definir todos los anticuerpos relevantes, de hecho, los identifica si un receptor tiene anticuerpos a un solo donante de interés, en comparación con el panel de anticuerpos reactivos (PRA), que identifica el porcentaje de anticuerpos a un grupo de donantes potenciales. Con el tiempo, los ensayos se han desarrollado para hacer frente a estas limitaciones y la mejora de la sensibilidad ha conducido a un examen crítico de los cuales los anticuerpos identificados por técnicas más sofisticadas son predictivos de los resultados clínicos significativos⁽¹⁰⁾. Así, el test

del luminex (basado en un método de citometría de flujo con microperlas recubiertas con antígenos individuales recombinantes HLA) debido a su alta resolución, es actualmente la única técnica que permite precisar la caracterización y porcentaje de anticuerpos específicos HLA⁽¹¹⁾. Este tipo de anticuerpos detectados deben ser usados en conjunción con los resultados de compatibilidad cruzada para ayudar a clasificarlos como inmunológicamente irrelevante o relevante (alto riesgo de rechazo del injerto o pérdida, o trasplante contraindicado).

En cuanto al método tradicional de extracción de riñón, éste ha sido la nefrectomía abierta, pero la introducción de la nefrectomía laparoscópica en la donación de vivo ha supuesto una gran ventaja en la donación de órganos. En cualquiera de los casos, se debe aislar cuidadosamente el riñón para preservar todas las arterias y venas renales así como el suministro sanguíneo periureteral. Una vez extraído el órgano se mantiene en salino congelado, se quitan los clampajes vasculares y la arteria renal se irriga con líquido de perfusión frío⁽¹⁰⁾. En el receptor, el injerto renal se aloja extraperitonealmente en la fosa ilíaca izquierda o derecha y la anastomosis vascular se realiza entre la arteria y vena renal del donante y la arteria y vena ilíacas, habitualmente externas, del receptor. Se sigue con la ureteroneocistostomía (sutura del uréter de donante a la vejiga del receptor), con técnica antireflujo (Fig 8).

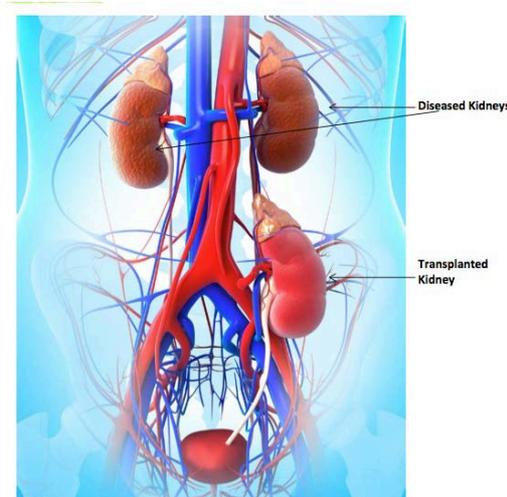


Fig 8. Anatomía del trasplante renal. Reproducido de BC transplant et al, 2015⁽⁹⁾.

Inmediatamente antes del trasplante, el paciente debe iniciar una terapia inmunosupresora, siendo el tratamiento estándar esteroides, tacrólimus y micofenolato mofetilo. Respecto al riesgo inmunológico, los receptores con <20% de anticuerpos

reactivos y con primer trasplante o trasplante repetido sin RA en el primer año tienen bajo riesgo, los receptores con anticuerpos reactivos entre 20-80% constituyen el grupo de riesgo intermedio y son receptores de alto riesgo aquellos con >80% de anticuerpos reactivos o con uno o varios RA antes del primer año en trasplantes previos. En estos casos se suele suplementar el tratamiento inmunosupresor con basiliximab o timoglobulina en los primeros días del trasplante.

Durante el periodo postoperatorio se monitoriza estrechamente al paciente, fundamentalmente la función renal y niveles de tacrólimus. Las complicaciones tempranas de este periodo incluyen necrosis tubular aguda (NTA), complicaciones derivadas de la cirugía, tales como fugas urinarias, trombosis vascular, infecciones, toxicidad por anticalcineurínicos y RA.

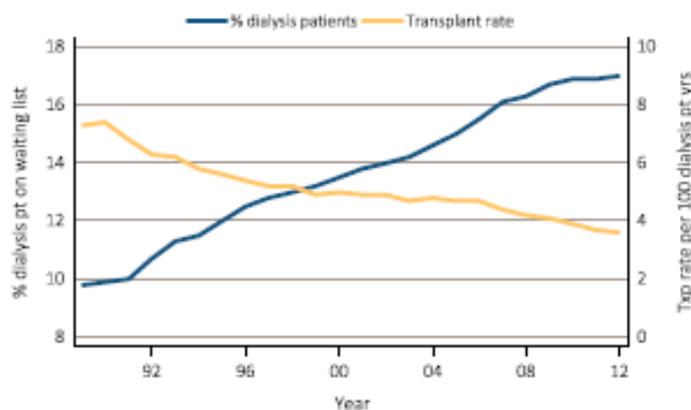
Los episodios de RA se dan en menos del 20% de los receptores con bajo riesgo en las primeras 26 semanas tras la intervención, siendo en la mayoría de los casos episodios reversibles. El RA no presenta síntomas, por lo que el diagnóstico se basa en los incrementos de Crs y se confirma con la biopsia renal⁽⁹⁾. Hay que diferenciar el rechazo humoral del celular. El RA celular es la forma más común de rechazo temprano, una de las primeras alteraciones histológicas que se manifiestan es un edema difuso e infiltrado de leucocitos en intersticio y túbulos, que se transforman en linfocitos (T4 y T8) acompañado de monocitos y células plasmáticas que provocan cambios degenerativos en el epitelio o tubulitis⁽¹⁰⁾. A diferencia, el rechazo mediado por anticuerpos o humoral se caracteriza por la presencia de antígenos donante específicos, Cd4 positivo en la biopsia y evidencias histopatológicas de lesión mediada por anticuerpos como es la glomerulitis, capilaritisperitubular y arteritis⁽¹¹⁾. Existen cuatro tipos de rechazo, el hiperagudo, acelerado, agudo y crónico; el primero se da cuando el receptor posee anticuerpos frente a antígenos del donante, aparece de minutos a horas tras el trasplante y produce lesiones irreversibles, hoy en día casi inexistente; el rechazo acelerado es debido a la presencia en el receptor de anticuerpos antiHLA a bajo título y preexistentes al trasplante y suele aparecer en la primera semana postrasplante. La aparición de RA celular suele ocurrir entre la primera y la tercera semana postrasplante y su evolución es normalmente reversible tras tratamiento con bolus de esteroides. Aproximadamente en el 10% de los casos aparecería un RA humoral, de peor pronóstico; por último el rechazo crónico, manifestado histológicamente por AT/FI aparece más tarde, tras meses o años de una función renal estable⁽⁹⁾.

1.2.1 Registro americano de Trasplantes (USRDS)

En Estados Unidos, la tasa de trasplantes por cada 100 pacientes dializados al año está disminuyendo, mientras que la prevalencia de pacientes dializados en lista de espera de trasplante renal se ha incrementado (Fig 9a). Las causas que probablemente contribuyen a esto incluyen una prevalencia más alta de la población en diálisis, con una supervivencia más larga, iniciación de diálisis en pacientes de mayor edad, más enfermos que no son candidatos idóneos para trasplante, menor supervivencia del injerto debido al mayor número de incompatibilidades del donante y una demanda que conduce a trasplante de riñón con tiempos de espera más largos. No obstante a todo lo anterior, el número total de trasplantes de riñón se ha incrementado en la última década (Fig 9b). Durante este periodo, se produjo un incremento general de donaciones de cadáver, que se ha equilibrado con un descenso que presentan las donaciones de vivo.

vol 2 Figure i.12 Trends in transplantation: unadjusted rates, waiting list counts, waiting time, counts of transplants per year.

(a) Percent of dialysis patients wait-listed and unadjusted and transplant rates



(b) Counts of total transplants

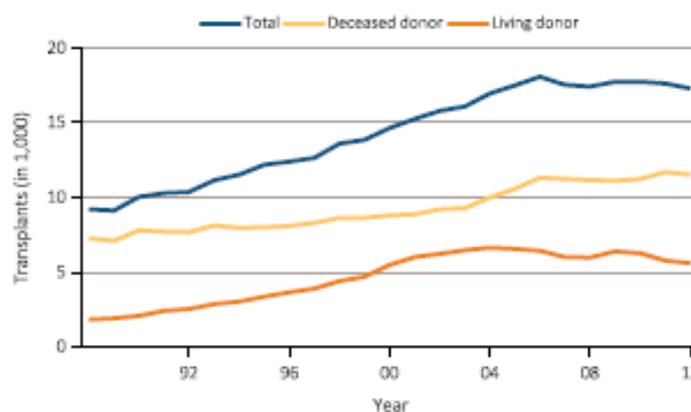


Fig Data Source: Reference Tables E4, E9; E2, E3; E8, E8(2), E8(3); D9. Percent of dialysis patients on the kidney waiting list is for all dialysis patients. Unadjusted transplant rates are for all dialysis patients. Waiting list counts include all candidates listed for a kidney transplant on December 31 of each year. Waiting time is calculated for all recipients enrolled on the waiting list in a given year. Functioning transplant is the annual status on December 31 of each year of all patients who received a kidney transplant, regardless of transplant date. This graphic is adapted from Figure 6.1.

l 2014).

En 2011, entre los receptores de riñón procedente de cadáver, la probabilidad de fallo del injerto (incluyendo muerte con injerto funcional) durante el primer año de seguimiento fue de 0.08%, mientras que en el caso de injerto procedente de donante vivo, la probabilidad de fallo del injerto fue de 0.03%. La probabilidad de supervivencia de los receptores de riñón de donante cadáver durante el primer año postrasplante fue del 97% en comparación con el 99% de supervivencia en aquellos que recibieron injerto procedente de donante vivo⁽³⁾.

1.2.2 Situación en España. Registro de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT)

Durante el año 2013 se han realizado en España 2552 trasplantes renales. En 10 años se ha incrementado en un 41.7% la donación de riñón. La tasa de trasplante renal de cadáver está en 46.1pmp (Fig 10), lo que nos sitúa entre los países con una mayor tasa en este tipo de trasplantes.

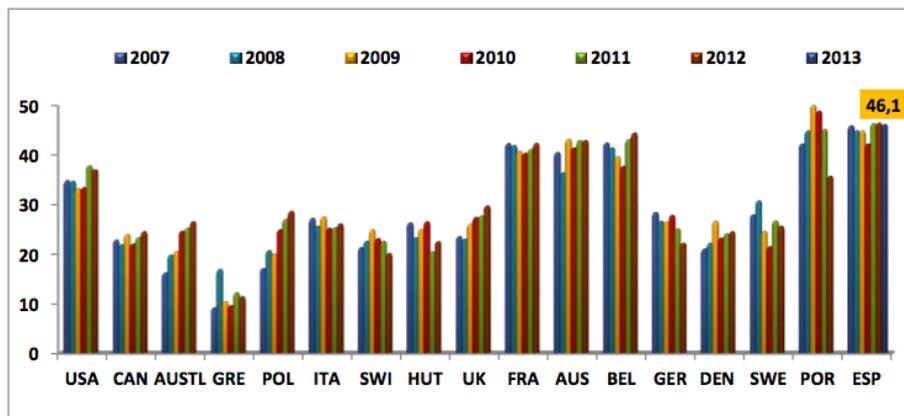


Fig 10. Actividad de trasplante renal de cadáver (pmp). España versus otros países. 2007-2013. Reproducido de Memoria de actividad ONT, 2013.

La actividad de trasplante renal realizada en España ha sido mayoritariamente de donante cadáver; no obstante, durante el año 2013 se han realizado 382 trasplantes renales de donante vivo, lo que supone casi el 15% del total de la actividad trasplantadora y aunque ha experimentado un aumento significativo durante los últimos años, sigue siendo baja en comparación con otros países de nuestro entorno (Tabla 2).

Año	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Total Tx	1924	2032	2131	2125	2200	2157	2211	2229	2328	2225	2498	2551	2552
Don. Vivo	31	34	60	61	87	102	137	156	235	240	312	361	382
Don. Cadáver	1893	1998	2071	2064	2113	2055	2074	2073	2093	1985	2186	2190	2170
Bloques	5	8	13	8	3	5	5	4	11	3	7	4	5
Birrenales	24	33	25	31	17	31	23	19	10	22	22	15	9
Asistolia	26	71	80	92	97	78	104	105	148	158	140	201	200
Infantiles	60	66	68	68	72	58	72	62	62	58	63	59	67

Tabla 2. Trasplantes renales en España. 2001-2013. Reproducido de Memoria de actividad ONT, 2013.

Hoy en día la situación global de los pacientes con IRCT se divide en 24322 pacientes en diálisis y 25854 pacientes con un trasplante renal funcional. La lista de espera la forman 4332 pacientes, con un 6.9% de hiperinmunizados (Fig 11).



Fig 11. Tratamiento sustitutivo de la IRC en España 2013. Reproducido de Memoria de actividad ONT, 2013.

La edad de los donantes vivos adultos se sitúa entre los 26 a 76 años, con una media de 52.0 ± 10.5 y la de los receptores adultos entre 16 y 76 años, con una media de $45.7 \pm 13.7^{(12)}$ (Tabla 3).

Sólo adultos	Donantes N:358	Receptores N:359
Edad [media (DE)]	52 (10,5)	45,7 (13,7)
Edad [mediana (%25-%75)]	52,5 (46-60)	47 (34-57)
Edad (mínima-máxima)	26-76	16-76

Tabla 3. Edades de donante y receptor en el trasplante renal de donante vivo. Reproducido de Memoria de actividad ONT, 2013.

En el año 2006, los pacientes con trasplante funcional suponían alrededor del 50% del total de pacientes en tratamiento por IRCT, reflejo de la excelente actividad de

trasplante renal en España, que se sitúa en primera posición mundial en número de trasplantes renales realizados pmp con donante cadáver(46pmp)⁽⁴⁾. En 2013 se llega a la cifra de 2552 fundamentalmente debido al aumento consistente del trasplante de donante vivo (15%) y el trasplante de riñones de pacientes fallecidos en asistolia (7.8%) (Fig 12).

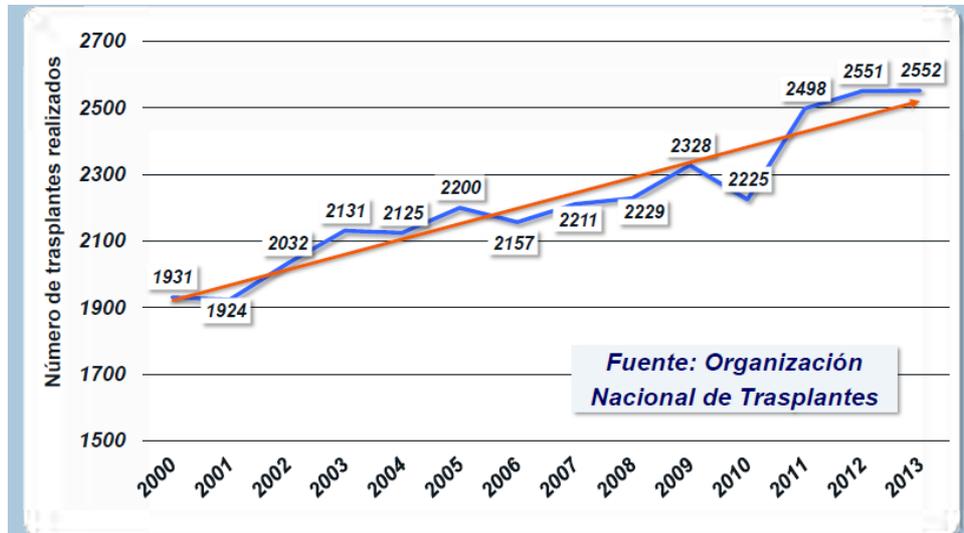


Fig 12. Tendencia del trasplante renal desde el año 2000. Reproducido de Registro Español de Enfermos renales, Informe de diálisis y trasplante 2013.

1.2.3 Comparación del trasplante con diálisis en cuanto a supervivencia.

Costes

El tratamiento sustitutivo renal (TSR) es un tratamiento muy costoso, es la terapia crónica más cara en atención especializada, con un coste medio por paciente seis veces mayor que el del SIDA. Se trata de un tratamiento aplicado a uno de cada 1000 ciudadanos, pero que consume el 2.5% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud y más del 4% del de la atención especializada. Aunque no se puedan aplicar fácilmente comparaciones con otras terapias, pues los costes del TSR superan algunas definiciones de «ineficiencia» como los 35000 a 50000 euros/AVAC (año de vida ajustado por calidad)^(13;14), sí es posible comparar la eficiencia de las tres modalidades de TSR, HD, DP y trasplante renal, cada una con costes muy diferentes. En la actualidad, un 48% de los pacientes en TSR en España han sido trasplantados, un 46% están en HD y un 6% en DP⁽⁴⁾.

Un estudio de costes de las diferentes modalidades de TSR en España, mediante un modelo de Markov⁽¹⁵⁾, de datos tomados de la base de datos de costes sanitarios OBLIKUE puso de manifiesto que el coste final por paciente y año de pacientes con diálisis ascendía a los 956.6€ en caso de ser programada y a los 4736.6€ en los casos de diálisis no programada. Mientras el coste de la sesión de HD hospitalaria recogido en OBLIKUE procedente de un estudio publicado en 2001 se estimaba en 197.4€, el coste medio de la sesión de DP ambulatoria continua era de 41.0€ y de DP automatizada de 64.2€ según las tarifas de Boletines Oficiales de diferentes Comunidades Autónomas. El coste recogido de trasplante en el año 2006 ascendía a 28764.2€, siendo el coste total del trasplante el primer año de 47136.3€. En cuanto a los costes directos que conlleva el trasplante en los años sucesivos, se ha obtenido un coste agregado por paciente y año de 6477.2€.

En Estados Unidos, la declaración de costes del Medicare en el año 2012 fue un 3.5% más alta que en el año 2011 (28.6 billones de dólares frente a 27.7 billones de dólares). Del gasto total, el correspondiente a pacientes con IRCT se incrementó un 3.2%, pero a pesar de esto continúa la tendencia descendente en la fracción del gasto Medicare atribuible a pacientes con IRCT desde el pico registrado en 2006⁽³⁾. Respecto al trasplante, los costes anuales después del primer año postrasplante son mucho más pequeños, siendo los costes promedio registrados en Medicare \$14427 y \$11157 respectivamente durante el segundo año. El total, \$25584, se espera que se mantenga estable en los últimos años y es aproximadamente de la mitad a un tercio del coste anual total de la atención a un paciente de diálisis. Aunque el trasplante de riñón es de todos los trasplantes de órganos sólidos el menos costoso por paciente, los receptores de trasplante de riñón representan el 64% del total de Medicare⁽¹⁶⁾.

En cuanto a términos de supervivencia de los pacientes dializados, ésta depende de múltiples factores. Datos del Registro Español indican que las diferencias de mortalidad se mantienen entre las distintas modalidades de tratamiento de la IRCT. Si se analizan los datos registrados desde 2002, la única modalidad de diálisis que presenta una clara disminución de la mortalidad en los pacientes tratados es la DP (la cifra se reduce del 12.0% en 2002 al 8.9% en 2013), mientras que en el caso de tratamiento por HD, se produce un incremento de la mortalidad desde 2002 hasta 2013 de un 2.0% (Fig 13). La supervivencia en los pacientes trasplantados es muy superior en comparación con la supervivencia de los pacientes tratados por HD y DP, estando situada esta

diferencia en un 10% en 2002. El fallecimiento en pacientes trasplantados registrados de 2002 a 2013 se mantiene bastante estable, aunque con un ligero incremento en los últimos años.

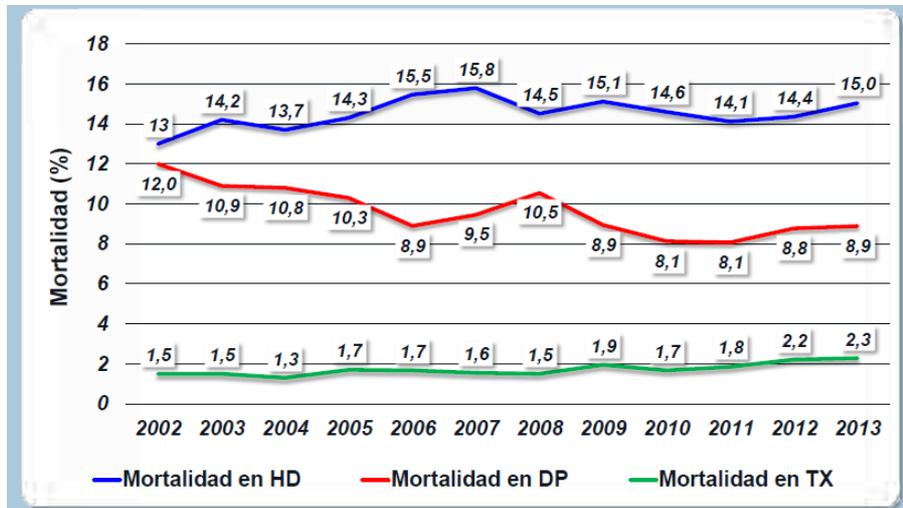


Fig 13. Mortalidad según modalidad de tratamiento desde 2002. Reproducido de Registro Español de Enfermos renales, Informe de diálisis y trasplante 2013.

El análisis de supervivencia de enfermos renales entre los años 2004 a 2012, con una muestra de 40394 pacientes de todos los grupos de edad y con seguimiento de más de 3 meses indicaba que los pacientes trasplantados, que suponían el 19.2%, tenían una supervivencia muy superior a la de aquellos en diálisis (Fig14).

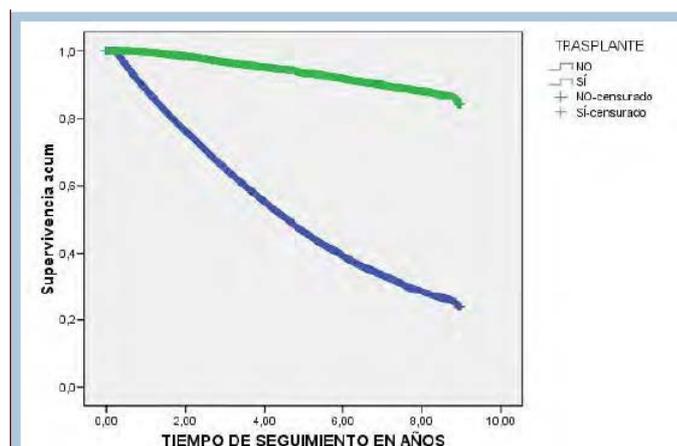


Fig 14. Análisis de supervivencia por COX univariable: HR 0.092; IC 95% 0.084-0.100; $p < 0.000$. Verde: trasplantados; azul: no trasplantados. (Datos del Registro de enfermos renales, Informe de diálisis y trasplante 2013).

Así pues, el trasplante constituye la terapia de elección para los pacientes con IRCT, ya que proporciona mejores resultados en términos de supervivencia y calidad

de vida que el tratamiento con diálisis y con un coste menor⁽¹⁷⁾, al tratarse de la técnica con mejor relación coste-efectividad⁽¹⁵⁾.

1.3 HISTOLOGÍA DEL TRASPLANTE

El examen histológico de la biopsia renal sigue constituyendo a día de hoy la mejor técnica diagnóstica de la patología del injerto. Su principal valor reside en la posibilidad de diferenciar de forma detallada la presencia de lesiones sugerentes de RA, necrosis tubular aguda, nefrotoxicidad por anticalcineurínicos o lesiones de tipo crónico. La introducción de los criterios de Banff⁽¹⁸⁾ y sus respectivas actualizaciones⁽¹⁹⁾ ha permitido disponer de una herramienta con una elevada correlación clínico-patológica⁽²⁰⁾ e internacionalmente aceptada para la descripción de las lesiones agudas y crónicas del injerto renal. Por ello, la biopsia no sólo constituye la mejor alternativa diagnóstica, sino que también es una buena herramienta para la evaluación pronóstica y de viabilidad del injerto.

1.4 PROBLEMAS DE SUPERVIVENCIA DEL INJERTO

1.4.1 Donante

La disparidad creciente entre el número de pacientes en lista de espera para recibir un trasplante renal y el número de injertos disponibles ha propiciado la necesidad de ampliar los criterios mediante los cuales se considera a un riñón adecuado para el trasplante⁽²¹⁾. Así, en el 2001, la «United Network for Organ Sharing»(UNOS) definió a los DCE como aquellos donantes cadáver con una edad ≥ 60 años o bien con una edad entre los 50 y 59 años y al menos 2 de los siguientes 3 factores de riesgo: muerte por accidente cerebrovascular (ACVA), HTA o Crs en el momento de la donación $>1.5\text{mg/dL}$ ⁽²²⁾. Estos órganos procedentes de DCE se asocian con una función no adecuada postrasplante^(23;24) y menor supervivencia del injerto^(25;26).

Los esfuerzos relacionados con el donante para reducir la incidencia de disfunción inicial del injerto (DII) se centran en la intervención post-extracción, reduciendo los tiempos de isquemia fría, la perfusión y las técnicas de transporte en

frío⁽²⁷⁻³⁰⁾. En este sentido se establecen objetivos en la gestión del donante para optimizar la calidad de los órganos, habiéndose analizado el impacto de éstos en el desarrollo de DII en receptores de trasplante renal⁽³¹⁾. La adecuada adherencia a estos objetivos en las 12-18h tras el consentimiento o en cualquier momento antes de la extracción del injerto consigue disminuir las tasas de DII, sugiriendo la presencia de una ventana terapéutica para optimizar el estado del órgano del donante en la extracción y en los momentos previos al trasplante. De aquí que actualmente se optimicen los métodos para disminuir la DII en receptores de riñón procedente de donantes cadáver, incluyendo el uso de bajas dosis de dopamina en el donante, la minimización del tiempo de isquemia fría, la perfusión pulsátil automática del órgano, la actualización de la selección de receptores y la inmunosupresión^(28;32-35).

Para mejorar la cantidad y calidad de los riñones donados y así establecer criterios generales para los cuidados críticos proporcionados a pacientes con lesiones cerebrales graves que derivan a potenciales donantes tras la determinación de muerte cerebral, se proponen nueve verificaciones que constituyen los objetivos de gestión de donantes (Tabla 4).

Donor management goals	Parameters
1. Mean arterial pressure	60–100 mmHg
2. Central venous pressure	4–10 mmHg
3. Ejection fraction	≥50%
4. Vasopressors	≤1 and low dose ¹
5. Arterial blood gas pH	7.3–7.45
6. PaO ₂ :FiO ₂	≥300
7. Serum sodium	135–155 mEq/L
8. Blood glucose	≤150 mg/dL
9. Urine output	0.5–3 cc/kg/h over 4 h

Tabla 4. Checklist de las recomendaciones para el manejo de donantes por muerte cerebral.¹Baja dosis de vasopresores se define como dopamina ≤10µg/Kg/min, fenilefrina ≤60µg/Kg/min y norepinefrina ≤10µg/Kg/min. Reproducido de Malinoski et al, 2013⁽³¹⁾.

Recientemente, se ha diseñado un modelo para predecir el riesgo de DII mediante el análisis cuantificado de factores de riesgo inherentes a donante y receptor⁽³⁶⁾. La adherencia a estos objetivos de gestión de donantes se relacionó con una menor incidencia de DII en receptores de donante cadáver.

En relación a la biopsia del riñón del donante como valoración previa al trasplante, varios estudios han propuesto que el análisis de biopsias preimplantación podría facilitar la selección de injertos^(23;37). La presencia de lesiones preexistentes en la biopsia del donante se asocia con RA, una peor función, desarrollo de lesiones crónicas

posteriores y una supervivencia reducida del injerto^(38;39). A esto hay que añadir que también se ha observado que la implantación de injertos provenientes de donantes subóptimos se asocia a un mayor riesgo de mala función inicial del injerto, así como a una reducción de la supervivencia del injerto y del receptor a largo plazo⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Hay bastante acuerdo en que el hallazgo en la biopsia en el momento del implante de lesiones glomerulares, tubulointersticiales y vasculares, representa uno de los principales factores dependientes del donante que pueden condicionar la evolución del injerto renal. Se ha podido demostrar que la presencia en la biopsia del donante de una glomeruloesclerosis de ~20% se asocia con mala función inicial, así como con una función renal reducida y con la pérdida del injerto a largo plazo⁽⁴³⁻⁴⁷⁾.

Hoy día se utiliza el esquema de Banff 97⁽¹⁹⁾ para estudiar la viabilidad de los órganos antes del trasplante, ya que tiene un poder predictivo sobre la función renal y la supervivencia del injerto similar a la evaluación morfológica (Tabla 5).

1. Glomérulos esclerosados o con atrofia total por quistificación

0: Ausencia.
 1: 0-10%.
 2: 11-20%.
 3: Más del 20%.

Nota: La afectación subcapsular exclusiva no debe ser considerada como condición excluyente del órgano a no ser que esté asociada a patología relevante vascular, tubular del parénquima subyacente.

2. Arteriopatía hialina

0: Ausencia de engrosamiento hialino Pas (+) de las paredes arteriolas.
 1: De leve a moderado engrosamiento hialino Pas (+) en al menos una arteriola.
 2: De moderado a intenso engrosamiento hialino Pas (+) en más de una arteriola.
 3: Intenso engrosamiento hialino Pas (+) en la mayoría de las arteriolas.

3. Engrosamiento fibroso de la íntima vascular

0: Ausencia de lesiones vasculares crónicas.
 1: Menos del 25% de estrechamiento de la luz vascular por engrosamiento miointimal.
 2: Incremento de las lesiones descritas en 1 afectando entre el 26-50% de la luz vascular.
 3: Incremento de las lesiones descritas en 2 afectando a más del 50% de la luz vascular.

4. Atrofia tubular

0: Ausencia de atrofia tubular cortical.
 1: Menos del 25% de túbulos corticales atróficos.
 2: 26%-50% de túbulos corticales atróficos.
 3: Más del 50% de túbulos corticales atróficos.

5. Fibrosis intersticial

0: 5% o menos del área cortical afectada.
 1: 6%-25% del área cortical afectada.
 2: 26%-50% del área cortical afectada.
 3: Más del 50% del área cortical afectada.

Valoración de la puntuación total:

Muestra renal con histología favorable si la puntuación es ≤ 7 .

Tabla 5. Esquema propuesto para la evaluación de biopsias basado en criterio Banff. Reproducido de Serón et al, 2008⁽⁴⁸⁾.

1.4.2 Fracaso renal agudo en el trasplante renal

El FRA se define como una disminución brusca de la función renal que incluye, pero no se limita a fallo renal. Se trata de un amplio síndrome clínico que abarca diversas etiologías, incluyendo enfermedades renales específicas (nefritis intersticial aguda, glomerular aguda y enfermedades renales vasculíticas); condiciones no específicas (isquemia, lesión tóxica); así como la patología extrarrenal (azotemia prerrenal y nefropatía obstructiva postrenal aguda).

El término "lesión renal aguda/deterioro" se propuso para abarcar todo el espectro del síndrome de FRA, desde pequeños cambios en los marcadores de la función renal a requerimiento de diálisis. El FRA o actualmente llamado lesión renal aguda (AKI del inglés acute kidney injury) y como nos referiremos al FRA desde ahora, no es equivalente a NTA ni a insuficiencia renal, en su lugar abarca ambos y también incluye otras condiciones menos severas. De hecho, como un síndrome, incluye pacientes sin daño actual en el riñón pero con deterioro funcional en relación con la demanda fisiológica. Esto significa que el AKI incluye tanto deterioro funcional como lesión⁽¹⁾.

Los criterios RIFLE (del inglés riesgo, lesión, fallo, pérdida, IRCT) y AKIN (Organización Internacional sobre AKI) están aceptados para definir el AKI en órganos nativos^(49;50). Posteriormente, las guías KDIGO combinan los criterios mencionados para determinar la presencia de AKI de manera práctica de acuerdo a unos niveles establecidos (incremento de Crs ≥ 0.3 mg/dL durante 48h o incrementos de Crs 1.5 veces el nivel basal en los 7 días anteriores o volumen urinario de 0.5 mL/Kg/h durante 6 horas)⁽¹⁾. Estos criterios se basan en el incremento de Crs desde un nivel basal para definir 3 estadios de AKI⁽⁵¹⁾ (Tabla 6).

Stage	Serum creatinine	Urine output
1	1.5–1.9 times baseline OR ≥ 0.3 mg/dl (≥ 26.5 μ mol/l) increase	<0.5 ml/kg/h for 6–12 hours
2	2.0–2.9 times baseline	<0.5 ml/kg/h for ≥ 12 hours
3	3.0 times baseline OR Increase in serum creatinine to ≥ 4.0 mg/dl (≥ 353.6 μ mol/l) OR Initiation of renal replacement therapy OR, In patients <18 years, decrease in eGFR to <35 ml/min per 1.73 m ²	<0.3 ml/kg/h for ≥ 24 hours OR Anuria for ≥ 12 hours

Tabla 6. Estadios de AKI según criterios KDIGO. Reproducido de KDIGO, 2012⁽¹⁾.

Los pacientes trasplantados son susceptibles al AKI. Es más, el injerto renal está predispuesto a numerosos insultos agudos derivados de la extracción y conservación, la lesión inmunológica, la toxicidad de la medicación y las complicaciones quirúrgicas. En este caso, se darían todos los posibles tipos de AKI y en cualquier momento del trasplante, (de manera inmediata, temprana y tardía post-trasplante)⁽⁵²⁾. Sin embargo, en el caso de receptores de un trasplante, identificar un nivel basal de función renal es complicado debido a la presencia de IRCT previa, al tratamiento dialítico que se da en la mayoría de los casos y a las fluctuaciones de la función del injerto a lo largo de los meses posteriores al trasplante. Esto se debe en parte al tiempo variable de recuperación de la isquemia reperusión (I/R), a la posibilidad de un RA y a la medicación inmunosupresora aparte de complicaciones vasculares o de la vía urinaria. De esta manera, no existen recomendaciones oficiales en cuanto a criterios diagnósticos específicos para un AKI establecido en el trasplante de riñón.

En cuanto a la incidencia de AKI en receptores de trasplante renal, Nakamura et al⁽⁵³⁾ publicaron un análisis retrospectivo donde se diagnosticó AKI en receptores de donante vivo después de los 3 meses del trasplante utilizando el criterio RIFLE. El AKI tuvo lugar en el 20% de los pacientes incluidos en el estudio, de los cuales en el 64% de los casos se atribuyó el episodio a complicaciones infecciosas (estos datos contrastan con las causas de AKI en órganos nativos, donde el diagnóstico más común es la NTA⁽⁵⁴⁾). La estimación de la supervivencia del injerto a 6.5 años para aquellos con AKI fue del 54% frente al 85% en los que no sufrieron episodio de AKI. En otro análisis de la relación entre el AKI y la consecuente disfunción renal, Mehrotra et al⁽⁵⁵⁾ identificaron durante los 3 años post-trasplante que un 11.3% de pacientes con al menos 6 meses de supervivencia del injerto fueron diagnosticados de AKI. Así pues, el AKI es un hecho común en trasplantados y se asocia a una pobre supervivencia del injerto a largo plazo.

Los pacientes con trasplante renal se pueden dividir en tres grupos según la función inicial del injerto: pacientes con una función inmediata del injerto (FII), que muestran una rápida recuperación de la función renal y buena diuresis, pacientes que requieren ser dializados durante la primera semana, que constituyen el grupo de función retardada del injerto (FRI) y los pacientes con una recuperación lenta de la función renal, definida como una Crs >3mg/dL en el 5º día postrasplante pero sin necesidad de diálisis, que constituirían el grupo de pacientes con función lenta del injerto (FLI)⁽⁵⁶⁾.

Los factores de riesgo para la FRI son la edad del donante y el tiempo de isquemia fría⁽⁵⁷⁾ y su presencia conlleva peores resultados en cuanto a función del injerto, mayor incidencia de episodios de RA y peor supervivencia. Así se demuestra en un estudio retrospectivo⁽⁵⁸⁾ donde se dividió al grupo de pacientes según estos criterios de Humar⁽⁵⁶⁾ y se demostró que el grupo de FLI presentaba durante el primer año postrasplante una menor supervivencia del injerto, peor función renal y una mayor incidencia de RA en comparación con el grupo de FII. La Crs fue peor a los 12 meses en el grupo de FLI/FRI que en los pacientes de FII, sin mostrar diferencias entre los grupos FLI y FRI. En resumen, los receptores que desarrollaron FLI y FRI presentaron de manera similar peores resultados respecto al grupo FII.

Otro reciente artículo⁽⁵⁹⁾ donde se analizó los factores que se correlacionan con la FRI en receptores de riñón de donante cadáver, demostró que los receptores que desarrollaron FRI tuvieron menor supervivencia del injerto y mayor tasa de mortalidad a 1 y 5 años postrasplante. Los factores que afectan a la FRI se relacionan con la calidad del injerto, la muerte cerebral del donante y el estrés oxidativo relacionado, variables de preservación del órgano, factores inmunológicos y variables del receptor⁽³³⁾.

La frecuencia de la FRI varía de 5 a 50% en trasplantados de riñón procedente de donante cadáver y complica el postoperatorio del trasplante, prolongando la hospitalización del paciente e incrementando la morbilidad y los costes.

Además de predisponer a RA, la FRI incrementa el riesgo de AT/FI en el injerto y pérdida prematura del mismo^(34;60-62). Se ha documentado que los pacientes con FRI tienen un 41% de riesgo incrementado de pérdida del injerto⁽⁶³⁾.

1.4.2.1 Isquemia/Reperusión

La I/R se caracteriza por una reducción del flujo sanguíneo al riñón, seguido de una reperusión con una consecuente re-oxigenación y se asocia siempre a la extracción del injerto y posterior implante. La etapa final de la lesión por isquemia se produce en la fase de reperusión, durante la cual el proceso de reparación y regeneración tiene lugar junto con la muerte celular⁽⁶⁴⁾. Es por ello que la I/R tiene un papel relevante en el trasplante renal. Así, durante la extracción del órgano, el clampaje de la arteria renal provoca una corta pero severa isquemia que además se acentúa durante el tiempo de

isquemia fría del injerto^(65;66). En el caso de donante vivo, el daño de la I/R es menos frecuente y severo debido a la ausencia de las alteraciones que provocan la muerte cerebral, a pesar de lo cual, el injerto también sufre una isquemia caliente y un corto tiempo de isquemia fría.

El descenso del suministro de oxígeno induce un cambio del metabolismo aeróbico a anaeróbico⁽⁶⁴⁾ y como consecuencia de la demanda de los tejidos aeróbicos se produce la rápida caída de ATP intracelular y aparición de acidosis intracelular. Este proceso conduce por una parte a la desestabilización de la membrana lisosomal y la consecuente liberación de enzimas lisosmales, que producen la descomposición de la estructura celular⁽⁶⁷⁾ y por otra a la inhibición de la Na⁺-K⁺-ATPasa de membrana^(68;69). Como consecuencia de la depleción del ATP, los niveles intracelulares de Ca²⁺ se incrementan^(70;71) y este exceso de Ca²⁺ provoca la activación de proteasas Ca²⁺ dependientes que pueden dañar a las células tras la normalización del pH con la reperfusion⁽⁷²⁾.

Además de esto, el exceso de Ca²⁺ durante la isquemia provoca la generación de gran cantidad de radicales libres mitocondriales que provocan la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) tras la reperfusion, con la apoptosis y la muerte celular consecuente⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ (Fig 15).

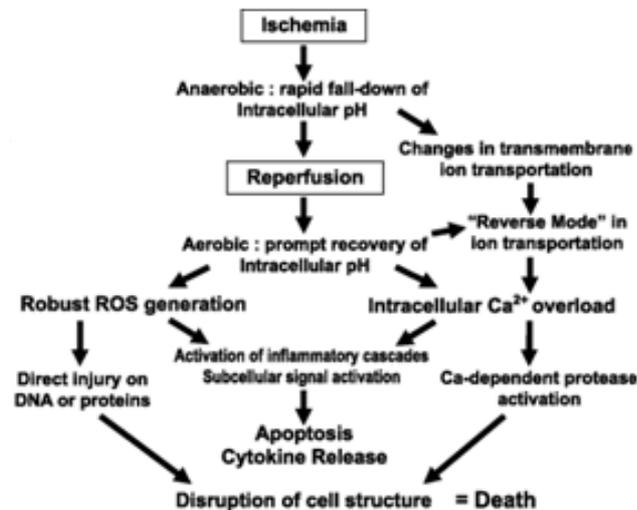


Fig 15. Mekan
Journal of Physiology, 2015⁽¹⁰⁾.

de American

Además, en un reciente estudio⁽⁷⁷⁾ se ha demostrado que inmediatamente tras la extracción del órgano hay un alto incremento de genes pro-inflamatorios como

Interleukina-1B (IL-1B), IL-6, p-selectina y proteína monocíticaquimiotáctica 1 (MCP-1). La I/R se asocia a disfunción microvascular^(78;79), por lo que la I/R se considera un proceso inflamatorio agudo, ya que la activación de células endoteliales que se produce durante la lesión conduce a un incremento de expresión de moléculas de adhesión y como resultado se produce una disminución del número de microvasos en el tejido renal, proceso conocido como enrarecimiento vascular⁽⁸⁰⁾.

Durante la reperusión como consecuencia del restablecimiento del flujo renal⁽⁷³⁾, además de los cambios metabólicos intracelulares antes expuestos, ocurre una activación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa y muerte celular, promoviendo en muchos casos la aparición de RA^(81;82). Dado que la respuesta inflamatoria que prosigue a la I/R tras el trasplante causa un incremento de la inmunogenicidad del injerto⁽⁸³⁾, la I/R puede amplificar la respuesta inmune humoral, incrementando el rechazo mediado por anticuerpos. Además, esta presentación de anticuerpos por parte de las células dendríticas a las células T también puede potenciar la inmunogenicidad del injerto conduciendo a un rechazo mediado por células T^(77;84).

De lo expuesto, se entiende que la I/R influya en las complicaciones tempranas más frecuentes tras el trasplante renal de donante cadáver y que sea la responsable de la NTA y la consecuente FRI y del RA. En cuanto a la disfunción crónica, el desarrollo de AT/FI se asocia con la I/R⁽⁸⁵⁾, sin embargo, no está claro si en un trasplante, la severidad de la lesión crónica se debe a la severidad de la I/R⁽⁸⁶⁾.

2. DIAGNÓSTICO DEL DAÑO RENAL

2.1 DETERMINACIONES HABITUALES EN CLÍNICA

2.1.1 Medida de la filtración glomerular

La filtración glomerular se puede medir directamente calculando el aclaramiento de la inulina (sustancia exógena) o de la creatinina (Cr) (aminoácido derivado del metabolismo de la creatina de la musculatura esquelética y de la captación de carne en la dieta), pues ambas sustancias se filtran fácilmente y no se reabsorben ni secretan por el túbulo en gran medida. Actualmente se recomienda, con limitaciones, el uso de determinadas ecuaciones para valorar la filtración glomerular. Estas ecuaciones toman

como base los valores de la Crs, pero los corrigen con ciertos datos antropométricos de los pacientes, como la edad, el sexo y el peso. Las ecuaciones más utilizadas son la Ecuación de la Modificación de la Dieta en la Enfermedad Renal o MDRD por sus siglas en inglés⁽⁸⁷⁾, de Cockcroft-Gault en los adultos y la Schwartz en los niños⁽⁸⁸⁾. Otra ecuación más reciente es la CKD-EPI (del inglés Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) que utiliza las mismas variables que MDRD pero es más precisa⁽⁸⁹⁾. De forma similar a la Cr, se han desarrollado diversas ecuaciones para estimar el FG utilizando la cistatina C (CyC). La ventaja de estas ecuaciones es que la única variable es la CyC, sin precisar datos antropométricos. La más precisa es la ecuación de Le Bricon, diseñada en trasplantados renales, aunque la ecuación CKD-EPI que incluye CyC también se ha analizado en trasplantados renales (presentando menos sesgo y más precisión respecto del FG medido por aclaramiento de inulina) y en la población en general (manifestando mejor predicción del curso clínico que la ecuación derivada de la Cr)⁽⁹⁰⁾.

El diagnóstico del AKI basado en el incremento de la Crs tiene sus limitaciones. En primer lugar se trata de un marcador que varía con la masa muscular, edad, sexo, tratamiento farmacológico y estado de hidratación⁽⁹¹⁾. En segundo lugar, para que se produzca un incremento de la Crs, es necesario que al menos el 60-70% del FG se haya perdido tras el AKI^(92;93). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la función perdida por las nefronas dañadas es compensada por una hiperfiltración glomerular por las restantes nefronas funcionantes⁽⁹⁴⁾. Este mecanismo funciona hasta que la compensación de las nefronas no es suficiente para hacer frente a toda la función perdida. En este punto la Crs no ha incrementado de manera paralela, ya que cuando el FG empieza a descender y menos Cr se aclara por el glomérulo, la secreción tubular de Cr aumenta, resultando en un incremento de la excreción de Crs por lo que se compensa en parte la pérdida de FG^(95;96). Durante este periodo, el AKI no se detecta por la Crs a pesar del daño sustancial sufrido, ya que se encuentra en la denominada “ventana ciega de Cr”⁽⁹⁷⁾. Sólo una vez que la capacidad de secreción se satura junto con la disminución del FG, se traduce en una elevación de Crs. Por lo tanto, su limitación más importante es que no representa cambios en tiempo real en el FG ante reducciones agudas de la función renal y el tiempo que se requiere para la acumulación de la Crs antes de que se detecte como anormal, conduce a un retraso potencial en el diagnóstico del AKI⁽⁹⁸⁾. En cuanto a la CyC, se produce de forma estable en las células nucleadas, se

filtra de forma libre por el glomérulo y se reabsorbe y degrada de forma completa por las células del túbulo proximal, por lo que sus niveles séricos reflejan casi exclusivamente la función renal y a diferencia de la Crs no depende de la edad, la masa muscular o la raza. Sin embargo, los valores en sangre de la CyC (CyCs) se pueden alterar en algunas situaciones como DM, proteinuria...A pesar de esto, en el trasplante renal se ha visto que por cada 10% de elevación del índice de masa corporal la CyC se eleva un 2.3% y que los valores en sangre en mujeres eran un 9% menores, mientras que la edad, la raza, la proteinuria o el tratamiento inmunosupresor no alteraban sus niveles. Por todo ello, la CyC se asocia mejor con el FG que la Crs y es mejor marcador de enfermedad renal crónica terminal, pero su coste y falta de disponibilidad hace que su uso no esté generalizado⁽⁹⁰⁾.

2.1.2 Estudio de la composición de la orina

En la práctica habitual hay que basarse en la historia del paciente, el examen del mismo, técnicas de ultrasonidos y determinados datos de laboratorio para determinar la existencia de AKI y tratar de elucidar su causa: prerrenal, la mayoría de las veces por hipovolemia; parenquimatosa, que constituiría la NTA con supuesto daño estructural de las células tubulares dado que su diagnóstico morfológico mediante biopsia casi nunca está indicado; glomerular, debido a casos de enfermedades glomerulares de rápida progresión, vasculares por isquemia renal directa; e intersticiales, la mayoría de las veces por nefrotoxicidad y por último la obstrucción de la vía urinaria.

Tradicionalmente se utiliza para el diagnóstico y tratamiento del AKI, determinaciones urinarias de sodio, urea y la presencia de elementos formes o cilindros por microscopía⁽⁹⁹⁾.

La excreción fraccional de sodio (EFNa) fue uno de los primeros parámetros utilizados para diferenciar AKI prerrenal de NTA, basándose en la premisa de que los túbulos intactos reabsorben el sodio en AKI prerrenal, con lo que su valor estaría bajo, mientras que los túbulos lesionados en la NTA no realizan tal reabsorción y la EFNa sería elevada^(100;101). La excreción fraccional de urea se basa en la misma premisa que la EFNa, excepto que la reabsorción de urea está menos afectada por los diuréticos del asa y tiazídicos, los cuales actúan distalmente al túbulo proximal (el lugar de mayor

reabsorción de urea). Una excreción fraccional de urea <35% refleja AKI prerrenal, mientras que valores por encima del 50% reflejan NTA^(102;103).

El problema que presentan parámetros en la orina como el sodio y la urea es que poseen un papel limitado, ya que carecen de sensibilidad y especificidad para la caracterización temprana del AKI⁽¹⁰⁴⁾ y de valor pronóstico⁽⁹⁸⁾.

En cuanto a la microscopia de la orina, la visualización de cilindros hemáticos en sedimentos de orina es signo inequívoco de glomerulopatía. Numerosos artículos de revisión postulan que la presencia de células epiteliales tubulares renales y cilindros granulares en orina evidencia NTA, mientras que la presencia de sedimentos sin anomalías y cilindros hialinos son consistentes con AKI prerrenal. La razón es que un insulto isquémico o nefrotóxico causa lesión tubular con la resultante apoptosis o necrosis de las células epiteliales tubulares. Estas células pasan a la luz tubular desde donde son excretadas y pueden examinarse en el sedimento fresco de orina.

Un importante concepto es que tanto AKI prerrenal como NTA pueden coexistir. Como tal, es de esperar que el sedimento de orina tuviera más células con NTA severa en comparación con un AKI prerrenal con lesión tubular mínima, por lo que parecería lógico evaluar los resultados de orina cuantitativamente, pero esta práctica es relativamente limitada⁽⁹⁹⁾. En este sentido, Marcussen et al⁽¹⁰⁵⁾ llevaron a cabo un estudio con 51 pacientes con AKI adquirido en hospital, los cuales tenían AKI prerrenal y NTA en el que encontraron que el número de células urinarias y cilindros granulares tenían una correlación positiva con la magnitud del incremento en la Crs.

Por otra parte, la lesión renal también puede ser detectada mediante la evaluación de proteínas presentes en la orina. La excreción urinaria de proteínas se describe en varios estudios de AKI⁽¹⁰⁶⁻¹¹⁰⁾ y es frecuentemente detectada en enfermos críticos⁽¹¹¹⁾. La excreción urinaria de proteínas de elevado peso molecular, como la albúmina, sugiere la existencia de lesiones glomerulares, mientras que la excreción de proteínas de bajo peso molecular, como la β 2-microglobulina debe hacer sospechar una lesión del túbulo proximal. La detección temprana de microalbuminuria, sugiere un incremento de la permeabilidad capilar a proteínas⁽¹¹²⁾, lo que puede tener valor predictivo y pronóstico de la enfermedad y de la mortalidad. Sin embargo, ningún estudio ha evaluado el valor de la microalbuminuria como predictor o como diagnóstico temprano de AKI⁽⁹⁸⁾.

2.2 PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL AKI

2.2.1 Nuevos conceptos en el AKI

Una situación de daño renal que puede conllevar mínimas lesiones tubulares puede no acompañarse de signos detectables de disfunción renal⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. La situación precedente a la lesión renal sería un AKI subclínico, refiriéndose así a las alteraciones estructurales y funcionales sin resultar en un incremento de la Crs^(113;114), a pesar de lo cual, la Crs sigue siendo el parámetro estándar para el diagnóstico del AKI en la clínica. El hecho de que el parámetro de la Crs sea un marcador tardío de daño renal en el AKI y que salvo contadas excepciones no está indicada la biopsia renal, ha hecho necesario la búsqueda de marcadores precoces, más sensibles y con características diagnósticas más específicas. Así, en la última década se han multiplicado los estudios encaminados a la búsqueda y análisis en la práctica clínica de nuevos marcadores para predecir de manera más precoz el AKI, así como tratar de dilucidar su etiología y su valor pronóstico⁽¹¹⁶⁾.

La mejora del diagnóstico del AKI y por lo tanto su prevención a corto y largo plazo requiere un correcto y específico diagnóstico etiológico y fisiopatológico para proporcionar el tratamiento adecuado al paciente y con una capacidad diagnóstica de predisposición de sufrir AKI antes de que suceda el episodio. Por eso, el AKI debe considerarse desde el mismo momento en que se dan circunstancias para el daño renal y el diagnóstico funcional debe basarse no sólo en un marcador como la Cr, sino en una batería de marcadores que informen de diferentes circunstancias y eventos fisiopatológicos que potencialmente tengan lugar durante todo el episodio de AKI⁽⁹⁷⁾. Sin embargo, aunque existe mucha literatura sobre la aplicación clínica de biomarcadores, lo cierto es que se da información limitada sobre su uso práctico por parte de los facultativos para la gestión de pacientes con AKI.

El incremento de la Crs o una reducción en la producción de orina son en la actualidad los primeros signos de reconocimiento del AKI. Los biomarcadores que aparecerían más precozmente, no se han llegado a aplicar en la clínica de una manera generalizada y reglada. Esta falta de utilización refleja la ausencia de unas recomendaciones clínicas específicas para aplicar estos biomarcadores emergentes a la optimización del manejo del paciente, ya que para el uso clínico de un biomarcador, los

facultativos deben tener la certeza de cuándo los biomarcadores son necesarios, cuál utilizar y cómo interpretar los datos y utilizar la información para mejorar el tratamiento⁽¹¹⁷⁾ (Fig 16).

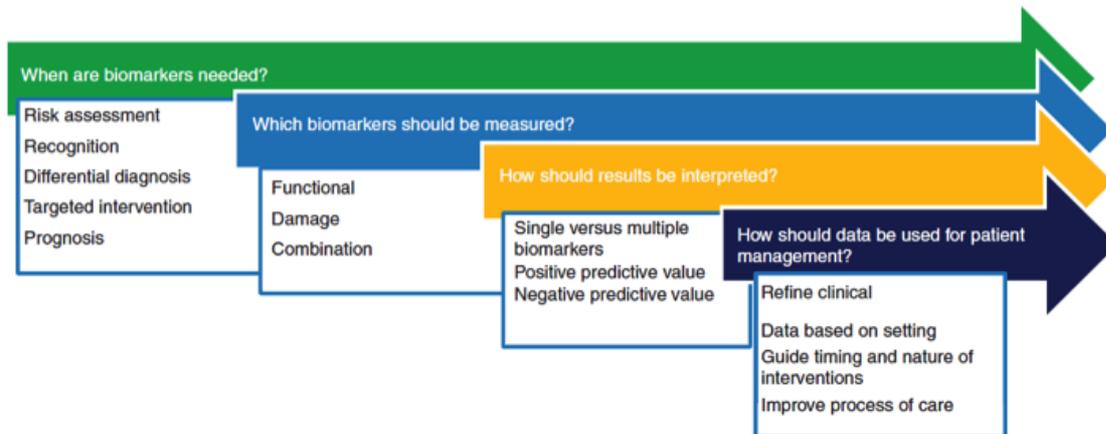


Fig 16. Necesidades clínicas de biomarcadores para mejorar la gestión del AKI. Reproducido de Murray et al, 2014⁽¹¹⁷⁾.

El término biomarcador incluye cualquier sustancia endógena que es objetivamente medida y evaluada como indicador de procesos biológicos, procesos patológicos o respuestas farmacológicas para una intervención terapéutica⁽¹¹⁸⁾. En el campo de los biomarcadores de AKI se han identificado diferentes moléculas surgiendo desde la lesión renal y reflejándose ante una función renal alterada⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾. Estas moléculas van desde proteínas constitutivas que resultan de la lesión renal a moléculas producidas en respuesta a daño o productos tisulares de procedencia no renal que son filtrados, reabsorbidos o secretados por el riñón⁽¹²²⁾ (Fig 17).

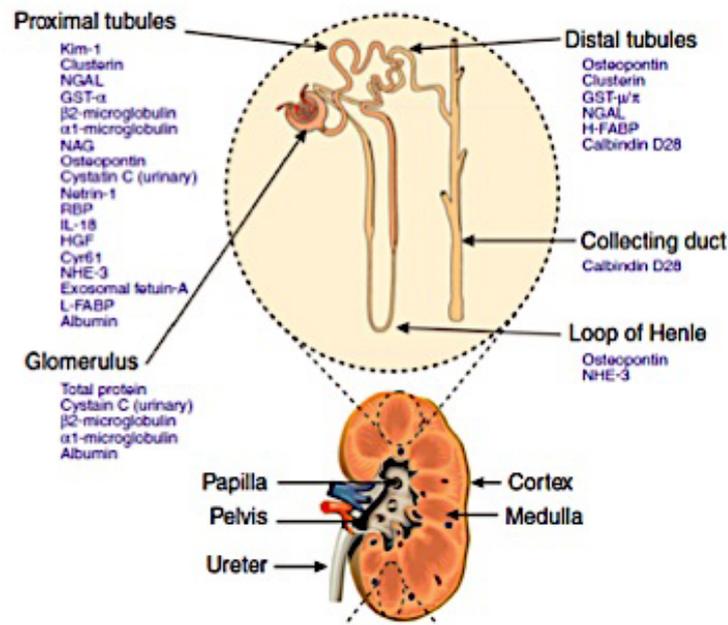


Fig 17. Lugar de expresión de los diferentes marcadores en el nefrón. Reproducido de Murray et al, 2014⁽¹¹⁷⁾.

Estos biomarcadores de daño renal pueden ser utilizados para delimitar la naturaleza, magnitud y lugar de la lesión basados en su especificidad. Varios estudios han descrito su utilidad predictiva en el diagnóstico precoz del AKI, diferenciación de la naturaleza y severidad de la lesión, proporcionando información pronóstica en el curso y resultados del AKI⁽¹²³⁻¹²⁷⁾. Cambios en los niveles de los marcadores se han relacionado con el estadio del AKI y evaluado en relación a su poder predictivo para la iniciación de diálisis aguda, mortalidad o recuperación de la función renal⁽¹²⁵⁾. Sin embargo, en la mayoría de los estudios no se analizan las pruebas de especificidad de los cambios del biomarcador en relación a la patología renal. La utilización de un biomarcador, también se ve limitada por la identificación del mejor para cada propósito (riesgo, evaluación, diagnóstico, determinación de la causa para el diagnóstico diferencial y pronóstico) y el convencimiento de que los umbrales pueden ser distintos para cada uso⁽¹¹⁷⁾. La utilidad de los biomarcadores para diferenciar el AKI *de novo* del AKI en el seno de una ERC subyacente es un área aun no bien establecida; se ha visto que los niveles de biomarcadores son generalmente más elevados en pacientes con ERC y consecuentemente, los umbrales para identificar elevaciones de marcadores son probablemente distintos⁽¹²⁸⁾.

El grupo para la Iniciativa de Calidad de la Diálisis Aguda (ADQI), dirigió estos asuntos asignando grupos focalizados en cuatro amplias áreas para la utilización de biomarcadores en la gestión del AKI: 1) riesgo estimado, diagnóstico y estadio; 2) diagnóstico diferencial; 3) valoración pronóstica y 4) nuevas técnicas incluyendo imagen.

El conocimiento actual de la fisiopatología del AKI humano se basa ampliamente en las nociones aportadas a través de modelos experimentales extrapolados al área clínica y cuando surgen los biomarcadores, es complicado definir el mecanismo fisiopatológico correspondiente al AKI clínico. En este sentido Murray et al⁽¹¹⁷⁾ proponen que los biomarcadores pueden ser clasificados como aquellos que representan cambios en la función renal, y aquellos que reflejan lesión renal. Esta clasificación permite la utilización simultánea de biomarcadores de cada categoría para delimitar el espectro del AKI. Como se muestra en la figura 18, en cualquier momento los pacientes pueden incluirse en uno de los cuatro cuadrantes basándose en los cambios representativos de acuerdo a marcadores de función y lesión. Además, evaluaciones secuenciales de estos marcadores de función y lesión podrían permitir el seguimiento del curso del AKI y proporcionar información de los eventos y mecanismos potenciales involucrados, basándose en la especificidad del marcador usado para identificar el lugar, la naturaleza y magnitud de la lesión.

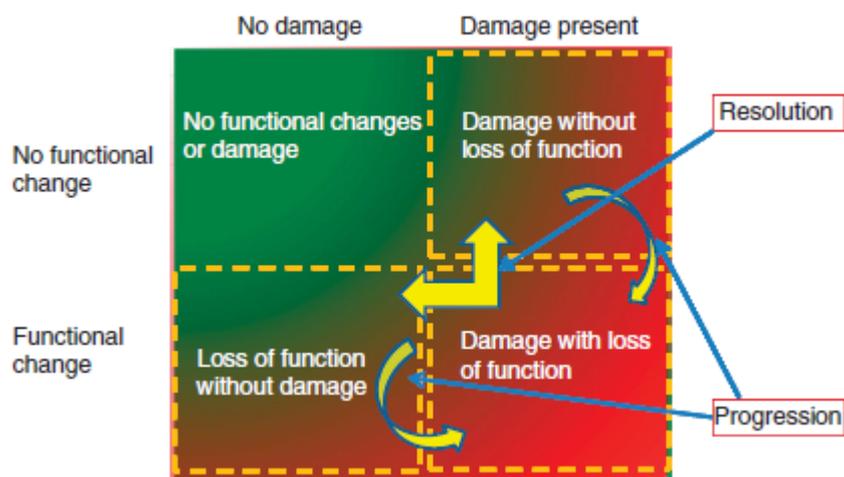


Fig 18. Nuevo concepto de daño/reparación. Reproducido de <http://www.ADQI.org>⁽¹¹⁷⁾.

Una combinación simultánea de marcadores de función y lesión renal proporcionaría un fácil método para estratificar pacientes con AKI. En un principio los

pacientes se clasificarían en uno de los cuatro grupos y en la evaluación en el tiempo se podrían ver sus transiciones a través de las categorías. Este esquema proporcionaría una aproximación para evaluar los pacientes con AKI en relación con su diagnóstico y estadio, diagnóstico diferencial y pronóstico.

Por lo tanto, el uso combinado de biomarcadores funcionales y de lesión proporciona una potente herramienta que permite a clínicos e investigadores la utilización más efectiva de marcadores en el AKI.

En el caso del trasplante renal, las oscilaciones de la Crs y el hecho de partir de Crs anómalas en el receptor, hace que la interpretación de los cambios en la Crs sea más compleja, por lo que, la biopsia del injerto sigue siendo el estándar para el diagnóstico de la causa de la disfunción renal. No obstante, la biopsia del injerto supone un procedimiento invasivo con una potencial morbimortalidad⁽¹²⁹⁾, por lo que existe gran interés en identificar nuevos marcadores precoces de diagnóstico con técnicas no invasivas para evidenciar la disfunción en el trasplante y con una precisión que permita diferenciar sus causas. Reflejo de este interés es el cúmulo de estudios que tratan de relacionar a los biomarcadores de AKI con el pronóstico inicial y a medio y largo plazo así como con el diagnóstico de RA⁽¹³⁰⁾.

2.2.2 Una nueva generación de marcadores sensibles y tempranos al daño renal agudo

Los procesos fisiopatológicos característicos del AKI comprenden tanto mecanismos relacionados con el daño como con la respuesta reparadora del organismo. Como ya se ha apuntado en el apartado anterior, durante el daño de las estructuras renales, sus componentes o derivados metabólicos, compuestos de degradación o restos de ellos se eliminarían por la orina y podrían ser detectados y utilizados como marcadores de lesión. El contacto directo de los epitelios renales con la orina facilita la aparición en ésta de moléculas y fracciones celulares procedentes de estos tejidos. Los posibles marcadores pueden tener su origen, entre otros, en la síntesis, activación o inhibición de mediadores de los procesos bioquímicos y de constituyentes estructurales celulares relacionados con procesos como la apoptosis y la regeneración tisular. Así mismo, podrían encontrarse en la orina indicios de la destrucción de los tejidos (células,

matriz extracelular, membranas basales, etc.), bien sean moléculas enteras, fracciones de éstas, organelas o restos de ellas y de fracciones celulares o tisulares. La detección en la orina de ciertas enzimas celulares procedentes de la lesión de células renales, es actualmente el procedimiento para la detección temprana del AKI que cursa con daño tubular.

Estas enzimas incluyen la lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FAL) o gamma glutamil traspeptidasa (γ GT) entre otras. La mayor parte de estas enzimas tienen un valor moderado como marcadores urinarios tempranos y sensibles del AKI, debido principalmente a problemas de estabilidad e inhibición por otros componentes de la orina⁽¹³¹⁾.

En la última década se ha identificado, validado y desarrollado una nueva generación de marcadores sensibles y tempranos en orina, capaces de detectar el daño renal agudo en sus fases iniciales. En la tabla 7 se reflejan los biomarcadores habituales hoy en día para el diagnóstico del AKI.

Biomarker	Comments
Fatty acid binding protein (FABP)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Expressed in proximal tubule epithelial cells 2. Current evidence suggests clinical utility as a biomarker in CKD and diabetic nephropathy 3. Additional studies necessary to determine utility in setting of preclinical and clinical AKI
Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Initially identified bound to gelatinase in specific granules of the neutrophils but also may be induced in epithelial cells in the setting of inflammation or malignancy 2. Expression upregulated in kidney proximal tubule cells and urine following ischemic or cisplatin induced renal injury 3. Found to be an early indicator of AKI following cardiopulmonary bypass 4. Specificity for AKI in setting of sepsis; pyuria needs to be further established
Interleukin-18 (IL-18)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cytokine with broad immunomodulatory properties, particularly in setting of ischemic injury 2. Constitutively expressed in distal tubules; strong immunoreactivity in proximal tubules with transplant rejection 3. Elevated urinary levels found to be early marker of AKI and independent predictor of mortality in critically ill patients
Kidney injury molecule-1 (KIM-1)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Type-1 cell membrane glycoprotein upregulated in dedifferentiated proximal tubule epithelial cells 2. Ectodomain is shed and can be quantitated in urine following acute kidney injury in preclinical and clinical studies 3. Elevated urinary levels are highly sensitive and specific for AKI 4. Upregulated following various models of preclinical and clinical AKI, fibrosis, renal cell carcinoma, and polycystic kidney disease

Alanine aminopeptidase (AAP)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proximal tubule brush border enzyme 2. Instability may limit clinical utility
Alkaline phosphatase (AP)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proximal tubule brush border enzyme. Human intestinal alkaline phosphatase is specific for proximal tubular S3 segment; human tissue nonspecific alkaline phosphatase is specific for S1 and S2 segments 2. Levels may not correlate with extent of functional injury 3. Instability may limit clinical utility
α -glutathione-S-transferase (α -GST)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proximal tubule cytosolic enzyme 2. Requires stabilization buffer for specimen storage and processing 3. Upregulated in AKI and renal cell carcinoma
γ -glutamyl transpeptidase (γ GT)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proximal tubule brush border enzyme 2. Instability requires samples to be analyzed quickly after collection, limiting clinical utility
N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proximal tubule lysosomal enzyme 2. More stable than other urinary enzymes 3. Extensive preclinical and clinical data in a variety of conditions (nephrotoxicant exposure, cardiopulmonary bypass, delayed renal allograft function, etc.) 4. Endogenous urea may inhibit activity
β_2 -microglobulin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Light chain of the MHC I molecule expressed on the cell surface of all nucleated cells 2. Monomeric form is filtered by the glomerulus and reabsorbed by the proximal tubule cells 3. Early marker of tubular dysfunction in a variety of conditions 4. Instability in acidic urine limits clinical utility
α_1 -microglobulin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Synthesized by the liver 2. Filtered by the glomerulus and reabsorbed by proximal tubule cells 3. Early marker of tubular dysfunction; high levels may predict poorer outcome 4. Stable across physiologic urinary pH
Retinol-binding protein (RBP)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Synthesized by liver, involved in vitamin A transport 2. Filtered by glomerulus and reabsorbed by proximal tubule cells 3. Early marker of tubular dysfunction 4. Increased stability in acidic urine when compared to β_2-microglobulin
Cystatin C	<ol style="list-style-type: none"> 1. Important extracellular inhibitor of cysteine proteases 2. Filtered by the glomerulus and reabsorbed by proximal tubule cells 3. Elevated urinary levels reflect tubular dysfunction; high levels may predict poorer outcome

Tabla 7. Principales biomarcadores descritos de AKI. Reproducido de Vaidya et al, 2008a⁽¹³¹⁾.

La finalidad de la medida de estos marcadores es el diagnóstico inicial del daño y la evaluación del AKI, así como para distinguir entre los diversos tipos y etiologías del mismo^(122;131-133). Las características principales que el marcador óptimo para detectar AKI debe reunir son entre otras: no invasivo, coste-efectivo, relacionado con eventos fisiopatológicos del AKI, preciso y específico del AKI^(122;134). Además de ser generado por las células dañadas para reconocer el órgano específico, ha de mostrar una concentración proporcional a la extensión del daño, que se exprese precozmente tras el

daño del órgano incluso cuando la lesión aún sea potencialmente reversible, que su concentración disminuya rápidamente tras el episodio de lesión aguda para utilizarlo como herramienta de monitorización terapéutica y que permita una rápida determinación.

A continuación, analizamos los biomarcadores más representativos de AKI usados actualmente:

- Interleukina 18 (IL-18) es una citoquina proinflamatoria que se produce en las células tubulares renales y en los macrófagos. Se conoce que posee un papel activo en numerosos procesos renales como AKI, I/R, RA, infección, condiciones autoinmunes y cáncer⁽⁹¹⁾. Varios marcadores se compararon en una muestra de población heterogénea de alto riesgo para evaluar su poder diagnóstico y predictivo de AKI, necesidad de diálisis y predicción de mortalidad a los 7 días en pacientes estratificados según el tiempo transcurrido tras el insulto renal, FG y tiempo de admisión en UCI⁽¹³⁵⁾. CyC, IL-18 y NGAL resultaron fuertes predictores de diálisis (ABC>0.70) e IL-18 moderadamente predictora de muerte a los 7 días (ABC=0.68).

- La CyC es una proteasa inhibidora, que penetra en el túbulo proximal por filtración glomerular. La proteína se reabsorbe y se metaboliza en células del túbulo proximal sanas y sólo mínimas concentraciones se detectan en orina en condiciones normales. Sus niveles de incrementan cuando la capacidad de reabsorción de las células del túbulo proximal se ve dañada⁽⁹¹⁾. La CyC se ha propuesto como marcador de AKI, ya que es un buen predictor de requerimiento de diálisis en pacientes en UCI con AKI establecido⁽¹¹⁰⁾. Sin embargo, debido a su falta de sensibilidad resulta menos convincente como predictor de AKI no severo⁽¹³⁶⁻¹⁴⁰⁾. En el trasplante, existen escasos estudio que relacionen la CyC urinaria y la evolución del injerto, con resultados poco concluyentes⁽¹⁴¹⁾.

A pesar de los resultados esperanzadores, hoy en día ninguno de los marcadores conocidos reúne todas las características propuestas para marcador óptimo, ya que no son específicos de AKI y en algún caso, no se conoce en profundidad su mecanismo de aparición y por tanto lo que revela su presencia. Muchos de ellos además son marcadores de inflamación o de respuesta inmune aguda, mecanismos que se sabe están involucrados en muchos procesos diferentes al AKI^(91;142).

Un hecho positivo es que se ha descrito la aparición de estos marcadores en orina, correlacionando su incremento en tejido renal y la lesión renal⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾. De manera que es difícil esperar que un único biomarcador contenga todas las características deseables, por lo que parece más lógico pensar que una batería de marcadores seleccionados diagnostique con más precisión que un marcador individual⁽⁹¹⁾.

2.2.3 Diagnóstico de la predisposición adquirida al Fracaso Renal Agudo

A pesar de los avances que pueden proporcionar los nuevos marcadores precoces de daño renal agudo antes descritos, todavía quedan facetas por explorar que permitirán mejorar sustancialmente el diagnóstico de esta enfermedad y que, como se comenta más adelante, pueden abrir nuevas vías para la medicina preventiva y la medicina personalizada.

Un factor determinante para un manejo clínico exitoso del AKI es la detección temprana, lo cual mejoraría significativamente la intervención terapéutica y los resultados^(131;146). Consecuentemente, una nueva generación de marcadores, la mayoría de ellos en orina, están en desarrollo asociados a los eventos fisiopatológicos tempranos subyacentes al AKI incipiente⁽¹³¹⁾. Además, en la práctica clínica es necesaria una mejora en el diagnóstico que permita poder identificar una causa específica entre varios insultos potencialmente nefrotóxicos durante la administración de múltiples fármacos. Por ello, podrían considerarse de riesgo tanto la exposición crónica a agentes como aquellos tratamientos que incluyen varios fármacos por sí mismos potencialmente nefrotóxicos. Por ejemplo, un 0.6-2.3% de los pacientes sometidos a una radiografía de contraste, sin historia previa de enfermedad renal, desarrollan algún grado de AKI⁽¹⁴⁷⁾. Algunos de estos pacientes podrían cursar silenciosamente con un incremento del riesgo al AKI debido a un tratamiento previo con un nefrotóxico sin ninguna evidencia clínica, ni síntomas de lesiones renales, donde el FG y los niveles urinarios de marcadores sensibles al daño renal se mantienen en los valores normales. Así, estos pacientes tendrían un riesgo teórico incrementado, pero difícil de evaluar individualmente. Por este motivo, la identificación de marcadores o sistemas de diagnóstico que sean capaces de determinar la predisposición al AKI adquirido mediante tratamientos farmacológicos o agentes potencialmente nefrotóxicos podrían ser de gran utilidad para identificar los

pacientes de riesgo y estratificar su condición de una manera personalizada, antes de someterlos a nuevas intervenciones, procesos o tratamientos que puedan desencadenar el daño.

En este sentido, estudios de nuestro laboratorio han evidenciado que ratas que han sido tratadas con un régimen subtóxico, aparentemente inocuo, de un nefrotóxico, cuando son expuestas posteriormente a otro agente nefrotóxico (a dosis subnefrotóxicas también) desarrollan un claro y evidente AKI. Sin embargo, las ratas que no han estado en tratamiento con dicho agente (sino solamente el vehículo como control), tras ser expuestas al segundo agente nefrotóxico no sufren ninguna alteración de la función renal⁽¹⁴⁸⁻¹⁵⁰⁾. Por lo que, se demuestra que la primera exposición predispone a sufrir un AKI y la segunda desencadena el daño.

Otro de los factores de riesgo es la exposición crónica a sustancias medioambientales, como puede ser el caso de los metales pesados, cuando un individuo en esa circunstancia está sometido a un tratamiento potencialmente nefrotóxico. La sensibilización adquirida al AKI representa un riesgo silente imposible de diagnosticar de forma preventiva con la tecnología disponible a nivel clínico. De manera que un insulto subnefrotóxico y crónico en los riñones puede dar lugar a una sensibilización crónica adquirida a AKI y esta sensibilización crónica podría ser detectada mediante marcadores urinarios específicos. Con este fin, en otro modelo experimental de exposición crónica⁽¹⁴⁹⁾ las ratas fueron tratadas con una dosis subtóxica de un nefrotóxico experimental (nitrato de uranilo) y posteriormente con una dosis subtóxica de gentamicina. La función renal y los daños del tejido renal fueron evaluados, observándose un evidente daño renal (histológico y funcional) en el grupo que habían recibido la exposición crónica al nitrato de uranilo y la gentamicina. Tres proteínas: albúmina, hemopexina y VDBP fueron identificadas en la orina y asociadas con la aparición de predisposición crónica.

Albúmina⁽¹⁵¹⁾, hemopexina⁽¹⁵²⁾ y VDBP⁽¹⁵²⁾ son proteínas séricas cuyo incremento en la excreción urinaria se ha documentado ampliamente en las enfermedades renales que cursan con alteraciones en la barrera de filtración glomerular. Su incremento en orina, además de indicar un posible estado de nefropatía incipiente (en ausencia de marcadores de disfunción renal o lesión), podría alertar a los facultativos de un mayor riesgo de nefropatía aguda. De manera

que estas proteínas podrían ser utilizadas potencialmente como marcadores de una predisposición oculta por exposición crónica, para estratificar adecuadamente y de manera preventiva a los individuos en función de su riesgo específico a largo plazo, y para optimizar convenientemente los procedimientos clínicos o tratamientos que podrían desencadenar la enfermedad. Esto podría reducir la incidencia del AKI, la gravedad y los costes asociados.

FAA es una enzima celular que se requiere en el metabolismo de la tirosina, cuyo incremento en sangre se ha relacionado con nefrotoxicidad tubular inducida por d-serina⁽¹⁵³⁾. En relación con la predisposición, el estudio realizado por Vicente et al.⁽¹⁵⁰⁾ pone de manifiesto que la excreción urinaria de FAA parece correlacionarse con el grado de predisposición inducida por cisplatino a dosis subnefrotóxicas. De hecho, el nivel de FAA en la orina predijo el grado de disfunción renal cuando se desencadenó AKI por la administración de un segundo nefrotóxico (gentamicina).

La posibilidad de que los marcadores antes mencionados pudieran identificar a los pacientes especialmente susceptibles permitiría estratificar a los pacientes de acuerdo con su riesgo renal individual. Por ejemplo, una IRC preexistente, deshidratación, tratamientos concomitantes con fármacos potencialmente nefrotóxicos y condiciones que comprometan el flujo renal, son factores de riesgo para sufrir un AKI. Estos factores son clínicamente relevantes porque plantean variables interindividuales indeterminadas y riesgos ocultos. Sin embargo, la caracterización de los mismos como herramienta específica para identificar y estratificar el riesgo combinado individual planteado por cada factor en cada paciente, se escapa del repertorio diagnóstico actual. Así por ejemplo, la diabetes se establece como factor de riesgo en la nefropatía por contraste^(154;155), una de las formas más prevalentes de AKI por tóxicos en el ámbito hospitalario⁽¹⁵⁶⁾. En ausencia de un biomarcador cualitativo que determine el riesgo renal que supone la presencia de DM, todo diabético es considerado igualmente sensibilizado a la nefropatía por contraste y consecuentemente, candidato para un procedimiento alternativo de segunda elección. Un biomarcador que cuantificara el riesgo permitiría al especialista estratificar a los pacientes diabéticos de acuerdo al riesgo renal individual, derivando a un procedimiento alternativo sólo a aquellos con riesgo real.

La aplicación de estos conceptos en el contexto del trasplante renal es clara: los donantes pueden haber estado expuestos a algún agente nefrotóxico (fármacos, contrastes, tóxicos ambientales) que haya sensibilizado o predispuesto sus riñones al AKI, sin que exista ningún signo clínico que lo haga sospechar. Tras el trasplante, el riñón sufre un proceso de I/R y los pacientes son tratados con fármacos inmunosupresores (tacrólimus y CsA, reconocidos nefrotóxicos, son los fármacos más utilizados en las pautas de inmunosupresión). En estas circunstancias, los pacientes trasplantados, cuyo riñón está sensibilizado, pueden sufrir un AKI, incluso aunque el inmunosupresor se administre a dosis subtóxicas. Por tanto, es necesario conocer a priori la calidad del órgano que se trasplanta para: 1) ayudar en la evaluación del injerto y 2) en caso de que se decida trasplantar, hacer el seguimiento y el manejo oportuno del paciente.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestro grupo de investigación ha demostrado en modelos experimentales que diferentes fármacos y tóxicos renales, incluso en dosis subtóxicas, son capaces de inducir una predisposición, o sensibilización, a sufrir AKI. La relevancia de esta situación es que los individuos aparentemente no afectados por los efectos adversos de un tratamiento, podrían estar, sin saberlo y por lo tanto sin poder hacer nada para prevenirlo, expuestos a desarrollar AKI en situaciones, o ante circunstancias (otros tratamientos, contrastes radiológicos, tóxicos medioambientales, etc) que no producen ningún daño en los individuos no predispuestos. Asociados a esta condición hemos identificado marcadores que permiten detectar esta hipersensibilidad adquirida y que podrían ser una herramienta para estratificar a los pacientes o a los órganos de forma preventiva y personalizada, de acuerdo con el riesgo individual que van adquiriendo.

En este contexto, los donantes de riñón pueden haber estado expuestos a algún agente nefrotóxico que haya predispuesto a sus riñones a sufrir AKI, sin que existan signos clínicos que lo detecten. Esta circunstancia pudiera ser puesta en evidencia mediante estos marcadores de predisposición.

Por su parte, los riñones procedentes de donantes están expuestos durante su extracción y posterior implante en el receptor a un proceso de I/R y al tratamiento con inmunosupresores, los cuales son potencialmente nefrotóxicos. Estos procesos, inherentes al trasplante, pudieran desencadenar AKI en pacientes que reciban un riñón previamente predispuesto.

OBJETIVO 1

Estudiar y caracterizar en un modelo experimental, la capacidad de la CsA, administrada a dosis subtóxicas, de desencadenar AKI en ratas previamente predisuestas.

OBJETIVO 2

Estudiar en donantes de riñón (vivo o cadáver), desde el momento previo al trasplante y posteriormente en el receptor, en los días 1 y 3 postrasplante, la relación de marcadores de daño renal temprano y de predisposición (previamente identificados en modelos preclínicos), con la presencia de disfunción inmediata del injerto y con la evolución al año del trasplante.

Este estudio se llevó a cabo en la *Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca* y en el *Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV)*, Santander.

1. FASE PRECLÍNICA

1.1 MODELO EXPERIMENTAL

En este trabajo se utilizaron 16 ratas Wistar macho de unos 200g de peso aproximadamente, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Tanto el material como los métodos experimentales empleados con los animales de laboratorio se rigieron de acuerdo a las recomendaciones recogidas en el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación⁽¹⁵⁷⁾.

Los animales se mantuvieron en el animalario en condiciones ambientales constantes: temperatura de 20 °C, humedad del 60% aproximadamente, tiempo diario de luz (fotoperiodo) de 12h y sistemas de renovación y filtración de aire y olores.

Se planteó un modelo de predisposición ya establecido en la *Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca*⁽¹⁴⁸⁾. El modelo utiliza como nefrotóxico la gentamicina en un régimen que no desencadena ninguna alteración, ni de la función, ni de la estructura renal (50 mg/Kg durante 6 días), sin embargo es capaz de predisponer o hacer más sensibles a los animales de experimentación al AKI, que se manifiesta cuando se administra un segundo nefrotóxico a dosis subtóxicas también. Concretamente se ha demostrado con ioexol, cisplatino y nitrato de uranilo⁽¹⁴⁹⁾.

En nuestro estudio se utiliza el modelo antes descrito para comprobar si la CsA, un anticalcineurínico con conocidas propiedades nefrotóxicas, podría desencadenar AKI cuando se administra a dosis subtóxicas. El interés de utilizar CsA como agente desencadenante de un daño renal oculto pudiera tener gran importancia en el contexto del trasplante.

Para ello se diseñaron 4 grupos (Fig 19):

Grupo control (C): no se administró ningún fármaco durante el periodo experimental.

Grupo Gentamicina (G): se administró durante la primera semana (días 1-6) una dosis de 50 mg/kg/día de G por vía intraperitoneal.

Grupo Ciclosporina (CsA): se administró durante la segunda semana (días 7-15) una dosis de 15 mg/kg/día de CsA por vía subcutánea.

Grupo Gentamicina+Ciclosporina (G+CsA): se administró durante los días 1-6 de experimento una dosis de 50 mg/kg/día de G por vía intraperitoneal, y durante los días 7-15 una dosis de 15 mg/kg/día de CsA por vía subcutánea.

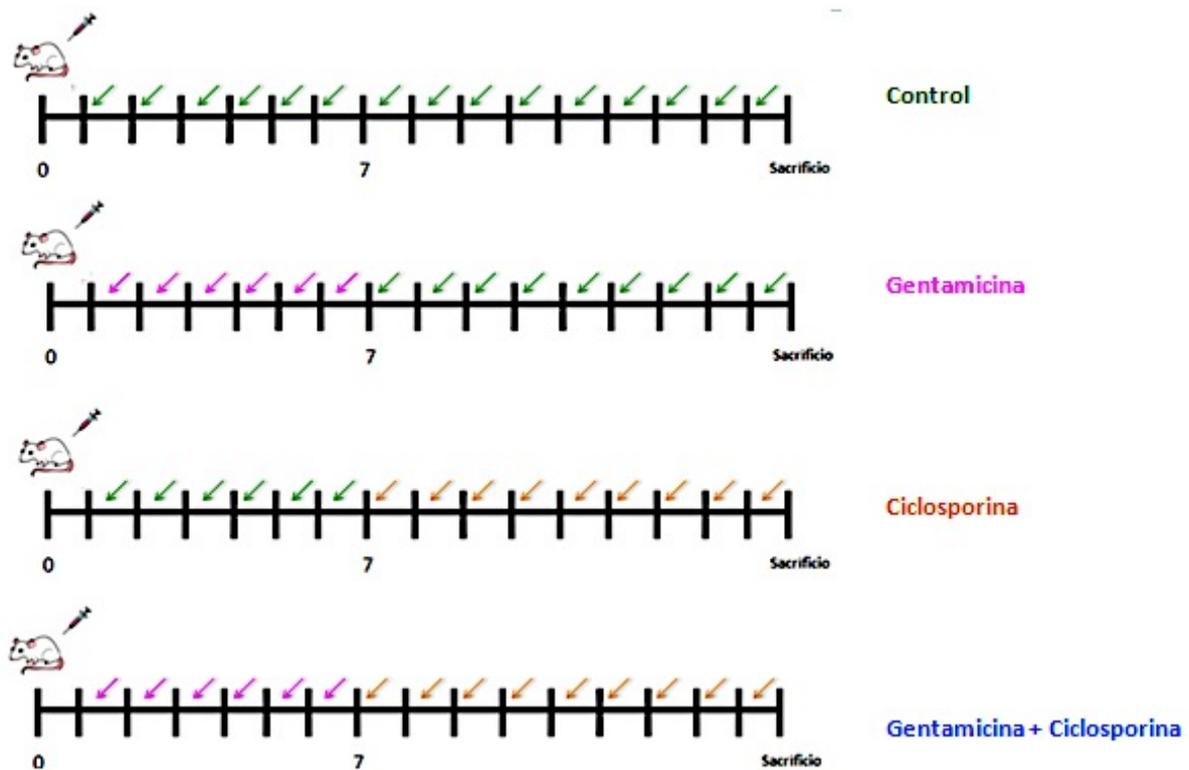


Fig 19. Diseño experimental

1.2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Como se detalla en el modelo experimental descrito, a los animales se les administró gentamicina, un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos con efectos nefrotóxicos ampliamente descritos y CsA, un agente inmunosupresor utilizado en el trasplante renal perteneciente al grupo de inhibidores de la calcineurina y con toxicidad asociada y conocida.

Gentamicina: La gentamicina (Sigma, St Louis, USA) se disolvió en NaCl al 0.9% a la concentración de 50 mg/mL. El volumen inyectado a los animales (grupos G y G+CsA) fue de 1 mL/Kg. A los animales de los grupos C y CsA se les inyectó el mismo volumen de solución salina al 0.9%.

Ciclosporina: Para realizar el tratamiento con CsA en los grupos experimentales CsA y G+CsA, se utilizó la especialidad farmacéutica Sandimmun® 250 mg/5mL, concentrado para solución de perfusión. La composición de dicha especialidad es la siguiente: CsA 50 mg/mL, etanol 33.18%, aceite de ricino polietoxilado. Se preparó una dilución 1:2 de Sandimmun® en solución salina 0.9% (16.7 mg/mL de CsA), la cual fue administrada a los animales. El volumen de esta solución inyectado a los animales fue de 0.9 mL/Kg. La dilución de CsA se preparó diariamente, debido a su baja estabilidad en forma diluída (24 h a 4°C).

También se preparó una solución que simulaba el vehículo de la CsA, con la misma concentración de etanol que la dilución 1:2 de Sandimmun® (11.1% de etanol en solución salina al 0.9%). De igual modo, se inyectó a los animales de los grupos C y G, 0.9 mL de esta solución por Kg de peso corporal.

1.3 RECOGIDA DE MUESTRAS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se recogieron muestras de sangre y orina los días 0 (basal), 7 (después del tratamiento con gentamicina) y a partir de aquí de manera diaria hasta el día 16 del experimento.

Muestras de orina

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales⁽¹⁵⁸⁾, en las cuales tenían libre acceso a la comida y a la bebida. Tras un día de acostumbramiento a su nuevo entorno, se recogió la orina durante 24h (muestras de orina basal), libre de comida y heces, en probetas graduadas que contenían 1mL de aceite mineral, para evitar la evaporación y 100µL de azida sódica (0.1%) para minimizar la contaminación bacteriana.

Se volvió a introducir a las ratas en jaulas metabólicas el día previo a la primera administración de CsA (día 6) y se mantuvo a los animales en estas jaulas hasta el fin del experimento para la recolección de las muestras de orina a distintos tiempos, además de controlar otros parámetros, como la ingesta de agua y comida.

La orina obtenida se centrifugó durante 8min a 800g, para separar bien la fase oleosa (el aceite mineral). Se extrajo la orina limpia para su análisis posterior.

Muestras de sangre

Se recogieron muestras de sangre de la punta de la cola en capilares heparinizados de 75µL. Para facilitar la extracción, se produjo vasodilatación mediante la aplicación previa de calor. Se extrajeron dos capilares de sangre por rata, y tras sellar uno de los extremos con plastilina, se introdujeron en el frigorífico con el fin de que ésta se endureciera y de esta manera poder centrifugar las muestras en microcentrífuga a 11600g durante 3 min. Una vez centrifugada la sangre se partieron los capilares por el límite células-plasma. Se extrajo el plasma, y se guardó para su posterior análisis.

Al final de experimento (día 16), los animales se sacrificaron y se extrajeron los riñones para estudios post mortem. Para ello, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a la dosis de 50mg/Kg de peso. Para acceder a la cavidad abdominal, se practicó una laparotomía media y se separó la masa intestinal para proceder a canular la aorta, en la bifurcación ilíaca. A través de la cánula, se recogieron unos 2mL de sangre, y a continuación se perfundieron 5-10mL de solución salina heparinizada (1mL/L). Después, los riñones se desencapsularon, se extrajeron, se pesaron y se seccionaron sagitalmente en dos mitades. Un riñón y la mitad del otro se

congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C . La otra mitad se introdujo en formaldehído al 3.7% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol, para estudios de histología.

2. FASE CLÍNICA

2.1 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo observacional, en pacientes incluidos en el programa de trasplante renal y que fueron sometidos a un trasplante renal y seguidos durante un año en el *Servicio de Nefrología del HUMV* de Santander.

Para la realización del estudio se diseñó un protocolo normalizado que fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria. Este estudio se ha realizado de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki. Los datos obtenidos en el presente estudio se archivaron en una base de datos diseñada “ad hoc” y se analizaron informáticamente, siguiendo las regulaciones españolas sobre el manejo de datos computarizados (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal⁽¹⁵⁹⁾ y el Real Decreto 1720/2007 de 21 de diciembre⁽¹⁶⁰⁾). La base de datos se anonimizó asignando a cada individuo del estudio un código numérico, que es el que se transfirió a la base de datos de soporte informático. No se transcribió ningún dato personal, por lo que no se puede identificar a los pacientes salvo con la lista maestra del investigador responsable de la fase clínica.

2.1.1 Sujetos de estudio

Se incluyeron todos los pacientes consecutivos que cumplieron los criterios de inclusión, dieron su consentimiento y a los que se les realizó trasplante renal durante el período comprendido entre el 26 de mayo del 2013 al 1 de septiembre del 2014, así como a sus correspondientes donantes (vivo o cadáver) tras el consentimiento del donante vivo o de los familiares o representante legal del donante cadáver, cuyo/s riñón/riñones fueron trasplantados en el HUMV. El seguimiento de los pacientes trasplantados fue de un año, hasta el 1 septiembre de 2015. Todo el procedimiento se realizó de acuerdo a las guías de práctica clínica de la ERA (European Renal Association⁽¹⁶¹⁾). La información recogida de cada individuo incluye: antecedentes

personales, comorbidades, causa de muerte en el caso de los donantes cadáver, características antropométricas, medicación inmunosupresora habitual, parámetros bioquímicos estándares del protocolo de trasplante del Servicio de Nefrología, CyCs, biopsias realizadas y los datos de la evolución de la función del injerto caracterizados como FII, FLI y FRI⁽⁵⁸⁾, RA, NTA y toxicidad por anticalcineurínicos (ACN) confirmadas por biopsia del injerto (Tabla 8).

DATOS OBTENIDOS DE LOS SUJETOS	
Características antropométricas	
	Edad
	Sexo
	Raza
Características clínicas	
	Etiología de la enfermedad renal**
	Comorbidades (DM/HTA)
	Causa de muerte*
	Tiempo el lista de espera**
	Tiempo en diálisis**
	Número de trasplantes previos**
Características del trasplante	
	Incompatibilidades HLA
	Tiempo de isquemia fría
Determinaciones bioquímicas	
	Crs
	CyCs
	Albúmina
	Proteínas
	MDRD/CKD-EPI
	Histología del injerto
	Niveles de fármacos
Evolución del injerto**	
	FII/FLI/FRI
	RA/NTA/Toxicidad ACN

*Tabla 8. Datos recogidos de los sujetos para la elaboración de la base de datos. *Datos exclusivos de donantes, **datos exclusivos de receptores.*

Además se analizaron los datos de biomarcadores de predisposición y de daño renal temprano obtenidos de las muestras de orina procedentes de los sujetos. El estudio no influyó de ninguna manera en el procedimiento clínico y terapéutico a seguir en relación con el paciente trasplantado.

Criterios de inclusión

1.- Todos los sujetos que reunían los requisitos para la condición de donante de riñón (vivo o cadáver).

2.- Pacientes con IRCT en lista de espera de trasplante renal del Servicio de Nefrología del HUMV, a los que se les realizó la cirugía del trasplante renal.

Criterios de exclusión

Se consideraron excluidos del estudio los pacientes que recibieron trasplante combinado (más de un órgano en el mismo acto quirúrgico) en el estudio, por suponer que presentarían factores específicos que pudieran influir en la evolución posterior.

Retirada de los pacientes

Durante el período de estudio, todo participante o responsable legal del individuo incluido en el ensayo, fue libre de abandonarlo de forma voluntaria si así lo decidiera, de lo cual se le informó en el momento de firmar el consentimiento.

2.2 TOMA DE MUESTRAS DE LOS PACIENTES Y EVALUACIÓN CLÍNICA

Antes del trasplante, se recogieron muestras de orina y sangre de los donantes y receptores. En caso de trasplante de vivo, se tomaron las muestras basales antes de la realización del angioTAC con contraste yodado en los donantes y previo al inicio de tacrólimus pretrasplante en los receptores. En caso de trasplante de cadáver, las muestras basales se recogieron de manera previa a la extracción del órgano en el donante y en el momento del ingreso del receptor para realizarle el trasplante. Después del trasplante, se recogieron orina y sangre tanto del receptor y como del donante (en caso de donante vivo) hasta un año tras el trasplante según la pauta que se muestra (Tabla 9).

INDIVIDUO	MOMENTO DE LA TOMA DE MUESTRA	MUESTRA
Donante cadáver	Antes de la extracción del órgano	Visita -1
Donante vivo	Antes del estudio con contraste	Visita -6
	El día del trasplante	Visita 0
	Día 1 post-trasplante	Visita 1
	Día 2 post-trasplante	Visita 2
	Día 3 post-trasplante	Visita 3
	Al alta médica (día 7)	Visita 4
	Al mes del trasplante	Visita 7
	Al medio año	Visita 10
	Al año del trasplante	Visita 12
Receptor de cadáver	Antes del trasplante	Visita -1
Receptor de vivo	Antes de inicio de inmunosupresor	Visita -6
Receptor de vivo/cadáver	Día del trasplante (3h post-trasplante)	Visita 0
	Día 1 post-trasplante	Visita 1
	Día 2 post-trasplante	Visita 2
	Día 3 post-trasplante	Visita 3
	Al alta médica (día 7)	Visita 4
	A los 10 días	Visita 5
	A los 15 días	Visita 6
	Al mes del trasplante	Visita 7
	A los dos meses	Visita 8
	A los tres meses	Visita 9
	Al medio año	Visita 10
	A los nueve meses	Visita 11
	Al año del trasplante	Visita 12

Tabla 9. Descripción de las muestras y tiempos de recogida de las mismas para los diferentes sujetos del estudio.

Se utilizó un volante de recogida de muestras y posteriormente los datos de los sujetos fueron transferidos a un soporte informático.

3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

3.1 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

A continuación se detallan las determinaciones bioquímicas realizadas en las muestras recogidas. Aunque el fundamento de cada determinación sea el mismo, la metodología empleada difiere en el uso clínico y preclínico. Por ello se describen en dos secciones separadas.

3.1.1 Determinaciones en animales de experimentación

3.1.1.1 Determinación de Cr

Fundamento

Esta técnica se basa en el método de Jaffé⁽¹⁶²⁾, que utiliza ácido pícrico como agente generador de un complejo coloreado en presencia de Cr cuya intensidad puede medirse por espectrofotometría a una longitud de onda comprendida entre los 490-530nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de Cr en la muestra.

Procedimiento

Se utilizó un kit Quanti ChromTM de BioAssay Systems, tanto para la determinación de Crs como en orina (Cro).

En ambos casos se elaboró previamente una recta patrón de concentraciones conocidas. En una placa de 96 pocillos, se pipetearon 30µL de la recta patrón preparada y 30µL de cada muestra. Se utilizó el plasma sin diluir para la determinación de Crs y una dilución 1:10 de las muestras de orina con agua destilada para la determinación de Cro.

Se añadió a cada pocillo 200µL del reactivo (mezcla 1:1 de hidróxido sódico y ácido pícrico). Se midió la absorbancia a tiempo 0 y a los 5 minutos a 491nm. Con los datos obtenidos se calculó el incremento de absorbancia entre los tiempos de medida y se generó la recta patrón y las concentraciones de Cr de cada muestra.

3.1.1.2 Determinación del aclaramiento de creatinina (CCr)

Los valores obtenidos de Crs, Cro y el volumen de orina recogido en 24h (flujo urinario), se utilizaron para calcular el CCr mediante la fórmula:

$$CCr = \frac{FU \times Cro}{Crs}$$

Siendo CCr el aclaramiento en creatinina (mL/min); FU el flujo urinario (mL/min); Cro la concentración de creatinina en orina y Crs la concentración de creatinina en plasma (mg/dL).

3.1.1.3 Determinación de la concentración de urea plasmática

Fundamento

Este método se basa en el método de Jung⁽¹⁶³⁾, que utiliza un reactivo cromogénico que forma un complejo coloreado con urea cuya intensidad es medida a 491nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra.

Procedimiento

Se utilizó un kit Quanti ChromTM de Bio Assay Systems. Se elaboró en primer lugar una recta patrón y a continuación se realizó una dilución 1:10 con agua destilada de las muestras.

En una placa de 96 pocillos se añadió 5 μ L de la recta patrón y 5 μ L de las muestras diluidas. A continuación se añadieron 200 μ L de reactivo (mezcla 1:1 o-ftalaldehído y ácido sulfúrico). Se dejó incubar durante 12min y se midió la absorbancia a 491nm.

3.1.1.4 Determinación de la concentración de proteínas en orina

Fundamento

La cantidad de proteína total excretada diariamente en la orina se determina por el método colorímetro de Bradford⁽¹⁶⁴⁾, que se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el azul de Coomassie G-250, dando un color azul intenso con absorción a 595nm.

Procedimiento

Se preparó un estándar con albúmina sérica bovina (BSA) en agua destilada a una concentración de 2mg/L, y a partir de ésta concentración se hicieron diluciones seriadas para realizar una recta patrón.

Se diluyó la orina 1:10 con agua destilada. En una placa de 96 pocillos se añadieron por triplicado 4µL de la muestra en cada pocillo. A continuación se adicionó 196µL del reactivo Bradford (Azul de Coomasie 0.1%, etanol 5%, ácido o-fosfórico 8.5%) en cada pocillo. Tras 10-15 minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 595nm. Con la media de las absorbancias y la recta patrón, se determinó la concentración de proteínas.

La excreción urinaria de proteínas (EUprot) en 24h se calculó a partir de la concentración de proteínas obtenida y el FU, mediante la fórmula:

$$EU_{prot} = C_{prot} * FU$$

Siendo Cprot la concentración obtenida por extrapolación con la recta patrón (mg/L) y FU el flujo urinario de 24h (mL/día).

3.1.2 Determinaciones en muestras clínicas

3.1.2.1 Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre y orina procedentes de los pacientes incluidos en el presente estudio se procesaron en varias etapas.

Las muestras fueron recogidas bajo la supervisión del *Servicio de Nefrología del HUMV*. Con ellas se llevaron a cabo las determinaciones bioquímicas rutinarias según el protocolo de trasplantes, es decir, determinaciones de niveles séricos de glucosa, CO₃H⁻ y Cl⁻, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, urea, Crs y Cro, proteínas y osmolalidad en sangre y orina. Adicionalmente se realizaron determinaciones seriadas de CyCs.

Todas las determinaciones mencionadas se realizaron utilizando un analizador

Beckman Coulter® de la serie AU para uso de diagnóstico in vitro, que permite realizar múltiples determinaciones bioquímicas simultáneamente en pocos minutos y utilizando diferentes métodos analíticos, como colorimetría, turbidimetría, aglutinación en látex y métodos indirectos entre otros. Las cuantificaciones utilizadas se basaron en diferentes métodos según el compuesto a determinar (Tabla 10).

Sustancia	Método	Fundamento
Cr	<i>Jaffé</i> ⁽¹⁶²⁾ (Prueba colorimétrica cinética).	En un medio alcalino, la Cr forma con el ácido pícrico un compuesto de coloración amarillo-anaranjado. La velocidad del cambio de la absorbancia a 520/800nm es proporcional a la concentración de Cr en la muestra.
Urea	<i>Prueba UV cinética.</i>	La urea se hidroliza en presencia de agua y ureasa para producir amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco resultado de la primera reacción se combina con 2-oxoglutarato y NADH en presencia de glutamato-deshidrogenasa (GLDH) para producir glutamato y NAD+. La disminución de la absorbancia de NADH por unidad de tiempo es proporcional a la concentración de urea.
Proteínas	<i>Prueba colorimétrica.</i>	Combinando rojo de pirogalol y molibdato se obtiene un complejo rojo con una absorbancia máxima de 470nm. El análisis se basa en el cambio de absorción resultante de la fijación del complejo de rojo de pirogalol y molibdato a grupos amínicos básicos de moléculas de proteínas. Se forma un complejo azul-púrpura con una absorbancia máxima de 600nm. La absorbancia de este complejo es directamente proporcional a la concentración proteínica de la muestra.
CyC	<i>Inmunonefelometría con partículas intensificadoras.</i>	Las partículas de poliestireno cargadas con anticuerpos específicos contra CyC humana forman agregados al mezclarse con las muestras que contienen CyC. Estos agregados van a dispersar la luz incidente. La intensidad de la dispersión es proporcional a la concentración de la correspondiente proteína en la muestra. La valoración se hace mediante comparación con un estándar de concentración conocida.

Tabla 10. Fundamento de las determinaciones bioquímicas realizadas en HUMV cuyos datos se analizaron en los sujetos de estudio.

Parte de la orina recogida fue procesada para la realización de las determinaciones específicas de este estudio en el *Laboratorio de Investigación de Nefrología e Inmunología del Trasplante*, donde se centrifugó y segregó el pellet del sobrenadante de la orina. El sobrenadante de orina se envió a la *Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular de la Universidad de Salamanca*, donde se cuantificaron los biomarcadores objeto de este estudio según las técnicas que se explican más adelante.

La toxicidad del tratamiento inmunosupresor y el tratamiento concomitante que requiere un trasplantado, que en casos puede modificar las concentraciones plasmáticas de fármaco, obliga a monitorizar los niveles de fármacos inmunosupresores. Se analizaron los niveles de tacrólimus en los receptores para establecer una posible relación con la función renal inicial y una posible predisposición manifestada con los marcadores determinados en orina. Los niveles séricos de tacrolimus se determinaron por el *Servicio de Farmacología del HUMV* mediante inmunoensayo magnético quimioluminiscente (CMIA) de Abbott ARCHITECT® (de Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES

En las muestras de orina de los pacientes incluidos en el estudio se determinaron de manera seriada los niveles de marcadores urinarios de predisposición y los considerados precoces de daño tubular, tanto de las muestras obtenidas en la fase pretrasplante como de las muestras procedentes de los sujetos trasplantados.

Las determinaciones de marcadores se realizaron mediante las técnicas apropiadas para cada parámetro independientemente del origen de las muestras:

- ✓ Por la técnica Western Blot se determinó la expresión de los marcadores de predisposición identificados previamente, además de un marcador de daño renal.
- ✓ Por la técnica de ELISA se determinó la excreción urinaria de un marcador temprano de daño renal.
- ✓ Por métodos fotométricos de cuantificación de enzimas se determinó la excreción de otros marcadores en la orina de los pacientes.

3.2.1 Western blot

El Western blot es una técnica semicuantitativa que permite la separación de proteínas de una muestra y su posterior identificación.

a) *Preparación de la muestra*

Se tomó una muestra de 21 μ L de orina, se le añadió el tampón de carga (Tris base 125 mM, glicerol 10%, Sodio Dodecil Sulfato(SDS)2%, β -mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0.1% pH 6.8), y se calentó a 95-100°C durante 3-5min. De esta manera se desnaturalizan las proteínas, para que posteriormente en la electroforesis migren en función de su masa, sin que influya la estructura tridimensional.

b) Electroforesis en gel

Las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en gel SDS-PAGE (Sodio Dodecil Sulfato Poli-acrilamida Gel Electroforesis), en función de su carga y peso molecular, en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico (Fig 20).

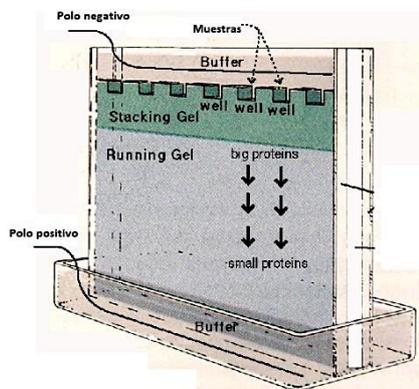


Fig 20. Esquema de la electroforesis.

La electroforesis que se usó se basa en un sistema discontinuo, en el que se requiere un gel concentrador (stacking) y un gel separador (running). Estos tienen distinto pH y concentración de acrilamida, y el objetivo es que las muestras se concentren en una zona muy reducida entre ambos geles, para que posteriormente se desplacen todas de manera uniforme a través del gel separador.

Una vez preparados los geles, y con las muestras cargadas, se introdujeron en una cubeta a la que se le añadió tampón de electroforesis (Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 1.7mM) y se aplicó una corriente de 130V durante aproximadamente una hora y media.

c) Transferencia

Una vez se separaron las proteínas en el gel, se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno), que previamente había sido activada humedeciéndola en metanol.

La transferencia se realizó a un voltaje de 400V y un amperaje constante de 400mA durante aproximadamente 1h y 30min por membrana. El método se basa en aplicar una corriente eléctrica en tampón de transferencia, para que las proteínas migren del gel a la membrana. Para ello se colocaron los siguientes elementos (del polo positivo o ánodo al negativo o cátodo): esponja, papeles de filtro, membrana, gel, papeles de filtro y esponja (humedecidos en tampón de transferencia) (Fig 21).



Fig 21. "Sandwich" para transferencia

d) Bloqueo e incubación con anticuerpos.

Una vez realizada la transferencia y con las proteínas en la membrana, se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados con proteínas. Para ello, tras lavar la membrana con tampón de lavado (Tween 20 0.1%, NaCl 150mM, Tris 20 mM pH 7.5) se incubó con tampón de bloqueo (BSA en tampón de lavado, a una concentración del 5%), durante al menos 2h a temperatura ambiente en agitación. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario, que se une a la proteína, a la dilución adecuada (ver tabla 11), durante toda la noche y a 4°C. Tras la incubación, se hicieron tres lavados de 6min con tampón de lavado, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, que reacciona frente al primario y que lleva conjugada la peroxidasa de rábano picante (HRP), 45min a temperatura ambiente. Esta enzima, al añadirle posteriormente el sustrato, produce una señal lumínica, que permite localizar las proteínas y semi-cuantificar la proteína presente en la muestra.

Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados para Western Blot. En la tabla se especifica el peso molecular de cada proteína y se detallan las referencias y diluciones de los anticuerpos correspondientes. AcP: Anticuerpo policlonal

e) Revelado

Para detectar las proteínas se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol por la HRP y potenciado con fosfo-iodofenol (Fig 22). La membrana se incubó durante un minuto con el reactivo de revelado (Tris 0.1 pH 9.3, luminol y fosfo-iodofenol), e inmediatamente, en la oscuridad se impresionó la membrana en una película y se introdujo en la máquina de revelado. Por último, la película se digitalizó y se cuantificó la densidad óptica de las bandas con el programa Scion Image.

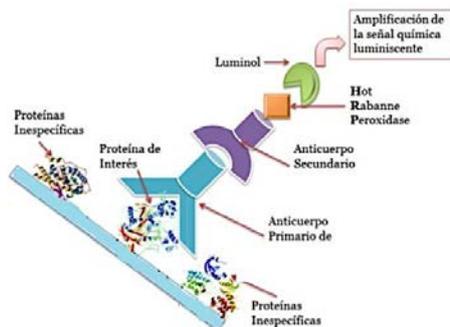


Fig 22. Mecanismo de revelado

3.2.2 ELISA

Fundamento

La prueba se realiza en una placa de micropocillos cuyo fondo está cubierto con un anticuerpo. La unión de marcador presente en la muestra al anticuerpo se detecta con un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con HRP. Al añadir el sustrato de la peroxidasa, los pocillos en los que el marcador está presente adquirirán un color cuya

intensidad puede medirse por espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm. La absorbancia medida será directamente proporcional a la concentración de marcador en la muestra.

Procedimiento

Se realizó la determinación mediante el Rapid ELISA Kit® de Bioporto Diagnostics.

El kit viene provisto con una recta patrón de concentraciones 0, 0.2, 2.5, 10 y 20ng/mL. Se diluyen las muestras 1:50. Se añade en cada pocillo 50µL de anticuerpo conjugado con HRP. A continuación, se añade la recta y las muestras diluidas (50µL), se cubren los pocillos y se incuba a temperatura ambiente durante 30min.

Una vez pasados los 30min se lavan los pocillos 3 veces con la Solución de Lavado incluida en el kit y se añaden 100µL de la solución sustrato. Se incuba durante 15min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se añaden 100µL de Solución de Parada y se mide la absorbancia a 450nm. Se utilizan los valores de absorbancia tanto para hallar la recta patrón como para calcular la concentración de marcador en las muestras.

3.2.3 Determinación de otros marcadores

Fundamento

La actividad del marcador renal es determinada por la medida espectrofotométrica de la aparición del producto resultante de la reacción de escisión enzimática directa de un sustrato sintético de la enzima.

El 2-metoxi-4-(2'-nitrovinil)-fenil 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranososa es hidrolizado por la enzima liberando 2-metoxi-4-(2'-nitrovinil)-fenol. El producto obtenido desarrolla color en presencia de tampón alcalino (Fig 23).

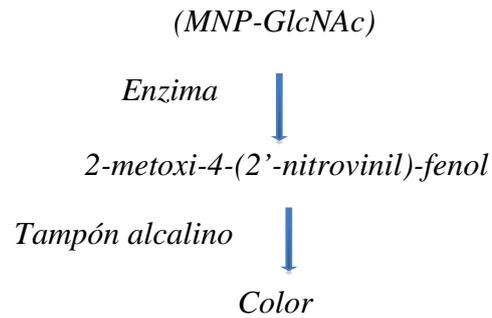


Fig 23. Reacción de escisión enzimática del sustrato colorimétrico.

El producto obtenido de esta reacción absorbe a una longitud de onda de 505nm.

Procedimiento

La determinación se realizó con el kit de Laboratorios DiaZyme® para la determinación de la actividad enzimática en orina.

En una placa de 96 pocillos se pipeteó 10µL de muestra de orina y de las soluciones patrón. Se añadieron 150µL de sustrato comercial en cada pocillo y se incubó 5min a 37°C.

Se añadieron 50µL de un tercer reactivo a cada pocillo y se midió la absorbancia a 505nm. La concentración problema presente en las muestras se interpola de la recta de calibración preparada a partir de soluciones patrón.

3.3 ANÁLISIS DE OTROS PARÁMETROS CLÍNICOS

3.3.1 Estudio de biopsias

Se realizó un estudio de las biopsias realizadas a los riñones de los donantes incluidos en el estudio en el *Departamento de Anatomía Patológica del HUMV* y se aplicó el Score histológico referido en la introducción⁽⁴⁸⁾ para establecer una posible relación entre la calidad del injerto y la evolución a corto plazo (30 días) y medio plazo (un año) de la función del injerto y de los receptores correspondientes.

Según protocolos internos del *Servicio de Nefrología del HUMV*, se realiza una biopsia del órgano previa a la implantación en el receptor en aquellos casos en los que el donante es cadáver y supera los 55 años. En los informes obtenidos de *Anatomía Patológica* se evalúan entre otros parámetros la esclerosis glomerular, enfermedad arteriolar hialina, fibrosis miointimal, atrofia tubular y fibrosis intersticial. Todos ellos se computan en el parámetro Score total y para que el injerto se valore como candidato para trasplantar debe obtener un valor de Score total ≤ 7 .

Se analizaron las biopsias en los receptores en el periodo postrasplante para su diagnóstico según los criterios de Banff⁽¹⁹⁾. Así, se analizaron las biopsias realizadas en los receptores según indicación clínica por el *Servicio de Nefrología del HUMV*. La biopsia determinó en su caso la presencia de RA, NTA o toxicidad por CsA.

3.3.2 Estudio de la función renal del donante

Se realizó un estudio de la función renal en los donantes a través de la medida del FG calculado a partir de la ecuación ya descrita CKD-EPI⁽¹⁶⁵⁾. Se clasificó al grupo de donantes según $FG < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ o $FG > 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$.

Se compararon estos grupos con diferentes variables entre las que se incluyen los marcadores presentes tanto en donante, como en receptor al primero y tercer día postrasplante para establecer una posible relación con la evolución del injerto, así como una predicción de la función por parte de los marcadores encontrados en la orina.

3.3.3 Riesgo de Función Retardada del injerto

De acuerdo al cálculo validado por Irish et al⁽³⁶⁾ se determinó el riesgo de sufrir FRI según factores de donante (Cr terminal, edad, peso, donante vivo o cadáver, muerte cardíaca o no, antecedentes de HTA y causa de muerte asociada a ACVA y a anoxia), de receptor (anticuerpos reactivos, tiempo en diálisis, índice de masa corporal, raza, sexo, trasplantes previos, presencia de DM, transfusiones pretrasplante, edad y trasplante combinado) y del propio trasplante (correlaciones HLA, tiempos de isquemia fría y caliente y perfusión del órgano). Mediante una fórmula matemática se ponderan

cada uno de los parámetros considerados dando valor numérico (%) al riesgo de ese receptor.

Para aplicar este cálculo fue necesario obtener de manera previa los anticuerpos reactivos en el receptor. Esto se realizó mediante el programa virtual PRA Calculator versión 3.0, que permite definir el PRA en porcentaje cuando los antígenos anti HLA son definidos en screening de anticuerpos específicos HLA (HLA-A, B, C, DR Y DQ).

3.3.4 Estudio de la función inicial del injerto a corto y largo plazo

Se realizó un estudio de la función inicial del injerto en los receptores en los primeros 7 días postrasplante y a largo plazo hasta completar el primer año mediante el análisis de los valores de Crs.

Tal y como se ha descrito en la introducción, según Rodrigo et al⁽⁵⁸⁾ los pacientes trasplantados pueden dividirse en grupos de acuerdo a la evolución inicial del injerto basándose en los valores de Crs el día 5 postrasplante y en la necesidad de diálisis en la primera semana postrasplante. De acuerdo a esto, se clasificó a los receptores del estudio como grupo con FII a aquellos en los que la Crs el día 5 fue $<3\text{mg/dL}$, mientras que los receptores con Crs $>3\text{mg/dL}$ el quinto día postrasplante fueron clasificados como FLI y según la necesidad de diálisis durante la primera semana se clasificaron como grupo con FRI. La evolución de la función renal a largo plazo se realizó de acuerdo a los valores de Crs al año del trasplante: se clasificó a los receptores como con buena función renal al año si el valor de Crs que presentaban era $<3\text{mg/dL}$, mientras que si los valores de Crs superaban los 3mg/dL o se había perdido el injerto, se incluyeron en el grupo de mala función renal al año.

Con estos grupos se buscaron relaciones con la presencia de marcadores en donante a tiempo pretrasplante y receptor el día 1 y 3 postrasplante y demás variables.

4. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

Todos los datos recopilados se almacenaron en soportes informáticos empleando el software de Microsoft Office Professional 2007 para Windows®. Todos los datos se analizaron mediante el empleo de la aplicación estadística SPSS software, versión 20 (IBM SPSS Statistics 20, Chicago, IL, USA) para Windows®.

En primer lugar se estudió si los datos presentaban una distribución normal mediante el test de Kolmogórov-Smirnov. Las variables cuantitativas se expresan como medias \pm desviación estándar de la media (DS) en el caso de que siguieran una distribución normal, y como medianas y rango intercuartil (RIC) en el caso de datos con distribuciones no paramétricas.

Las comparaciones entre 2 grupos de variables se realizaron mediante la t de Student para distribuciones normales o mediante la U de Mann-Whitney en el caso de que no sigan una distribución normal. Para comparar 2 o más grupos de variables, cuando los datos presentaban una distribución normal, se aplicó el test de Levene para detectar la homogeneidad de las varianzas, y en caso de que estas resultaran ser homogéneas, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA). En los casos en que los datos no presentaban distribución normal o las varianzas eran heterogéneas, se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

Las variables cualitativas se expresan como número de casos (n) y porcentaje, la comparación entre los grupos se realizó mediante el test de Chi-cuadrado.

4.1 ANÁLISIS DE FRECUENCIAS

Con los datos de marcadores en orina de donantes (a tiempo pretrasplante) y de receptores (a los días 1 y 3 postrasplante), se dividió a los sujetos de estudio según el nivel de marcador se encontrara por encima o por debajo del percentil 70 y se realizó un análisis de frecuencias a través de tablas de contingencia.

Se representaron las diferencias entre las frecuencias observadas (reales) /esperadas (teóricas si las variables fueran independientes) de las variables FII, FRI y FLI según el percentil del marcador cuantificado (ya fuera de predisposición o daño

temprano) fuera superior o inferior del percentil 70.

Como el grado de relación existente entre las variables no puede ser establecido simplemente observando las frecuencias de la tabla de contingencia, para determinar la asociación entre nivel de marcador con la función del injerto en el individuo se acompañó de la correspondiente prueba de significación Chi cuadrado. Esto contrastó la hipótesis de que las variables patología/marcador eran independientes.

4.2 CORRELACIONES

Se establecieron correlaciones entre los datos para determinar el grado de variación conjunta existente entre las variables marcador en donante pretrasplante y receptor el día 1 y 3 postrasplante y la variable Crs en receptor a la semana, al mes y al año. Se utilizó el coeficiente de correlación rho de Spearman para establecer el grado de correlación. La prueba de significación permitió contrastar la hipótesis nula. Por último, para establecer el tipo de relación entre variables se realizó diagramas de dispersión, cuya forma dio una idea sobre la relación existente entre las variables: relación lineal positiva al comparar con valores de Crs o negativa en el caso de comparaciones con Δ Crs.

4.3 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se realizó un análisis de regresión logística univariante y multivariante para analizar si las variables incluidas en el estudio de los diferentes parámetros considerados pudieran influir de forma independiente en la evolución inicial o a largo plazo del injerto. Este análisis permitió obtener el valor correspondiente del hazard ratio (HR) con su significación.

4.4 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

La significación estadística en todas las pruebas se consideró para una $p < 0.05$ y el análisis se hizo con prueba bilateral o de dos colas.

1. FASE PRECLÍNICA

1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

1.1.1 Cambios fisiopatológicos en los animales de experimentación

Como se puede observar en el gráfico 1 a lo largo del estudio se observó un incremento del peso corporal en el grupo C, apareciendo diferencias significativas tanto respecto al nivel basal del mismo grupo en los días 7 y 9, como respecto al resto de grupos desde el día 11 al final del experimento. La evolución del peso corporal en el grupo G transcurre de forma paralela al grupo C. Si bien en el grupo CsA aparece una leve disminución del peso al inicio del tratamiento (día7), éste se estabiliza manteniéndose en valores similares de peso respecto al grupo G desde el día 11 hasta final del estudio. En los animales a los que se les administró gentamicina y posteriormente CsA se observa una disminución acusada de peso desde el inicio del tratamiento con el inmunosupresor (día 7) hasta el final del experimento (día 16), apareciendo ya en el día 9 diferencias significativas respecto del grupo C.

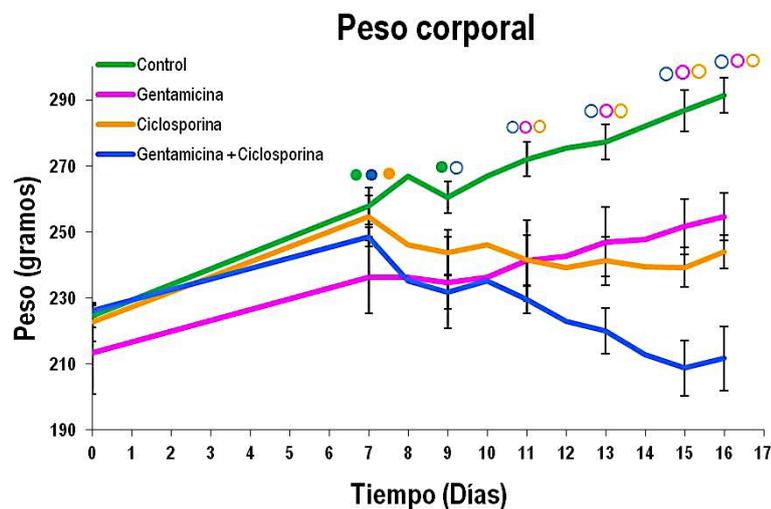


Gráfico 1. Evolución del peso corporal (g) de los animales de experimentación durante el estudio. Grupo C, CsA y G+CsA (n=4) y grupo G (n=3). Tiempos representados: basal, día 7, 11, 13, 15 y 16. Los datos se representan como medias+EEM. Diferencias significativas ($p<0.05$). $\circ\circ\circ\circ$ respecto al control al mismo tiempo, $\bullet\bullet\bullet$ respecto al basal del mismo grupo.

1.1.2 Creatinina plasmática

Como se puede observar en el gráfico 2, hasta el día 7 del estudio no se observan diferencias en los niveles de Crs en ninguno de los grupos.

La administración tanto de gentamicina, como de CsA por separado no manifiesta ninguna alteración importante en los niveles de Crs, que se mantuvieron en valores fisiológicos durante todo el tiempo y niveles similares a los del grupo C, aunque sí se observan diferencias significativas en los niveles de Crs del grupo tratado con gentamicina respecto al grupo C (día 9), a pesar de aparecer de manera retardada a la administración del aminoglucósido con una posología teóricamente subtóxica.

En el grupo G+CsA se empieza a observar un incremento en los valores de Crs con diferencias significativas a partir del inicio del inmunosupresor (día 7) llegando a un pico máximo el día 13 que triplica los valores para el mismo tiempo respecto del grupo C.

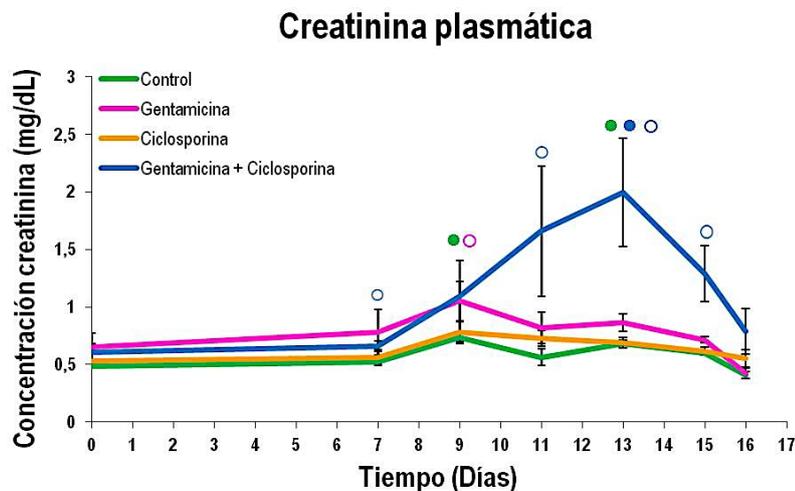


Gráfico 2. Evolución de la Crs (mg/dL) en los grupos de experimentación durante el periodo de estudio. Grupo C, CsA y G+CsA (n=4) y grupo G (n=3). Tiempos representados: basal, día 7, 11, 13, 15 y 16. Los datos se representan como medias+EEM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): ○○○ respecto al control al mismo tiempo, ●●● respecto al basal del mismo grupo.

1.1.3 Urea plasmática

El gráfico 3 muestra los niveles de urea plasmática a lo largo del periodo de estudio en los cuatro grupos y como se puede apreciar el perfil es similar al encontrado en la Crs.

En el grupo G aparecen diferencias significativas a los tiempos día 11 y 15 respecto al control. Igual ocurre con el grupo CsA que presenta diferencias significativas a los tiempos día 13, 15 y 16 respecto al grupo C. Sin embargo, consideramos que estas diferencias no tienen interés fisiopatológico porque los niveles de urea plasmática en estos grupos se mantienen dentro del rango normal en rata.

En el grupo G+CsA con la administración del inmunosupresor como tratamiento adicional al grupo tratado previamente con G, se produjo un pico de concentración de urea plasmática, que alcanza valores hasta tres veces el nivel del resto de los grupos y que hace que aparezcan diferencias significativas en este grupo respecto al control hasta el final del periodo de estudio.

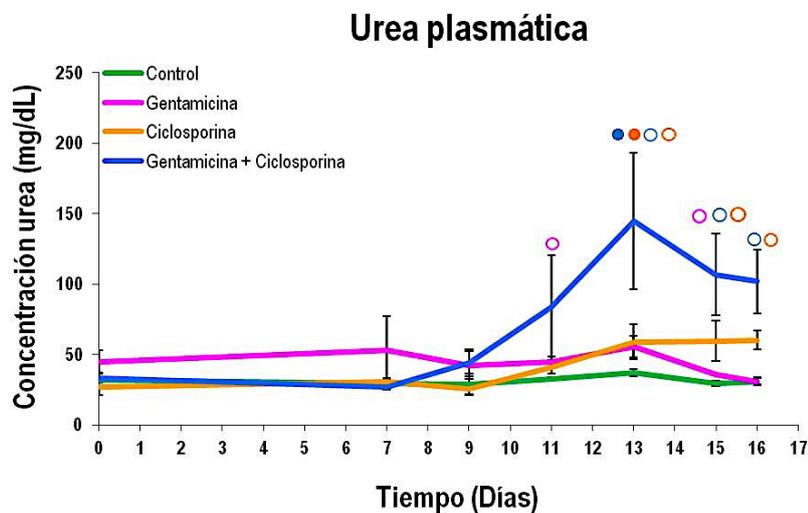


Gráfico 3. Concentración de urea plasmática (mg/dL) en los grupos durante el período experimental. Grupo C, CsA y G+CsA (n=4) y grupo G (n=3). Tiempos representados: basal, día 7, 11, 13, 15 y 16. Los datos se representan como medias+EEM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): ○○ respecto al control al mismo tiempo, ●●● respecto al basal del mismo grupo.

1.1.4 Aclaramiento de creatinina

Tal y como se observa en el gráfico 4, en el modelo se manifestó que tanto en el grupo C, como en los grupos tratados con un solo fármaco no hay modificaciones importantes en cuanto al CCr durante la mayor parte del experimento, aunque sí aparecen diferencias significativas respecto al control al final del estudio los días 15 (grupo G) y 16 (grupo G y grupo CsA). Sin embargo, en el grupo G+CsA sí aparece una clara disminución del ClCr a partir del inicio de administración del inmunosupresor, llegando a ser estadísticamente significativo el día 13 del experimento. Este grupo G+CsA también muestra diferencias significativas respecto al grupo control al final del estudio, tal y como se manifestaba en los otros grupos.

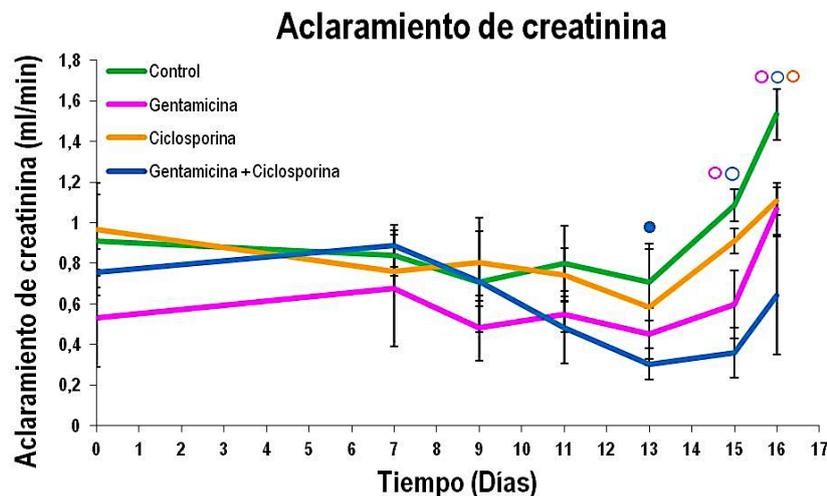


Gráfico 4. Evolución del ClCr (mL/min) en los grupos durante el período experimental. Grupo C, CsA y G+CsA (n=4) y grupo G (n=3). Tiempos representados: basal, día 7, 11, 13, 15 y 16. Los datos se representan como medias+EEM. Diferencias significativas ($p < 0,05$): ○○○○ respecto al control al mismo tiempo, re ●●●● al basal del mismo grupo.

1.1.5 Proteinuria

En el gráfico 5 se puede observar cómo la proteinuria se mantiene estable en los grupos C y CsA, aunque éste último presente una disminución a partir del día 9 y con diferencias significativas respecto al grupo C al final del estudio (días 15 y 16). Sin embargo, los grupos G+CsA y G presentan un perfil similar, con un aumento de la proteinuria hasta llegar a un pico máximo el día 9, a partir del cual comienza a disminuir de manera gradual en ambos casos hasta el final del experimento. Cabe destacar que esta elevación no es estadísticamente significativa en el caso del grupo

tratado sólo con G, mientras que sí lo es en el tratado con ambos fármacos al inicio del tratamiento con CsA (día 7), durante el pico máximo y al final del estudio (días 15 y 16).

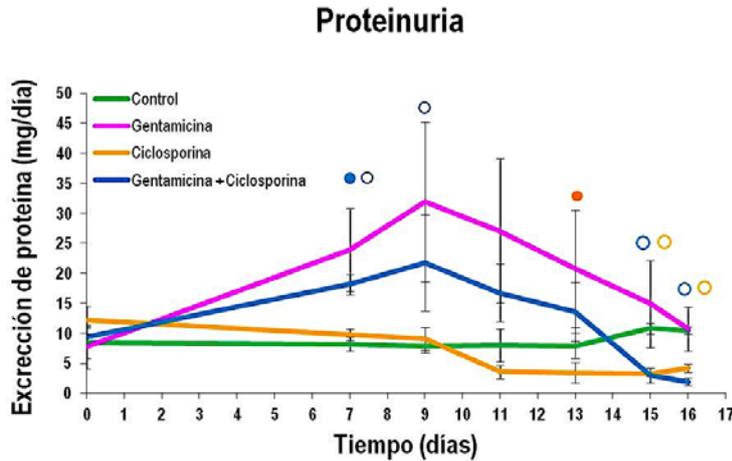


Gráfico 5. Excreción urinaria de proteínas (mg/día) en los grupos durante el periodo experimental. Grupo C, CsA y G+CsA (n=4) y grupo G (n=3). Tiempos representados: basal, día 7, 11, 13, 15 y 16. Diferencias significativas ($p < 0.05$): ○○ respecto al control al mismo tiempo, ●●● respecto al basal del mismo grupo.

1.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Se realizó un estudio histopatológico con el objeto de caracterizar los efectos que causan los diferentes fármacos sobre la estructura histológica del riñón. En los cortes histológicos pertenecientes a ratas de los grupos C, G o CsA no se detectaron alteraciones de la corteza renal (Fig 24 a, b y c).

En los cortes histológicos de ratas del grupo G+CsA (Fig 25 d) se puede apreciar una dilatación de la luz en muchos de los túbulos proximales, con un notable estrechamiento del epitelio de la pared, llegando en ocasiones a presentar epitelio simple plano y material hialino acidófilo en la luz.

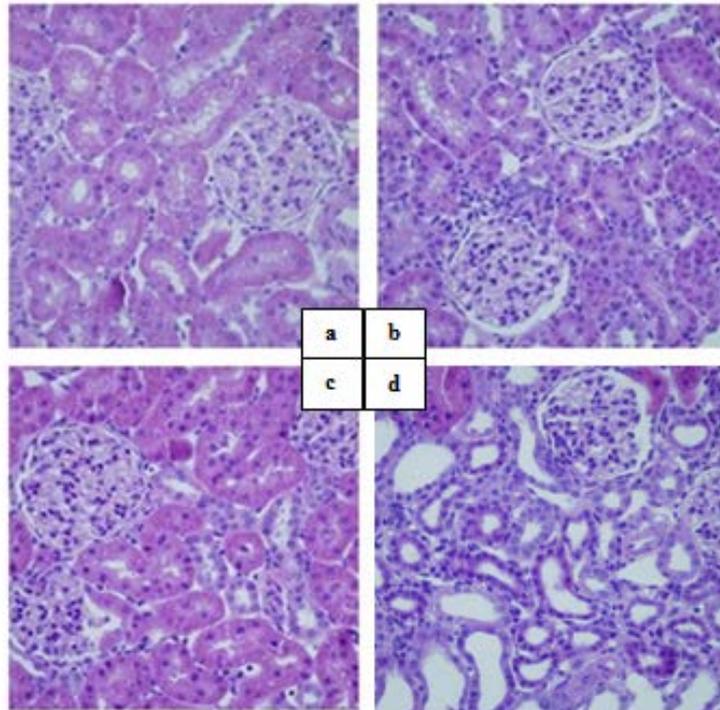


Fig 24. Cortes histológicas de los riñones de los animales de experimentación; a: grupo C; b: grupo G; c: grupo CsA; d: grupo G+CsA. Tinción de H/E. 40x

2. FASE CLÍNICA

2.1 DISTRIBUCIÓN DE SUJETOS Y MUESTRAS

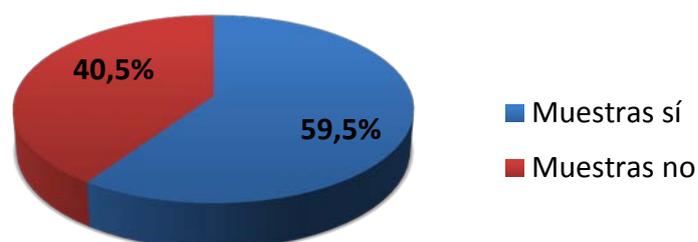
En el estudio se reclutaron 93 sujetos, de los cuales 54 fueron receptores y 37 fueron donantes (englobando 5 donantes vivos y 32 donantes cadáveres). Hubo dos exclusiones de pacientes en el grupo de receptores, por no realizarse finalmente el trasplante. La tabla 12 recoge la distribución de sujetos así como las relaciones injerto-receptor, según se utilizara un solo riñón del donante para un receptor o los dos riñones del donante para dos receptores.

Distribución de sujetos de estudio		N(%)
	Donante Vivo	5(13.5)*
	Donante cadáver	32(86.5)*
Donación un riñón		20 (54.1)*
Donación ambos riñones		17 (45.9)*
	Receptor vivo	5(9.3)**
	Receptor de cadáver	49(90.7)**
Relación 1R-1D		20(37.0)**
Relación 2R-1D		34(63.0)**

Tabla 12. Distribución de donantes (D) y receptores (R). *Datos calculados para los donantes (n=37), **datos calculados para los receptores (n=54).

La muestra del donante cadáver previa a la extracción se obtuvo en un 53% de los casos (n=17), mientras que en el caso de donante vivo, se recolectó la muestra previa a la extracción en el 100% de los casos (n=5) (Fig 25).

Fig 25. Distribución de las muestras recolectadas pretrasplante en todos donantes (n= 37).



2.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES

2.2.1 Datos de los donantes

La tabla 13 muestra las principales características demográficas de los donantes. La edad mínima de los donantes fue 23 y la máxima 76 años.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS		N(%)
Número de Pacientes		37 (100)
Edad (años)		57.6±14.0*
Hombres		19(51.4)
Mujeres		18 (48.6)
Histología pre-Tx		16 (43.2)
	Riñón I	12(48.0)
	Riñón D	13(52.0)
Comorbilidades **		
	DM	3 (8.1)
	HTA	11 (29.7)
Causa de muerte ***		
	ACVA	22 (68.8)
	TCE	6 (18.8)
	Anoxia cerebral	1 (3.1)
	Asitolia	2(6.3)
	Desconocida	1 (3.1)
FG (mL/min/1.73m ²)		85.8±27.3*

Tabla 13. Datos demográficos de donantes.*media±DS, ** datos calculados para el total de los donantes (n=37), *** datos calculados para donantes de cadáver (n=32). DM: Diabetes mellitus. HTA: Hipertensión arterial. ACVA: Accidente cerebro-vascular agudo. TCE: traumatismocráneo-encefálico.

2.2.2 Datos de receptores

En la tabla 14 se recogen las principales características demográficas de los receptores. La edad mínima de los receptores fue de 33 y la máxima de 75 años.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS		N(%)
Número de Pacientes		54 (100)
Edad (años)		55.2±12.4*
Hombres		34 (63.0)
Mujeres		20 (37.0)
Etiología Enf. Renal		
	Glomerular	18 (33.3)
	Otras***	36 (66.7)
LE (años)		1.3 (7.2)**
Diálisis (años)		3.4 (12.3)**
Número de trasplante		
	Primero	28(51.9)
	Segundo	21(38.9)
	Tercero	5(9.3)
Incompatibilidades HLA		
	A (0/1/2)	6 / 23 / 25
	B (0/1/2)	3 / 14 / 37
	DR (0/1/2)	5 / 32 / 17
Ac máximos		38.5±42.7*
Clase I		8 (15.1)
Clase II		10 (18.9)
Isquemia fría (h)		17.0±8.1*

Tabla 14. Características demográficas de los receptores.*media±DS, **mediana (RIC), ***congénita, intersticial, sistémica, vascular, desconocida. LE: Lista de espera.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCION RENAL DE LOS DONANTES

2.3.1 Niveles séricos de cistatina C y creatinina

Los niveles basales de Crs (mg/dL) encontrados en los donantes (n=37) no seguían una distribución normal y la mediana se encontró en 0.8 mg/dL (RIC de 0.4), siendo el valor máximo de 3.8 mg/dL y el mínimo de 0.1 mg/dL. En cuanto a los valores de CyC determinados en los donantes (n=19) se movieron en un intervalo de 0.2- 1.2 mg/L, siendo el valor medio 0.7±0.2 mg/L.

2.3.2 Descripción del score biopsia de donante

Se realizó biopsia pretrasplante en 25 injertos procedentes de donantes cadáver. En un total del 64% de los injertos el score histológico obtenido se encontró en los valores 0 y 1, el reparto de donantes con score 2-5 fue de uno a tres individuos y sólo en uno de los casos se trasplantó un injerto con el score máximo permitido de 7.

La tabla 15 detalla los score de injertos biopsiados y posteriormente trasplantados.

		N (%)
Score total	0	7 (28.0)
	1	9 (36.0)
	2	2 (8.0)
	3	1 (4.0)
	4	3 (12.0)
	5	2 (8.0)
	7	1 (4.0)

Tabla 15. Valoraciones de las biopsias de cada riñón donante en número de casos y porcentaje.

2.4 CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DEL TRASPLANTE

2.4.1 Determinaciones analíticas (creatinina y cistatina C en sangre)

En el gráfico 6 se representan los valores medios de Crs en el receptor (tomando como valor basal pretrasplante el valor de Crs en el donante) a lo largo de la evolución en el tiempo a los días 1 y 3, al mes, a los 3 meses, 6 meses y al año. Como se puede observar, los valores inmediatos al trasplante que se estabilizan aproximadamente al mes en torno a unos niveles de 0.5 a 1.7 mg/dL) y se mantienen así hasta el año postrasplante. Se observa que se llegan a recuperar los niveles de Crs hasta llegar a valores próximos a los de partida en el donante (1 mg/dL donante vs 1.7 mg/dL receptor al año).

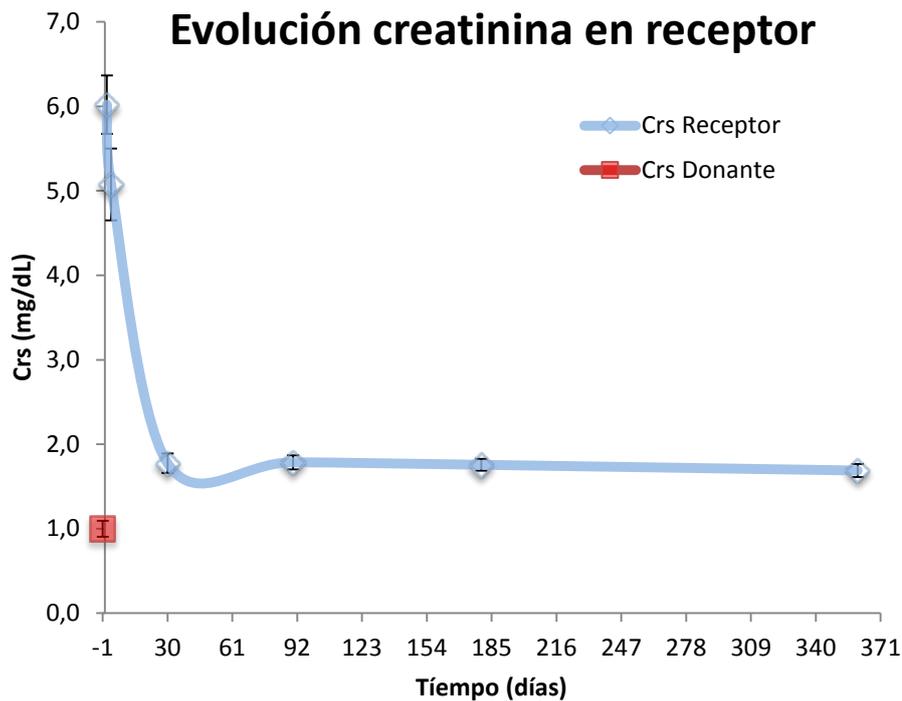


Gráfico 6. Evolución de la Crs en el receptor desde el momento pretrasplante (valor correspondiente a Crs en donante) hasta el año. Los datos se representan como medias+EEM. Rojo= valor Crs donante a tiempo pretrasplante (n=37); azul= valores Crs receptor a tiempos postrasplante días 1, día 3, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 1 año (n=54).

De manera similar ocurre con los valores de CyC. El gráfico 7 representa los valores medios de CyC en el receptor (tomando como niveles basales la CyC pretrasplante en donante) a lo largo de la evolución a un año, representando los tiempos postrasplante día 1 y 3, al mes, a los 3 meses, 6 meses y al año. Se observa que los niveles iniciales de CyC postrasplante son elevados y que con el tiempo se estabilizan en torno a valores normales (0.53-0.95 mg/L). Aunque no alcanzan los niveles basales encontrados en el donante (0.7 mg/L en donante vs 1.5 mg/L en receptor) sí se aproximan a ellos. Sin embargo, si se comparan con los valores medios de Crs en la evolución al año los valores de CyC presentes en el receptor tardan más en estabilizarse. Así en el caso de la CyC hay más dispersión de los valores hasta el tercer mes.

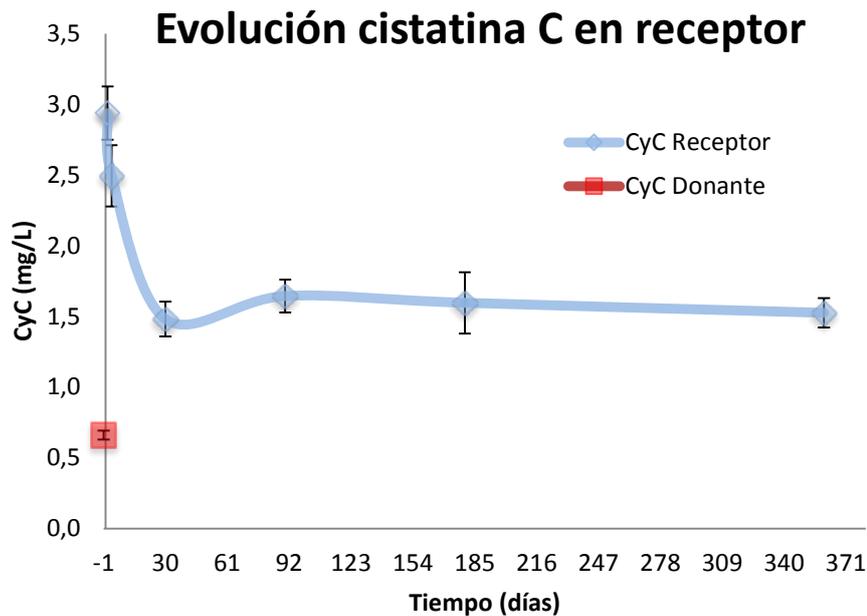


Gráfico 7. Evolución de la CyC en el receptor desde el momento pretrasplante (valor correspondiente a CyC en donante) hasta el año. Los datos se representan como medias+EEM. Rojo= valor CyC donante a tiempo pretrasplante (n=37); azul= valores CyC receptor a tiempos postrasplante días 1, día 3, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 1 año (n=54).

2.4.2 Evolución inicial del injerto

De los 54 receptores, en 12 casos se realizó biopsia antes de un mes postrasplante. La biopsia evidenció RA en el 50% de los receptores (6 casos), NTA en un 8.3% (1 caso) y sin embargo no se registró ningún caso de nefrotoxicidad asociada al uso de inmunosupresor.

Para evaluar la función inicial del injerto se evaluó la evolución de Crs en relación al score de donante durante el primer mes postrasplante tal y como se representa en el gráfico 8. Se observa que el score de 7 (valor límite de referencia para trasplantar el órgano), tiene una evolución más lenta del injerto con valores iniciales de Crs mayores durante la primera semana. A partir de la primera semana no hay diferencias entre la Crs y el score del donante.

Correlación calidad del injerto-evolución un mes

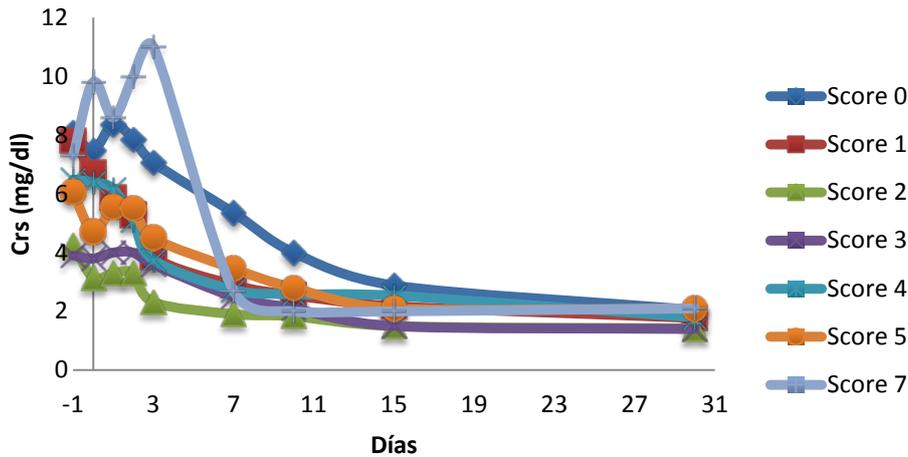
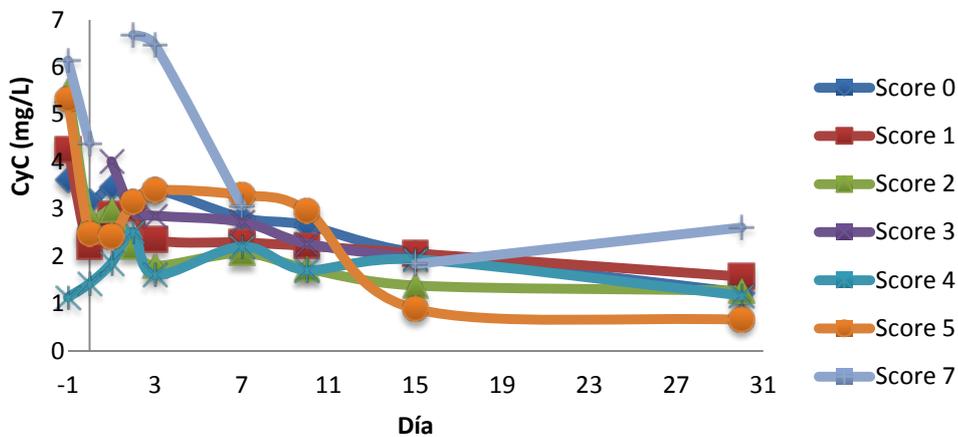


Gráfico 8. Relación score injerto con Crs en receptor a un mes (n= 20).

De la misma manera, en el gráfico 9 se relaciona la CyCs con el score de la biopsia del donante. La situación anterior parece repetirse: a mayor score (peor calidad del injerto) los valores de CyCs tardan más tiempo en alcanzar niveles estables, con un repunte de la CyC al mes.

Correlación calidad del injerto-evolución un mes



Se produjo FII en 30 receptores (55.5%), FLI en 4 casos (7.4%) y FRI en 20 pacientes (37.1%). Estos datos se relacionan con los cálculos⁽³⁶⁾ realizados para estimar el riesgo de sufrir FRI según un score basado en datos del donante y del receptor. Se obtuvo un valor medio de riesgo del 27.8% ±14.2, de manera que el riesgo medio de FRI estimado se encuentra en el 28% y la necesidad de diálisis la primera semana postrasplante se evidencia en el 37% de los sujetos.

2.5 ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES ESTUDIADOS

2.5.1 Análisis de las correlaciones de los biomarcadores en donante con los valores de Crs en receptor

El estudio de la correlación de los biomarcadores en orina de los donantes a tiempo pretrasplante con los niveles de Crs en los receptores a los tiempos postrasplante día 1, día 7 y al mes se presentan en la tabla 16 (solo las significativas o casi significativas). Se realizaron diferentes correlaciones tratando los datos de donante y receptores tanto de manera global, como segregando los datos según el origen de donante vivo o cadáver. En la tabla 16 se describe la relación de los datos (teniendo en cuenta que una correlación positiva indicaría buena evolución para el caso de valores aislados de Crs y una correlación negativa sería buena evolución de la función del injerto en el caso de usar los Δ Crs), con el coeficiente de correlación de Spearman y la significación estadística encontrada en las correlaciones de biomarcadores estudiadas.

Tiempos de Crs		DONANTE CADÁVER Y DONANTE VIVO			DONANTE CADÁVER				DONANTE VIVO	
Crs día 1	Coefficiente de correlación	.092	.202	.243	-.399	-.364	-.100	-.397	.900	.900
	Sig. (bilateral)	.628	.284	.196	.048	.074	.633	.049	.037	.037
	N	30	30	30	25	25	25	25	5	5
Crs día 7	Coefficiente de correlación	.361	.365	.397	.158	.141	.248	.212	.900	.900
	Sig. (bilateral)	.050	.047	.030	.451	.501	.231	.309	.037	.037
	N	30	30	30	25	25	25	25	5	5
ΔCrs día 1-día 7 (%)	Coefficiente de correlación	-.157	-.131	-.056	-.398	-.310	-.204	-.342	-.900	-.400
	Sig. (bilateral)	.408	.491	.770	.049	.131	.329	.095	.037	.505
	N	30	30	30	25	25	25	25	5	5
Crs 1 mes	Coefficiente de correlación	.291	.230	.417	.271	.197	.466	.267	.900	.900
	Sig. (bilateral)	.119	.221	.022	.190	.344	.019	.198	.037	.037
	N	30	30	30	25	25	25	25	5	5
ΔCrs día 1-día 30 (%)	Coefficiente de correlación	.080	.129	.123	-.425	-.373	-.325	-.374	-.900	-.600
	Sig. (bilateral)	.673	.497	.517	.034	.066	.113	.065	.037	.285
	N	30	30	30	25	25	25	25	5	5

Tabla 16. Correlaciones de Spearman para marcadores presentes en orina de donantes (n=30) y Crs a tiempos día 1, 7 y 30, así como para el correspondiente descenso de la Crs respecto al primer día postrasplanteen los mismos tiempos. En amarillo se muestran las correlaciones significativas encontradas ($p < 0.050$).

2.5.2. Correlación de los biomarcadores analizados precozmente en receptor y correlación con la Crs

2.5.2.1 Biomarcadores a día 1 postrasplante y su relación con los niveles de Crs

En la tabla 17 se detalla la correlación de los biomarcadores en orina de los receptores el día 1 postrasplante con los datos de Crs en los tiempos día.7, al mes y al año, así como con los diferentes Δ Crs calculados (tanto para el grupo de los receptores de manera global, como separando a los mismos de acuerdo al tipo de donante). Como se puede observar, en la tabla 17 se describe la relación de los datos (positiva o negativa), el coeficiente de correlación y la significación estadística encontrada en las correlaciones de marcadores estudiadas.

Tiempos de Crs		DONANTE CADÁVER Y DONANTE VIVO				DONANTE CADÁVER			DONANTE VIVO	
Crs día 7	Coeficiente correlación	.526	.330	-.211	.335	.339	.233	.477	.500	-.600
	Sig. (bilateral)	.003	.080	.273	.076	.106	.273	.018	.391	.285
	N	29	29	29	29	24	24	24	5	5
Δ Crs día 1-día 7 (%)	Coeficiente correlación	-.286	-.463	-.161	-.415	-.416	-.463	-.428	-.900	0.000
	Sig. (bilateral)	.133	.011	.404	.025	.043	.023	.037	.037	1.000
	N	29	29	29	29	24	24	24	5	5
Crs 1 mes	Coeficiente correlación	.430	.113	-.142	.312	.309	-.039	.401	.500	-.600
	Sig. (bilateral)	.020	.559	.462	.099	.141	.857	.052	.391	.285
	N	29	29	29	29	24	24	24	5	5
Δ Crs día 1-día 365 (%)	Coeficiente correlación	.146	.006	-.406	-.127	-.237	-.103	-.084	-.800	-.400
	Sig. (bilateral)	.460	.977	.032	.520	.266	.632	.695	.200	.600
	N	28	28	28	28	24	24	24	4	4

Tabla 17. Correlaciones de Spearman para marcadores presentes en orina de receptores el día 1 postrasplante (n=29) y Crs a tiempos día 1, 7, 30 y 1 año, así como para el correspondiente descenso de la Crs respecto al primer día postrasplante en los mismos tiempos. En amarillo se muestran las correlaciones significativas encontradas ($p < 0.050$).

2.5.2.2 Biomarcadores a día 3 postrasplante y relación con niveles de Crs

Se describe en la tabla 18 la significación estadística encontrada en el estudio de la correlación de los biomarcadores en orina de los receptores el día 3 postrasplante con los datos de Crs a los tiempos día 7, al mes y al año, así como los diferentes Δ Crs calculados (tanto tratando a los receptores de manera global, como separando los grupos de acuerdo al donante). Como se puede observar, en la tabla 18 se describe la relación de los datos (positiva o negativa), el coeficiente de correlación y la significación estadística encontrada en las correlaciones de marcadores estudiadas.

Tiempos de Crs		DONANTE CADÁVER Y DONANTE VIVO						DONANTE CADÁVER					
Crs día 7	Coeficiente de correlación	.395	.276	.241	-.332	-.088	.449	.450	.357	.405	-.263	.043	.458
	Sig. (bilateral)	.019	.109	.164	.051	.614	.007	.013	.053	.026	.161	.821	.011
	N	35	35	35	35	35	35	30	30	30	30	30	30
ΔCrs día 1-día 7 (%)	Coeficiente de correlación	-.427	-.513	-.492	-.017	-.187	-.345	-.489	-.515	-.521	-.021	-.226	-.380
	Sig. (bilateral)	.011	.002	.003	.921	.283	.042	.006	.004	.003	.912	.229	.038
	N	35	35	35	35	35	35	30	30	30	30	30	30
ΔCrs día 1-día 30 (%)	Coeficiente de correlación	-.103	-.238	-.197	-.257	-.267	.050	-.188	-.223	-.148	-.288	.073	-.333
	Sig. (bilateral)	.555	.169	.255	.136	.122	.777	.321	.236	.435	.123	.701	.073
	N	35	35	35	35	35	35	30	30	30	30	30	30
ΔCrs día 1-día 365 (%)	Coeficiente de correlación	-.007	-.222	-.267	-.440	-.326	.110	-.095	-.200	-.177	-.409	-.270	.002
	Sig. (bilateral)	.970	.215	.133	.010	.064	.541	.625	.298	.357	.028	.156	.992
	N	33	33	33	33	33	33	29	29	29	29	29	29

Tabla 18. Correlaciones de Spearman para biomarcadores presentes en orina de receptores el día 3 postrasplante (n=35) y Crs a tiempos día 1, 7, 30 y 1 año, para el correspondiente descenso de la Crs respecto al primer día postrasplante en los mismos tiempos. En amarillo se muestran las correlaciones significativas encontradas (p<0.050).

2.5.3 Análisis de frecuencias

Los gráficos 10a y 10b muestran las diferencias de frecuencias encontradas/esperadas comparando dos grupos separados por el percentil 70 del valor del biomarcador en el primer y tercer día postrasplante y la función inicial del injerto según FII, FLI o FRI.

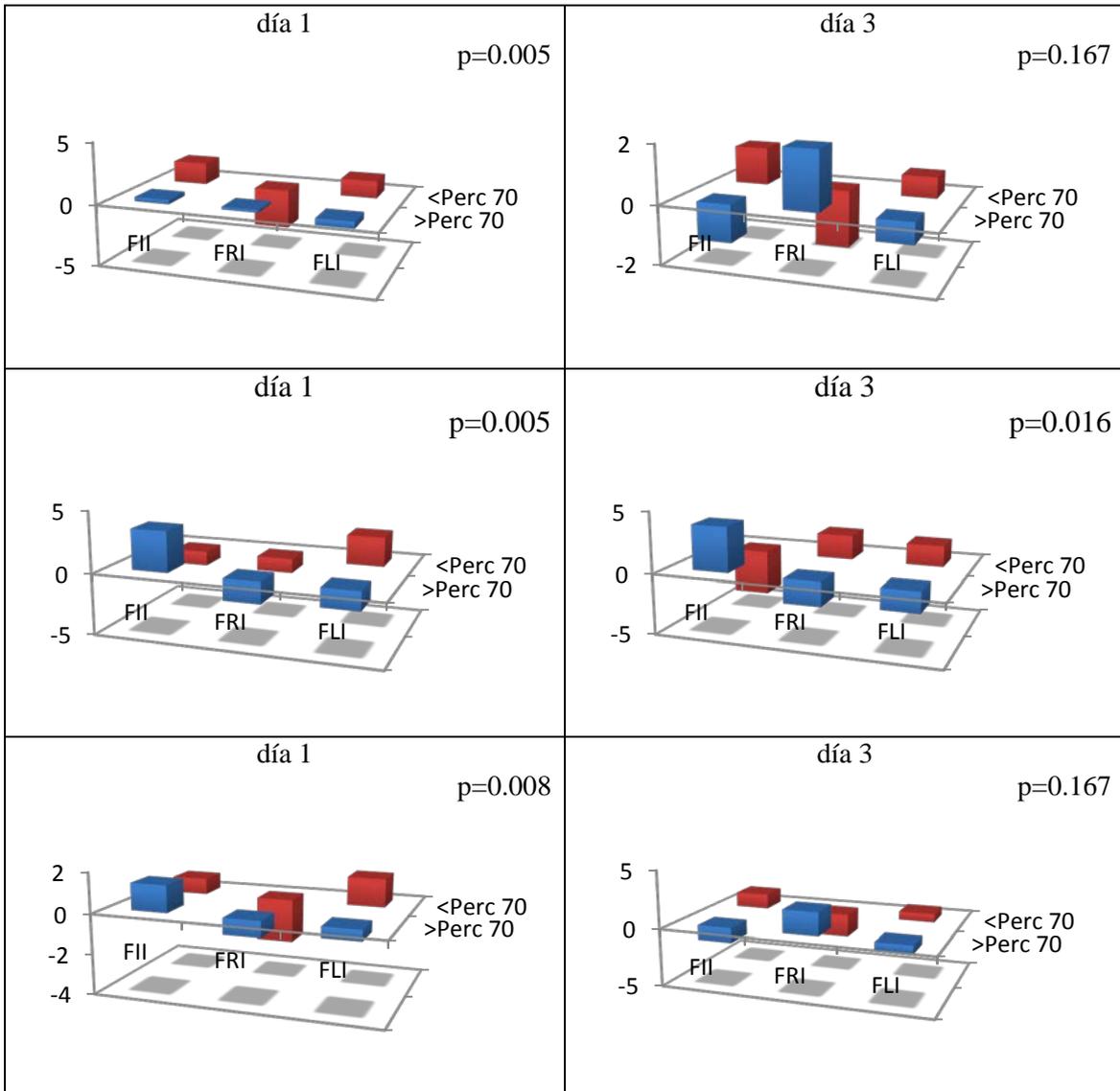


Gráfico 10a. Relación entre la diferencia de frecuencias encontradas/esperadas en el percentil 70 de marcadores de predisposición en el día 1 y 3 postrasplante y la función inicial del injerto.

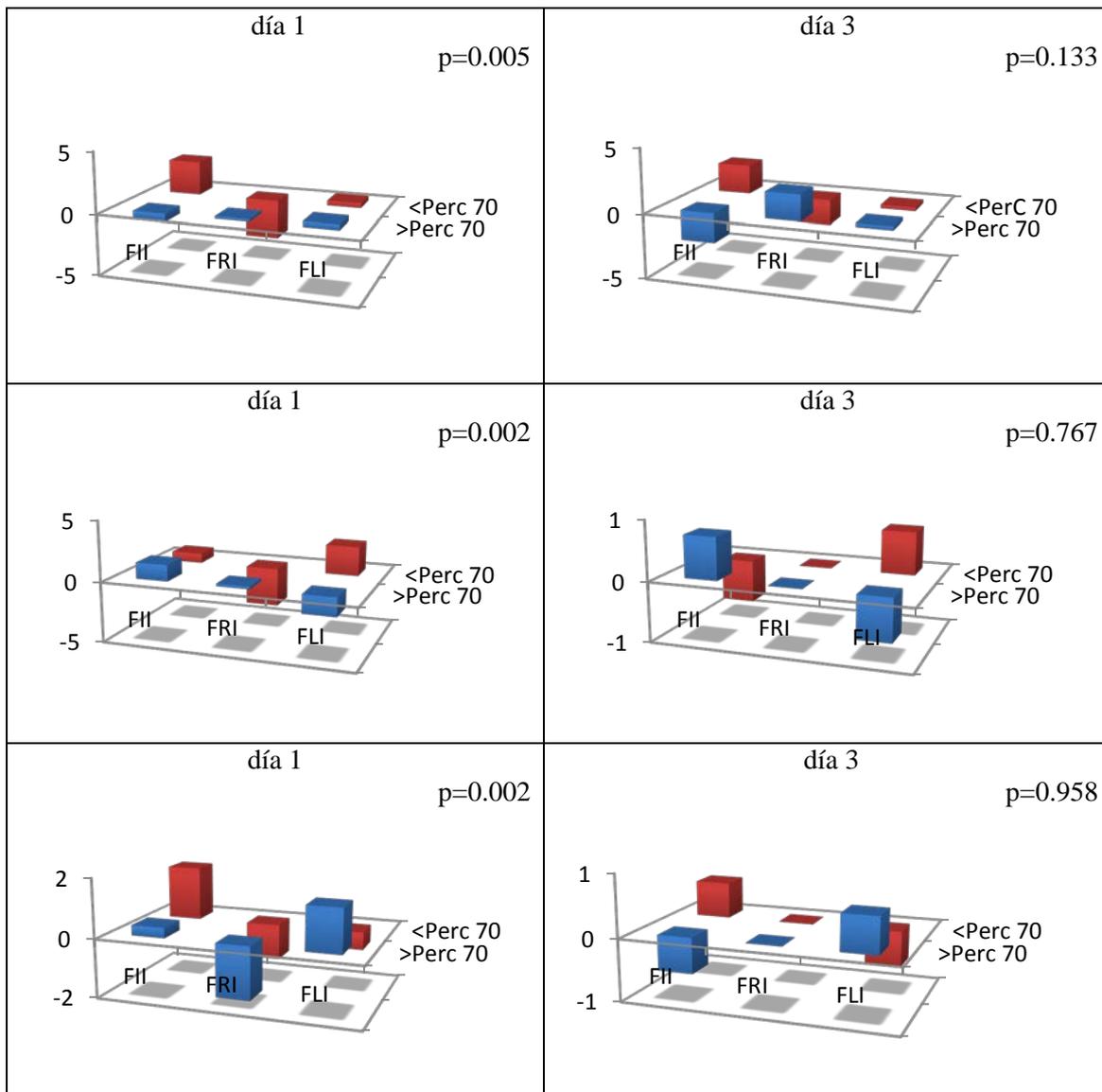


Gráfico 10b. Relación entre la diferencia de frecuencias encontradas/esperadas en el percentil 70 de marcadores de daño en el día 1 y 3 postrasplante y la función inicial del injerto.

2.6 ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES AGRUPANDO A LOS PACIENTES RECEPTORES DEL INJERTO RENAL SEGÚN DIFERENTES PARÁMETROS

2.6.1 Análisis según el filtrado glomerular del donante

Se dividió a los donantes (n=37) según que el FG fuera mayor o menor de 60 mL/min/1.73m². En el 81% de los casos (n=30) la función glomerular fue >60mL/min/1.73 m² y <60mL/min/1.73 m² en el 19% de los casos (n=7).

En la tabla 19a se muestran las características de los donantes de dichos injertos. Se trata de grupos homogéneos, excepto como cabía esperar por el valor de la Crs, más elevada en el grupo con función glomerular $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ($p<0.001$).

Variable estudiada en donante	FG $>60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ N(%)	FG $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ N(%)	p
Edad	63.3 (13)**	54 (28)**	0.064
Causa de muerte (trauma /otra)	6 (15) / 35 (85)	3 (23) / 10 (77)	0.477
HTA (No/Si)	30 (73) / 11 (27)	9 (69) / 4 (31)	0.782
DM (No/Si)	37 (90) / 4 (10)	11 (85) / 2 (15)	0.574
Crs (mg/dL) ^{&}	0.7 (0.3)**	1.5 (0.8)**	0.000
Score biopsia	1 (2)**	2.5 (4.8)**	0.205

*Tabla 19a. Características del donante estudiadas en los grupos de receptores en relación al filtrado glomerular del donante $>$ o $<$ de 60 ($n=37$). Los datos se representan como *media \pm DS y **mediana (RIC). Diferencias significativas entre grupos ($p<0.05$) HTA: Hipertensión arterial. DM: Diabetes mellitus.*

En la tabla 19b se muestran las características de los receptores de injerto renal ($n=54$) agrupados según que el FG donante haya sido $>$ ó $<$ de $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Se comprobó mejor función inmediata en el grupo de receptores que recibieron el injerto de un donante con FG $> 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, ($p=0.038$). En cuanto al resto de las características analizadas del receptor ambos grupos resultaron homogéneos.

Variable estudiada en el receptor	FG>60mL/min/1.73m ² en donante N(%)	FG<60mL/min/1.73m ² en donante N(%)	p
Casos	41 (76)	13 (24)	-
Edad (años)	55.4±12.8*	54.6±11.3*	0.686
Isquemia fría (h) ^{&}	17.7±8.3*	14.8±7.4*	0.109
Trasplante (Primero/Sucesivos)	20 (49) / 21 (51)	8 (62) / 5 (38)*	0.422
LE(años) ^{&}	2.3 (8.6)**	1.1(7.4)**	0.863
Diálisis (años) ^{&}	3.9 (14.8)**	1.1 (8.3)**	0.275
PRA (<45% / >45%)	29 (71) / 12 (29)*	12 (92) / 1 (8)*	0.113
Total Incompatibilidades (≤ 2 / >2)	5 (12) / 36 (88)*	0 (0) / 13 (100)*	0.186
Enf. de base (GN/otras)	13 (32) / 28 (68)	5 (38) / 8 (62)	0.653
Nivel tacrólimus día 1 (ng/mL)	14.4 (14.3)**	14.3 (12.3)**	0.708
Riesgo FRI	25.8±12.3*	34.0±18.4*	0.191
ΔCrs (24h-48h)100/24h ^{&}	7.9±26.0*	3.2±17.1*	0.772
ΔCrs (24h-7 días)100/24h ^{&}	40.9±32.7*	27.5±40.9*	0.260
ΔCrs (24h-1Mes)100/24h	66.2±18.6*	65.5±17.1*	0.909
ΔCrs (24h-3Mes)100/24h ^{&}	64.9±18.3*	64.4±18.9*	0.918
ΔCrs (24h-12Mes)100/24h ^{&}	68.2±20.9*	67.6±14.5*	0.664
Buena función inmediata (si/no) ^{&}	23 (56) / 18 (44)	3 (23) / 10 (77)	0.038
Buena función al año (si/no)	36 (88) vs 5 (12)*	13 (100) vs 0 (0)*	0.186

Tabla 19b. Características del receptor (n=54) según el FG del donante. Datos expresados como *media±DS y **mediana (RIC). Diferencias significativas (p<0.05). LE: Lista de espera. PRA: porcentaje de anticuerpos.

2.6.2 Análisis según la evolución inicial del injerto

El análisis de la Crs el quinto día junto con la necesidad de diálisis en la primera semana permitió clasificar inicialmente a los receptores según una buena o mala función inmediata del injerto.

La tabla 20a muestra las variables estudiadas en los donantes del injerto renal para ambos grupos de receptores. El grupo de pacientes con mejor función inicial recibieron injertos procedentes de donantes con FG >60 mL/min/1.73m² en el 88% de los casos, mientras que en el grupo de receptores con peor función inicial del injerto el 64% de los donantes presentaban FG >60 mL/min/1.73m² resultando estas diferencias

significativas con una $p=0.038$. En cuanto al resto de las características analizadas en los donantes (edad, causa de muerte por trauma o no, presencia de comorbilidades previas como HTA o DM) no se encontraron diferencias entre ambos grupos de receptores con mejor o peor función inicial del injerto.

Variable estudiada en donante	Buena función inmediata en receptor N(%)	Mala función inmediata en receptor N(%)	p
Edad	61.5 (17.5)**	62.5 (21.3)**	0.952
Causa de muerte (trauma /otra)	5 (19) / 21 (81)	4 (14) / 24 (86)	0.600
HTA (No/Si)	17 (65) / 9 (35)	22 (79) / 6 (21)	0.300
DM (No/Si)	23 (88) / 3 (11)	25 (89) / 3 (11)	0.900
Crs (mg/dL)	0.9 (0.3)**	0.8 (0.7)**	0.788
Score biopsia	1 (1.7)**	1 (4.5)**	0.652
FG (>60mL/min/1.73 m ² / <60mL/min/1.73 m ²) ^{&}	23 (88) / 3 (12)	18 (64) / 10 (36)	0.038

*Tabla 20a. Características del donante estudiadas en los grupos de receptores con buena y mala función inmediata (n=37). Los datos se representan como *media±DS y **mediana (RIC). Diferencias significativas entre grupos (p<0.05). HTA Hipertensión arterial. DM: Diabetes mellitus.*

La tabla 20b presenta la distribución de las variables estudiadas en el grupo de receptores (n=54) y comparadas según el criterio de buena función inicial o no.

Como se puede observar, al menor tiempo de isquemia fría 14.5 ± 8.8 vs 19.3 ± 6.8 en horas, $p=0.036$ aparece mejor función inicial del injerto renal, estos datos contrastan con el tiempo en lista de espera 4.2 (15.1) vs 0.8 (3.4) en años, $p=0.032$ y de diálisis 7.9 (16.3) vs 1.9 (7.4) en años, $p=0.032$, o el que se trate de trasplantes sucesivos 16 (62%) vs 10 (36%), $p=0.058$, que no influyen negativamente para una buena función inmediata del injerto. También encontramos, un mayor porcentaje de descenso de la Crs en las primeras 48h (21.4 ± 20.6 vs -7.2 ± 18.3) y en la primera semana (60.7 ± 14.9 vs 15.5 ± 34.5) postrasplante ($p<0.001$ en ambos casos) en el grupo de receptores con buena función inicial del injerto. Además, al año encontramos buena función del injerto en el 100% de los pacientes con buena función inicial, y sólo en el 82% de los pacientes con peor función inicial del injerto ($p=0.024$).

Variable estudiada en el receptor	Buena función inmediata N(%)	Mala función inmediata N(%)	p
Casos	26 (48)	28 (52)	-
Edad (años)	56.4±12.4*	54.1±12.5*	0.467
Isquemia fría (h) ^{&}	14.5±8.8*	19.3±6.8*	0.036
Trasplante (Primero/Sucesivos)	10 (38) / 16 (62)*	18 (64) / 10 (36)*	0.058
LE(años) ^{&}	4.2 (15.1)**	0.8(3.4)**	0.032
Diálisis (años)	7.9 (16.3)**	1.9 (7.4)**	0.054
PRA (<45% / >45%)	19 (73) / 7 (27)*	22 (79) / 6 (21)*	0.637
Total Incompatibilidades ≤ 2 / >2	4 (15) / 22 (85)*	1 (4) / 27 (96)*	0.135
Enf. de base (GN/otras)	11 (42) / 15 (58)	7 (25) / 21 (75)	0.200
Nivel tacrólimus día 1 (ng/mL)	12.1 (12.7)**	16 (15.5)**	0.294
Riesgo FRI	23.9±11.5*	31.4±15.7*	0.127
ΔCrs (24h-48h)100/24h ^{&}	21.4±20.6*	-7.2±18.3*	0.000
ΔCrs (24h-7 días)100/24h ^{&}	60.7±14.9*	15.5±34.5*	0.000
ΔCrs (24h-1Mes)100/24h	64.4±14.8*	67.6±20.9*	0.162
ΔCrs (24h-3Mes)100/24h ^{&}	59.2±20.4*	70.2±14.3*	0.030
ΔCrs (24h-12Mes)100/24h ^{&}	59.1±20.2*	76.3±14.0*	0.001
Buena función al año (si/no) ^{&}	26 (100) / 0 (0)	23 (82) / 5 (18)	0.024

Tabla 20b. Características del receptor estudiadas en los grupos con buena y mala función inmediata (n=54). Los datos se representan como *media±DS y **mediana (RIC). Diferencias significativas entre grupos (p<0.05). LE: Lista de espera. PRA: porcentaje de anticuerpos.

2.6.3 Análisis según la evolución al año del injerto

La tabla 21a muestra las variables de los donantes estudiadas según la función al año en dos grupos de receptores definidos por el criterio del valor de Crs al año superior a 3 mg/dL junto con la pérdida del injerto o exitus del paciente, con la comparativa entre ambos. A diferencia de la función inmediata no aparecen diferencias significativas entre las variables comparadas en los grupos en los que se estudió la función al año. De igual manera que se observaba precozmente, la función renal a largo plazo en el receptor no aparece que esté influida por la presencia de comorbilidades en el donante. Sin embargo, en este caso aparece peor función a largo plazo en aquellos receptores cuyo donante era de mayor edad (p=0.028).

Variable estudiada en donante	Buena función al año en receptor N(%)	Mala función al año en receptor N(%)	p
Edad &	62.0 (20)*	70.0(9)*	0.028
Causa de muerte (trauma /otra)	9 (18) / 40 (82)	0 (0) / 5 (100)	0.294
HTA (No/Si)	36 (74) / 13 (26)	3 (60)vs 2 (40)	0.522
DM (No/Si)	43 (88) / 6 (12)	5 (100) vs 0 (0)	0.407
Crs (mg/dL)	0.9 (0.5)*	0.7 (0.4)*	0.117
Score biopsia	1 (3)*	0 (21.6)*	0.062
FG (>60mL/min/1.73 m ² / <60mL/min/1.73 m ²)	36 (74) vs 13 (26)	5 (100) / 0 (0)	0.186

Tabla 21a. Características del donante estudiadas en los grupos de receptores con buena y mala función a largo plazo (n=37). Los datos se representan como *media±DS y **mediana (RIC). HTA Hipertensión arterial. DM: Diabetes mellitus.

Al final del estudio, en 49 receptores (90.7%) el injerto permanecía funcionando y con valores de Crs inferiores a 3 mg/dL, mientras que en los otros 5 casos (9.3%) se produjo la pérdida del injerto en 4 casos y mala función por valores de Crs>3 mg/dL en 1 caso. De los casos que perdieron el injerto, 2 (5.6% del total de receptores/60% de los no funcionantes) fallecieron antes del primer año postrasplante. Durante el primer año postrasplante se registraron 15 casos de RA (51.7% del total de receptores) confirmado por biopsia, 1 de NTA (3.4%) y 1 de toxicidad (3.4%).

El análisis comparativo de diferentes variables en ambos grupos de receptores según la clasificación de buena o mala función del injerto a largo plazo (año postrasplante), mostró que los que tienen mejor función al año habían presentado mejor función inicial en el 53% de los casos (p=0.024) y porcentajes de descenso de Crs más acusados. El resto de las características de los receptores fueron similares en ambos grupos (tabla 21b).

Variable estudiada	Buena función al año N(%)	Mala función al año N(%)	p
Casos	49 (91)	5 (9)	-
Edad (años)	55.0±12.1*	57.4±16.6*	0.644
Isquemia fría (h)	16.7±7.9*	19.8±10.7*	0.209
Trasplante (Primero/Sucesivos)	25 (51) / 24 (49)	3 (60) / 2 (40)	0.702
LE(años)	2.3 (8.2)**	0.2(1.9)**	0.062
Diálisis (años)	3.8 (13.2)**	2.3(12.7)**	0.917
PRA (<45% / >45%)	37 (76) / 12 (24)	4 (80) / 1 (20)	0.823
Total Incompatibilidades(≤ 2 / >2)	5 (10) / 44 (90)	0 (0) / 5 (100)	0.453
Enf. de base (GN/otras)	18 (37) / 31 (63)	0 (0) / 5 (100)	0.097
Nivel tacrólimus día 1 (ng/mL)	14.3 (13.5)**	14.7(17.8)**	0.570
Riesgo FRI	27.5±14.6*	30.4±11.5*	0.581
ΔCrs (24h-48h)100/24h ^{&}	8.9±23.3*	-18.7±19.8*	0.034
ΔCrs (24h-7 días)100/24h	39.3±35.3*	16.9±24.7*	0.099
ΔCrs (24h-1Mes)100/24h ^{&}	68.3±14.4*	38.5±35.6*	0.042
ΔCrs (24h-3Mes)100/24h ^{&}	66.3±17.7*	45.7±15.6*	0.026
ΔCrs (24h-12 Mes)100/24h	66.8±17.8*	83.7±32.6*	0.074
Buena función inicial (si/no) ^{&}	26 (53) / 23 (47)	0 (0) / 5 (100)	0.024

Tabla 21b. Características del receptor estudiadas en los grupos con buena y mala función a largo plazo (n=54). Los datos se representan como *media±DS y **mediana (RIC). Diferencias significativas entre grupos (p<0.05). LE: lista de espera. PRA: porcentaje de anticuerpos.

2.7 ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE EN RELACIÓN A LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO

2.7.1. Evolución inicial del injerto

Mediante regresión logística univariante se estudió qué variables pueden predecir la buena o mala evolución inicial del injerto encontrando diferencias significativas en la isquemia fría (p=0.038), el tiempo en lista de espera (p=0.012), el tiempo en diálisis (p=0.018), el FG del donante (categorizado como > ó < 60 mL/min/1.73 m²) (p=0.047), el ΔCrs a las 48 h del trasplante o a la semana (p<0.001 en ambos casos).

Las siguientes variables se acercaron a la significación: primer trasplante vs sucesivo (p=0.061) y riesgo de función retrasada (p=0.061).

Se realizó un análisis multivariante para estudiar qué variables pueden influir de forma independiente en la buena o mala evolución inicial del injerto encontrando que las variables isquemia fría, tiempo en lista de espera y FG del donante (categorizado como $> \text{ó} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) tienen significación independiente (Tabla 22).

	VARIABLES	p	HR
Paso 1 ^a	Isquemia Fria (horas)	0.009	1.125
	Tiempo en LE (años)	0.017	0.843
	FG Donante	0.032	6.466
	Constante	0.079	0.200

Tabla 22. Modelo de análisis multivariante 1, según evolución inicial del injerto. LE: Lista de espera; FG: Filtrado glomerular (referencia para FG $>60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$).

Un modelo que incluya las variables isquemia fría, tiempo en lista de espera, FG del donante y ΔCrS a las 48h nos deja como variable predictiva de buena o mala función inicial el ΔCrS en las primeras 48h ($p=0.018$) (Tabla 23).

	VARIABLES	p	HR
Paso 4 ^a	$\Delta \text{ Crs 48h}^*$	0.018	0.913
	Constante	0.153	3.855

Tabla 23. Modelo de análisis multivariante 2, según evolución inicial del injerto. Variables introducidas en el paso 1: Isquemia Fría, Años en lista de espera, Filtrado glomerular del donante, $\Delta \text{ Crs 48h}$. * $\Delta \text{ Crs 48h}$ = porcentaje de descenso de creatinina a las 48 h del trasplante.

Se estudiaron varios modelos incluyendo distintas variables sin obtener ninguna otra variable independiente con significación estadística robusta.

2.7.2 Evolución del injerto al año del trasplante

Mediante regresión logística univariante se estudiaron las variables que pueden predecir la buena o mala función del injerto al año del trasplante, encontrando como significativas el Δ Cr_s en las primeras 48 horas ($p= 0.043$), Δ Cr_s al mes ($p= 0.037$), Δ Cr_s al tercer mes ($p=0.050$). Ninguna de las otras variables (isquemia fría, tiempo en lista de espera, tiempo en diálisis, niveles máximos de anticuerpos, FG del donante) resultaron mediante este análisis significativamente predictivos de la buena o mala función del injerto al año.

Se realizaron diferentes modelos de análisis multivariante con combinaciones de variables sin obtenerse ninguna variable predictora independiente con robustez estadística suficiente.

Se presenta un estudio en dos fases. En la primera fase se ha realizado, un modelo experimental de predisposición a sufrir AKI que simulara la posible sensibilización del donante en el contexto del trasplante. Al mismo tiempo, se ha realizado un estudio clínico sobre 54 trasplantes sucesivos, en los que aparte del seguimiento y tratamiento rutinario para estos casos, se han determinado en orina de manera seriada los biomarcadores de predisposición y los biomarcadores de daño tubular temprano, para tratar de buscar la relación de éstos de manera precoz con la evolución ulterior del injerto.

La predisposición a sufrir AKI, puede ser calificada como un “riesgo oculto” ya que el daño renal que conlleva no es detectado por las pruebas bioquímicas, funcionales o histológicas habituales en la clínica. En los últimos años nuestro grupo de investigación en Salamanca ha desarrollado modelos experimentales de predisposición en los cuales ha demostrado que diferentes fármacos y tóxicos renales, incluso en dosis completamente subtóxicas, son capaces de inducir una predisposición o sensibilización a sufrir AKI. En estos modelos, se administra o expone a los animales de experimentación a un nefrotóxico a dosis subtóxicas que no generan daño renal; posteriormente, los animales son expuestos a un segundo evento (administración o exposición a un nefrotóxico a dosis subnefrotóxicas) que aisladamente no constituiría lesión renal, pero que sin embargo, desencadenan AKI. Por tanto, con la primera exposición se predispone y con la segunda se desencadena el daño. Asociados a esta condición hemos identificado marcadores urinarios que denominamos “marcadores de predisposición”, los cuales son capaces de detectar el riesgo de sufrir AKI antes de que éste se produzca, es decir, una vez que ha habido exposición o tratamiento con agentes nefrotóxicos a dosis que no producen daño renal medido por las técnicas convencionales^(148-150;166).

La extrapolación de esta situación a la clínica es que individuos aparentemente no afectados por los efectos adversos de un tratamiento, podrían estar expuestos a desarrollar un AKI en aquellas circunstancias que conlleven un segundo evento potencialmente nefrotóxico. En el contexto del trasplante, la posible predisposición del donante pudiera conllevar un AKI en el receptor cuando éste es sometido a los distintos procesos del trasplante que son potencialmente perjudiciales para el riñón, como la I/R o el tratamiento con inmunosupresores.

En este estudio se planteó primeramente probar si uno de los factores potencialmente nefrotóxicos asociados al trasplante como es el tratamiento con anticalcineurínicos pudiera desencadenar AKI cuando hay una predisposición previa. Para ello se planteó un modelo experimental ya establecido en nuestro laboratorio, el cual utiliza como nefrotóxico de predisposición la gentamicina y en el cual se han identificado marcadores específicos de esta condición.

Los resultados obtenidos, por una parte confirman, según estudios anteriores^(148;166), que la gentamicina predispone a AKI cuando se administra un segundo nefrotóxico y por otra, demuestran, como parte de nuestros objetivos, que la CsA es capaz de actuar cómo fármaco desencadenante del AKI.

En nuestro modelo, las administraciones tanto de gentamicina, como de CsA por separado no produjeron alteraciones en los valores de Crs, urea y proteinuria, así como del CCr, que se mantuvo en valores fisiológicos normales e iguales a los del grupo C. La determinación de estos parámetros en el grupo al que se administró gentamicina y posteriormente CsA evidenció un claro FRA que se acompañó con una pérdida de peso posiblemente debido al deterioro en su estado de salud.

Cabe destacar, que a pesar de que se administró la gentamicina con una posología teóricamente subtóxica, se observó una alteración en los niveles de Crs en el grupo tratado únicamente con gentamicina y aunque es estadísticamente significativa respecto al grupo C, no se considera de relevancia clínica, ya que es un incremento temporal que no se acompaña de la alteración de otros marcadores. La urea plasmática sigue en paralelo la evolución de la Crs. En cuanto al CCr, se observa que a partir del día 13 hay un aumento importante del aclaramiento en el grupo C que hace que en el día 16 encontremos diferencias significativas en todos los grupos respecto a éste. Se ha considerado que posiblemente se deba a algún artefacto experimental relacionado con la recogida del flujo urinario y se ha descartado que sea un dato relevante funcionalmente.

La proteinuria es también un índice de daño renal. Puede deberse tanto a un daño tubular que altere los mecanismos de reabsorción de las proteínas, como a una alteración en la barrera de filtración glomerular, que tenga como consecuencia un aumento de la permeabilidad de las proteínas, o también a una combinación de ambos mecanismos⁽¹⁶⁷⁾.

Como se observa en el gráfico 5, la excreción urinaria de proteínas presenta un aumento tanto en el grupo tratado sólo con gentamicina como en el tratado con los dos fármacos respecto al grupo C. Dicho aumento continúa hasta el día 9, donde se observa un pico a partir del cual comienza a disminuir; esta elevación no es estadísticamente significativa en el caso del grupo tratado sólo con gentamicina, mientras que sí lo es en el tratado con ambos fármacos. Dado que esta alteración se produce tanto en el grupo gentamicina como en el grupo tratado con gentamicina y CsA, debemos imputar dicha alteración a la gentamicina y no a la CsA. Esto es congruente con las acciones ampliamente conocidas de la gentamicina en las que como consecuencia del daño tubular se alteran los mecanismos de reabsorción tubular que producen proteinuria⁽¹⁶⁸⁾. En este modelo de daño subtóxico la proteinuria podría indicar cierta alteración tubular, ya que no se acompaña de una disminución del CCr.

Es destacable también la disminución de la proteinuria en el grupo CsA; estos resultados son coincidentes con otros estudios en los que también se ha observado disminución de la proteinuria por tratamiento con CsA, como el publicado por el grupo de Wasilewska et al⁽¹⁶⁹⁾ que propone que la disminución de la proteinuria unida al tratamiento con CsA podría deberse a la acción de éste fármaco sobre la sinaptopodina, una proteína de unión a actina expresada en los podocitos y activada por fosforilación. Se ha demostrado que la calcineurina provoca la desfosforilación y con ello la degradación de ésta proteína, dando lugar a proteinuria. En esta situación, la CsA provoca la estabilización del citoesqueleto, preservando la fosforilación de la sinaptopodina.

En general, nuestros resultados sugieren que se produjo un daño oculto desde el punto de vista funcional y morfológico, ya que los resultados histopatológicos son también coherentes con los hallazgos funcionales. Dicha condición predispone al daño renal y se manifiesta mediante la disminución del umbral de toxicidad de un segundo nefrotóxico (CsA). Esta predisposición concreta (por gentamicina) puede ser detectada mediante la determinación de dos marcadores de predisposición, los cuales no han sido determinados en la fase preclínica puesto que ya estaban ampliamente ratificados en nuestro laboratorio y nuestro objetivo fue demostrar que el tratamiento con ciclosporina, como evento potencialmente nefrotóxico, podía desencadenar AKI.

En el contexto del trasplante no debemos olvidar por una parte, la heterogeneidad de los donantes y el desconocimiento de los factores de predisposición a los que han podido estar expuestos a lo largo de su vida y por otra, que existen múltiples factores que podrían desencadenar daño en el riñón trasplantado, como el proceso de I/R, inherente al trasplante, o la administración de otros agentes nefrotóxicos (antibióticos aminoglucósidos, contrastes iodados...). Por este motivo, la posibilidad de detectar la predisposición mediante marcadores se realizó con una batería de los mismos, identificados en trabajos anteriores de nuestro laboratorio^(148;149;166).

En la fase clínica de este estudio analizamos de manera prospectiva la evolución del injerto desde la fase de donante en una cohorte de pacientes consecutivos con IRCT a los que se realiza un trasplante renal, en un periodo comprendido entre 26 de mayo del 2013 al 1 de septiembre del 2014, seguidos todos ellos tras el trasplante hasta completar un año de evolución. Al no haber relación precedente a usar biomarcadores de predisposición, inicialmente el tamaño muestral se condicionó al reclutamiento abierto de los sujetos trasplantados en un único centro, el HUMV, con una previsión de 49 pacientes teniendo en cuenta el promedio anual de trasplantes de los últimos 5 años. En todo lo relacionado con las variables estudiadas se tuvo en cuenta la donación doble, considerando el donante en este caso duplicado para cada uno de los dos receptores.

Las características de los donantes de cadáver respecto a su distribución no difieren del de otros centros y registros. El porcentaje de DCE fue de 56.7%, porcentaje similar al encontrado en otros grupos⁽²²⁾. La cifra máxima de Crs de un donante fue de 3.8 mg/dL. En este sentido, hoy día existe bastante evidencia de que, a pesar de mayor incidencia de FRI, se demuestra una aceptable evolución de la función del injerto a largo plazo a pesar de usar riñones de donantes que desarrollan AKI⁽¹⁷⁰⁻¹⁷²⁾.

Respecto a la CyC, se está empezando a utilizar para valorar la función renal del donante y la evolución posterior de la función del injerto. En nuestro caso, la CyC presentó más oscilaciones que la Crs hasta el tercer mes, lo que dificultaría su interpretación y por tanto las decisiones terapéuticas. En este sentido la valoración de la función renal del donante según la CyC es poco utilizada hoy día y su significado con respecto a la evolución inmediata y a largo plazo no está bien estudiada. Nuestro grupo

ha liderado recientemente un consenso sobre la medida del FG en el trasplante, incluyendo el uso de la CyC y las fórmulas usadas para estimar el FG⁽⁹⁰⁾.

Respecto a la realización de la biopsia del riñón de donante, se realizó en 25 injertos procedentes de donantes cadáver, siendo su score menor de 2 en el 64% de los casos. El uso de criterios histológicos para evaluar la viabilidad del órgano está muy analizado, si bien el análisis del score en relación con la evolución a largo plazo da lugar a múltiples resultados; así una revisión de El-Husseini⁽¹⁷³⁾ de 16 estudios con 8,122 trasplantes, concluye que la influencia de la AT/FI, glomeruloesclerosis y cambios vasculares sobre la función del injerto a largo plazo varía de un estudio a otro. Otra revisión sistemática de Wang⁽¹⁷⁴⁾ indica que los múltiples estudios realizados no son concluyentes y no se puede sacar una conclusión definitiva. En nuestro caso, la evolución de la función del injerto medida por Crs es similar al mes para todos los rangos del score, aunque en el caso de la CyC, ésta parece discernir una peor evolución del paciente con score de 7.

En cuanto a los receptores, se trata de una población con un alto porcentaje de retrasplantes, un 48.2% y con un 25% de ellos hiperinmunizados. La isquemia fría media fue de 17h, con un máximo de 25h, lo que supone un riesgo elevado de disfunción del injerto.

El uso de los biomarcadores de predisposición a AKI es la primera vez que se realiza en la valoración de la situación del órgano en el propio donante antes y en el receptor después de la extracción.

Lo primero que llama la atención son los niveles basales de los biomarcadores en el donante que, tanto los de predisposición como los de daño renal temprano, están en valores bajos respecto a los valores en el primer día postrasplante, siguiendo todos una evolución similar y disminuyendo claramente al tercer día. Esto indica la sensibilidad de los marcadores ante el insulto de la I/R, pero no la especificidad de los biomarcadores de predisposición, ya que el patrón basal, al primer día y al tercer día postrasplante es superponible. En el caso de los biomarcadores precoces de daño renal son escasos los trabajos en los que han sido comparados desde la fase donante^(175;176) y son más numerosos los analizados en el receptor postrasplante⁽¹⁷⁷⁻¹⁸³⁾. En nuestro estudio, la evolución de estos biomarcadores, desde la fase donante y al día 1 y 3

postrasplante es superponible a la evolución de los biomarcadores de predisposición (datos no mostrados).

En cuanto a la relación encontrada entre los biomarcadores del donante y los valores de Crs en receptor, hay que tener en cuenta que el grupo de receptores de donante vivo lo constituyen sólo 5 sujetos, con lo que las conclusiones en este grupo deben considerarse con todo tipo de cautela.

Los valores de los biomarcadores en el donante y la posterior elevación de sus valores en el primer día es de suponer que en el caso del riñón del donante cadáver, los insultos derivados del proceso de mantenimiento en la UCI, los fenómenos acaecidos tras la muerte cerebral, el daño de la I/R y la isquemia fría, hace que los fenómenos de predisposición puedan quedar superados por el intenso daño múltiple consecuencia de la I/R, con la activación de múltiples vías de inflamación y activación de la respuesta inmune⁽⁸⁴⁾. Dicho de otro modo, la posible predisposición al daño renal en el donante, reflejado en unos valores determinados de estos biomarcadores, se vería sobrepasada por el daño derivado de la I/R de una manera generalizada y de enorme capacidad lesional. Tampoco podemos estimar valores de corte como para poder discernir por encima de cuales pudiera considerarse realmente la existencia de una predisposición a daño más profundo en el postrasplante inmediato, que derivara en función no adecuada del injerto.

Analicemos los resultados de otros investigadores con biomarcadores precoces de daño tubular, si bien no existen en la literatura estudios con biomarcadores de predisposición y los estudios con biomarcadores precoces de daño tubular son variados en cuanto a su metodología. Existen algunos trabajos recientes sobre el análisis del biomarcador en el donante o peritrasplante. Isaac E. Hall ⁽¹⁸⁴⁾, en otro estudio, sin analizar biomarcadores, concluye que aunque la presencia de AKI en el donante se asocia con FRI, la evolución de la función del injerto a los 6 meses no difiere con respecto a los donantes sin AKI y posteriores estudios han corroborado estos hechos de buena evolución utilizando donantes con AKI establecido. Un interesante trabajo de Hoogland⁽¹⁷⁹⁾ analiza la seguridad de predicción de los biomarcadores α -GST, LDH, FABP, hierro activo e IL-18 entre otros a la hora de predecir la viabilidad de los injertos. Bhangoo⁽¹⁸³⁾ realiza una buena revisión sistemática sobre el análisis de

biomarcadores en dos medios, el líquido de la máquina de perfusión y de la orina del donante, y analiza las posibles asociaciones, lo que abriría un nuevo campo de estudio a la hora de determinar la validez o no del órgano.

Dada la inexistencia de referencias bibliográficas para los valores que se pudieran considerar de referencia para indicar daño tubular y tampoco para discernir la evolución inicial del injerto, dividimos los valores de los biomarcadores en el donante y en el receptor en los días 1 y 3 postrasplante en dos grupos según su percentil 70. El uso del percentil 70 fue debido a que consideramos que la *n* de nuestro estudio es relativamente pequeña para realizar un análisis de frecuencias y así, al hacer el corte de los valores del biomarcador en el 70 percentil en lugar del 75, como plantean la mayoría de los estudios, se consigue tener un mayor número de datos en el grupo de valores altos de biomarcador. Según este criterio analizamos el comportamiento de los biomarcadores estudiando, mediante un análisis de frecuencias, el número de casos según distintos grados de función renal inicial en los dos grupos. Para ello dividimos a los pacientes según la función inicial del injerto fuera buena (FII), lenta (FLI) o diferida (FRI) según los criterios establecidos en la introducción y basados en modelo analizado previamente por nuestro grupo⁽⁵⁸⁾. Se comparó la frecuencia analizada según la diferencia entre valores observados/esperados en los dos grupos separados por los valores del percentil 70 del biomarcador.

Como vemos, salvo en un caso, todas las diferencias de frecuencias encontradas en el día 1 pierden el valor significativo en el día tres postrasplante, por lo que a la hora de predecir el tipo de FII, con sus limitaciones, en nuestro caso sólo tienen valor los biomarcadores del primer día postrasplante. Dado el escaso número de casos, sobre todo en los grupos de FLI y FRI (24), no consideramos que el valor del punto de corte para cada biomarcador del día 1, pudiera ser utilizado como valor de referencia para indicar con certeza que por encima o por debajo de dicho valor definiera la evolución inicial del injerto.

Vamos a comentar ahora los resultados obtenidos cuando se formaron dos grupos de pacientes según distintos criterios. En cuanto al FG del donante, se dividieron a éstos según su FG fuera $> \text{ó} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Según este criterio, los donantes eran grupos homogéneos respecto a parámetros clínicos. Las características de los

receptores son similares en cuanto a la distribución de los órganos con FG disminuido o no. Los valores de los biomarcadores de predisposición y de daño precoz se reparten uniformemente, sin haber diferencias según esta agrupación de receptores (datos no mostrados).

Separando ahora los grupos de receptores según el criterio de mala evolución inicial, es decir, según la Crs del quinto día fuese ≥ 3 mg/dL, junto con el criterio de FRI permitió clasificar inicialmente a los receptores según una buena o mala función inmediata del injerto. Teniendo en cuenta las variables estudiadas en los donantes del injerto renal para ambos grupos de receptores, el grupo de pacientes con mejor función inicial recibieron con más frecuencia injertos procedentes de donantes con $FG > 60$ mL/min/1.73m²; en este caso, se puede decir que un $FG < 60$ mL/min/1.73 m², condiciona una peor evolución inicial del injerto. No se encontraron diferencias en el resto de las variables analizadas, incluidos los biomarcadores de predisposición y precoces de daño tubular analizados (datos no mostrados).

En el caso de las variables analizadas en los receptores divididos según buena o mala función inicial el menor tiempo de isquemia condiciona una mejor función inicial del injerto, con un mayor descenso de la Crs en las primeras 48 h, primera semana y al año postrasplante. Este hecho coincide con los resultados publicados por nuestro grupo⁽⁶³⁾. El análisis realizado en este caso uniendo la FLI y la FRI en el grupo de mala evolución inicial está basado en los resultados de un estudio de nuestro grupo⁽⁵⁸⁾, en el que demuestra que los pacientes que desarrollan FLI tienen una peor supervivencia del injerto, peor función renal y más RA al año que el grupo con FII.

Por último, se llevó a cabo un análisis univariante y tras ello multivariante para tratar de cuantificar el pronóstico mediante el HR, agrupando las variables en distintos conjuntos de 5 para adecuarlo al tamaño muestral. El análisis multivariante con los grupos según buena o mala función inicial del injerto confirma la significación estadística de isquemia fría, número de trasplantes, tiempo en LE, tiempo en diálisis, FG del donante < 60 mL/min/1.73 m², la diferencia de Crs del primer y segundo día, y la del primer día y el año.

Todos los modelos multivariantes confirmaron la independencia de las variables Isquemia Fría (h), tiempo en LE (años), FG Donante y diferencia de Crs del primer y segundo día postrasplante.

Se analizaron mediante regresión logística univariante las distintas variables según buena o mala función al año, encontrando como significativas la diferencia de Crs del primer y segundo día, al mes y al tercer mes. Ninguna de las otras variables resultaron significativas. Los diferentes modelos de análisis multivariante no obtuvieron variables predictoras independientes con robustez estadística suficiente.

Este estudio y sus resultados tienen una debilidad y es el tamaño muestral, lo que nos obliga a ser cautos en las conclusiones. Se precisan estudios con una población mayor y por tanto multicéntricos para obtener datos estadísticos más robustos. Por otro lado, se debe ampliar el panel de posibles biomarcadores, no sólo a nivel de sangre u orina, sino también en tejido renal, dado que, como plantea Halloran⁽¹⁸⁵⁾, tenemos un modelo perfecto de AKI en el trasplante y la posibilidad, mediante biopsia de riñones de donante y de receptor, ya sea de protocolo o por indicación clínica, de obtener muestras de tejido donde corroborar la relación de los distintos biomarcadores en las muestras de sangre o de orina y del tejido renal. Además, deberíamos ampliar nuestros estudios con la inclusión de proteómica y metabolómica como ya está haciéndose en diversos laboratorios de investigación⁽¹⁸⁶⁾.

1. La administración de CsA a dosis subtóxicas desencadena AKI en animales predisuestos, afectando tanto a la función como a la estructura renal.

2. Los niveles basales de los biomarcadores en el donante, siguen una evolución similar cuando se estudian en receptor a día 1 y 3, lo que indicaría la sensibilidad de los marcadores pero no la especificidad de cualquiera de ellos en particular.

3. En el donante, XXXX podría considerarse un candidato a tener en cuenta a la hora de predecir una peor función renal medida por Crs al menos hasta el primer mes postrasplante.

XXXX podría ser predictor de la recuperación de la función renal medida por Crs al menos hasta el primer mes postrasplante.

4. En el receptor en el primer día postrasplante, XXXX, XXXX y XXXX podrían ser útiles como biomarcadores de riesgo de FRI medido como Δ Crs a la semana.

5. En el tercer día postrasplante, XXXX, XXXX, XXXX y XXXX podrían relacionarse con la función diferida del injerto, medida tanto por el valor de Crs como por Δ Crs, a la semana.

6. En análisis de frecuencias no nos permite sacar conclusiones en cuanto a los marcadores de predisposición, dada la disparidad de comportamiento de los marcadores y la ausencia de referencias comparativas. Sólo en el caso de los marcadores de daño precoz, XXXX se puede relacionar con la función del injerto.

7. XXXX se asocia a una peor función renal en el donante.

8. En los receptores divididos según buena o mala función inicial, el menor tiempo de isquemia fría condiciona una mejor FII, con un mayor descenso de la Crs en las primeras 48h, primera semana y al año postrasplante. XXXX al tercer día mostró valores más bajos en el grupo con mejor función inicial.

9. Mediante análisis multivariante se determinó que la isquemia fría, número de trasplantes, tiempo en LE, tiempo en diálisis, FG del donante $<60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$, la diferencia de Crs del primer y segundo día, y la del primer día y el año son factores de riesgo independientes para una inadecuada evolución inicial del injerto.

10. Mediante regresión logística univariante la diferencia de Crs del primer y segundo día, al mes y al tercer mes son factores relacionados con la evolución del injerto al año.

- (1) KDIGO. Kidney Disease Improving Global Outcomes: KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Disease (international society of nephrology). *Kidney Int Suppl* 2012 Mar;2(1).
- (2) KDOQUI. *KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl 1):1-266.
- (3) USRDS . United States Renal Data System, 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2014.
- (4) Registro español de enfermos renales. Informe 2006 de diálisis y trasplante renal en España. *Nefrología* 2009;29:525-33.
- (5) Registro español de enfermos renales. Informe 2013. Sociedad Española de Nefrología 2015 Jun 12.
- (6) Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview
1. *Transpl Int* 2008 Jan;21(1):11-7.
- (7) Evans RW, Manninen DL, Garrison LP, Jr., Hart LG, Blagg CR, Gutman RA, et al. The quality of life of patients with end-stage renal disease
3. *N Engl J Med* 1985 Feb 28;312(9):553-9.
- (8) 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* 2001 Mar;12(3):589-97.
- (9) BC transplant, Providence healthcare, Vancouver Coastal health. Clinical Guidelines for Kidney Transplantation. [www.transplantbc.ca/sites/documents/files/Clinical Guidelines for Kidney Transplantation](http://www.transplantbc.ca/sites/documents/files/Clinical%20Guidelines%20for%20Kidney%20Transplantation%202015%20Feb.pdf) 2015 Feb.
- (10) Danovitch GM. Handbook of kidney transplantation. Lippincott Williams&Wilkins 2001.
- (11) Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review
3. *J Transplant* 2012;2012:193724.
- (12) Organización nacional de trasplante. Memoria de actividad ONT 2013: Memoria trasplante renal. website <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20trasplante%20renal%202013.pdf>) 2015 May 6.
- (13) Jena AB, Philipson TJ. Cost-effectiveness analysis and innovation
2. *J Health Econ* 2008 Sep;27(5):1224-36.
- (14) George B, Harris A, Mitchell A. Cost-effectiveness analysis and the consistency of decision making: evidence from pharmaceutical reimbursement in australia (1991 to 1996). *Pharmacoeconomics* 2001;19(11):1103-9.
- (15) Arrieta J. Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante) en España. *Nefrología* 2010;1(Supl Ext 1):37-47.
- (16) Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney

3. Am J Transplant 2014 Jan;14 Suppl 1:11-44.
- (17) Winkelmayr WC, Weinstein MC, Mittleman MA, Glynn RJ, Pliskin JS. Health economic evaluations: the special case of end-stage renal disease treatment. *Med Decis Making* 2002 Sep;22(5):417-30.
- (18) Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology
3. *Kidney Int* 1993 Aug;44(2):411-22.
- (19) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology
1. *Kidney Int* 1999 Feb;55(2):713-23.
- (20) 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
1. *Transplantation* 2000 Mar 27;69(6):1123-7.
- (21) Morales J, Andrés A, Pallardó L, Capdevila L, Campistol J, Gil Vernet JM, et al. Trasplante renal en pacientes de edad avanzada con un riñón de donante aioso. *Nefrología* 1998;18(Supl. 5):32-47.
- (22) 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
1. *Am J Transplant* 2002 Sep;2(8):701-11.
- (23) Delmonico FL, Burdick JF. Maximizing the success of transplantation with kidneys from older donors
1. *N Engl J Med* 2006 Jan 26;354(4):411-3.
- (24) Tan JC, Workeneh B, Busque S, Blouch K, Derby G, Myers BD. Glomerular function, structure, and number in renal allografts from older deceased donors
3. *J Am Soc Nephrol* 2009 Jan;20(1):181-8.
- (25) Cho YW. Expanded criteria donors. *Clin Transpl* 1998;421-36.
- (26) Savoye E, Tamarelle D, Chalem Y, Rebibou JM, Tuppin P. Survival benefits of kidney transplantation with expanded criteria deceased donors in patients aged 60 years and over
1. *Transplantation* 2007 Dec 27;84(12):1618-24.
- (27) Lodhi SA, Lamb KE, Uddin I, Meier-Kriesche HU. Pulsatile pump decreases risk of delayed graft function in kidneys donated after cardiac death
1. *Am J Transplant* 2012 Oct;12(10):2774-80.
- (28) Moers C, Pirenne J, Paul A, Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation
1. *N Engl J Med* 2012 Feb 23;366(8):770-1.
- (29) O'Callaghan JM, Knight SR, Morgan RD, Morris PJ. Preservation solutions for static cold storage of kidney allografts: a systematic review and meta-analysis
2. *Am J Transplant* 2012 Apr;12(4):896-906.
- (30) Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant
1. *Am J Transplant* 2011 Nov;11(11):2279-96.

- (31) Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O, Daly MC, Mooney S, Graybill CO, et al. The impact of meeting donor management goals on the development of delayed graft function in kidney transplant recipients
3. Am J Transplant 2013 Apr;13(4):993-1000.
- (32) Koning OH, Ploeg RJ, van Bockel JH, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group
1. Transplantation 1997 Jun 15;63(11):1620-8.
- (33) Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N. Delayed graft function in renal transplantation
2. Curr Opin Crit Care 2004 Dec;10(6):489-98.
- (34) Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation
1. LANCET 2004 Nov 13;364(9447):1814-27.
- (35) Schnuelle P, Gottmann U, Hoeger S, Boesebeck D, Lauchart W, Weiss C, et al. Effects of donor pretreatment with dopamine on graft function after kidney transplantation: a randomized controlled trial
1. JAMA 2009 Sep 9;302(10):1067-75.
- (36) Irish WD, Ilesley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A risk prediction model for delayed graft function in the current era of deceased donor renal transplantation
1. Am J Transplant 2010 Oct;10(10):2279-86.
- (37) Lopes JA, Moreso F, Riera L, Carrera M, Ibernón M, Fulladosa X, et al. Evaluation of pre-implantation kidney biopsies: comparison of Banff criteria to a morphometric approach
1. Kidney Int 2005 Apr;67(4):1595-600.
- (38) Gaber LW, Gaber AO, Tolley EA, Hathaway DK. Prediction by postrevascularization biopsies of cadaveric kidney allografts of rejection, graft loss, and preservation nephropathy
1. Transplantation 1992 Jun;53(6):1219-25.
- (39) Cosio FG, Grande JP, Larson TS, Gloor JM, Velosa JA, Textor SC, et al. Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation
1. Am J Transplant 2005 May;5(5):1130-6.
- (40) Whiting JF. Clinical and economic outcomes of the use of expanded criteria donors in renal transplantation
1. Semin Dial 2000 Sep;13(5):316-9.
- (41) Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation
1. Am J Transplant 2003;3 Suppl 4:114-25.
- (42) 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
1. Am J Kidney Dis 2000 Jul;36(1):153-9.
- (43) Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts

1. Transplantation 1995 Aug 27;60(4):334-9.
- (44) 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
1. Transplantation 2000 Apr 15;69(7):1352-7.
- (45) Ciccirelli J, Cho Y, Mateo R, El-Shahawy M, Iwaki Y, Selby R. Renal biopsy donor group: the influence of glomerulosclerosis on transplant outcomes
1. Transplant Proc 2005 Mar;37(2):712-3.
- (46) Howie AJ, Ferreira MA, Lipkin GW, Adu D. Measurement of chronic damage in the donor kidney and graft survival
1. Transplantation 2004 Apr 15;77(7):1058-65.
- (47) Chapman JR. Longitudinal analysis of chronic allograft nephropathy: clinicopathologic correlations
2. Kidney Int Suppl 2005 Dec;(99):S108-S112.
- (48) Seron D, Anaya F, Marcen R, Del Moral RG, Martul EV, Alarcon A, et al. [Guidelines for indicating, obtaining, processing and evaluating kidney biopsies]. Nefrologia 2008;28(4):385-96.
- (49) Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care 2004 Aug;8(4):R204-R212.
- (50) Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury
77. Crit Care 2007;11(2):R31.
- (51) Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review
1. Kidney Int 2008 Mar;73(5):538-46.
- (52) Waikar SS, Liu KD, Chertow GM. Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. Clin J Am Soc Nephrol 2008 May;3(3):844-61.
- (53) Nakamura M, Seki G, Iwadoh K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T, et al. Acute kidney injury as defined by the RIFLE criteria is a risk factor for kidney transplant graft failure
1. Clin Transplant 2012 Jul;26(4):520-8.
- (54) Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, et al. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience
6. Kidney Int 2004 Oct;66(4):1613-21.
- (55) Mehrotra A, Rose C, Pannu N, Gill J, Tonelli M, Gill JS. Incidence and consequences of acute kidney injury in kidney transplant recipients
1. Am J Kidney Dis 2012 Apr;59(4):558-65.
- (56) Humar A, Johnson EM, Payne WD, Wrenshall L, Sutherland DE, Najarian JS, et al. Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival
6. Clin Transplant 1997 Dec;11(6):623-7.
- (57) Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, Gillingham K, Payne WD, Matas AJ. Risk factors for slow graft function after kidney transplants: a multivariate analysis
5. Clin Transplant 2002 Dec;16(6):425-9.

- (58) Rodrigo E, Fernandez-Fresnedo G, Ruiz JC, Pinera C, Palomar R, Gonzalez-Cotorruelo J, et al. Similar impact of slow and delayed graft function on renal allograft outcome and function
4. *Transplant Proc* 2005 Apr;37(3):1431-2.
- (59) Premasathian N, Avihingsanon Y, Ingsathit A, Pongskul C, Jittiganont S, Sumethkul V. Risk factors and outcome of delayed graft function after cadaveric kidney transplantation: a report from the Thai Transplant Registry
1. *Transplant Proc* 2010 Dec;42(10):4017-20.
- (60) Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival
1. *Transplantation* 1997 Apr 15;63(7):968-74.
- (61) Rosenthal JT, Danovitch GM, Wilkinson A, Ettenger RB. The high cost of delayed graft function in cadaveric renal transplantation
1. *Transplantation* 1991 May;51(5):1115-8.
- (62) Yarlagaadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis
1. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Mar;24(3):1039-47.
- (63) Rodrigo E, Ruiz JC, Pinera C, Fernandez-Fresnedo G, Escallada R, Palomar R, et al. Creatinine reduction ratio on post-transplant day two as criterion in defining delayed graft function
5. *Am J Transplant* 2004 Jul;4(7):1163-9.
- (64) Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention
2. *Transplant Proc* 2008 Dec;40(10):3279-88.
- (65) Ploeg RJ, Vreugdenhil P, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Effect of pharmacologic agents on the function of the hypothermically preserved dog kidney during normothermic reperfusion
2. *Surgery* 1988 Jun;103(6):676-83.
- (66) Southard JH, Rice MJ, Ametani MS, Belzer FO. Effects of short-term hypothermic perfusion and cold storage on function of the isolated-perfused dog kidney
1. *Cryobiology* 1985 Apr;22(2):147-55.
- (67) Sugiyama S, Hanaki Y, Ogawa T, Hieda N, Taki K, Ozawa T. The effects of SUN 1165, a novel sodium channel blocker, on ischemia-induced mitochondrial dysfunction and leakage of lysosomal enzymes in canine hearts
1. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Dec 15;157(2):433-9.
- (68) Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney
2. *Am J Physiol* 1988 Feb;254(2 Pt 1):C330-C337.
- (69) Kato M, Kako KJ. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)glycine on ischemic-reperfused dog kidney in vivo and membrane preparation in vitro
1. *Mol Cell Biochem* 1987 Dec;78(2):151-9.
- (70) Roberts BN, Christini DJ. NHE inhibition does not improve Na⁽⁺⁾ or Ca⁽²⁺⁾ overload during reperfusion: using modeling to

- illuminate the mechanisms underlying a therapeutic failure
1. PLoS Comput Biol 2011 Oct;7(10):e1002241.
- (71) Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures
1. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011 Nov;301(5):H1723-H1741.
- (72) Inserte J, Hernando V, Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury
2. Cardiovasc Res 2012 Oct 1;96(1):23-31.
- (73) Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment
1. World J Transplant 2015 Jun 24;5(2):52-67.
- (74) Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload
1. Ann N Y Acad Sci 2010 Jul;1201:183-8.
- (75) Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death
1. Cardiovasc Res 2008 Jan 15;77(2):334-43.
- (76) American Journal of Physiology. <http://ajpheartphysiology.org/> 2015 Oct.
- (77) Denecke C, Tullius SG. Innate and adaptive immune responses subsequent to ischemia-reperfusion injury in the kidney
1. Prog Urol 2014 Jun;24 Suppl 1:S13-S19.
- (78) Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury
1. J Clin Invest 2011 Nov;121(11):4210-21.
- (79) Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury
1. BMC Med 2011;9:11.
- (80) Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease
1. Nat Rev Nephrol 2010 Jul;6(7):404-14.
- (81) Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection
3. Nat Med 2002 Jun;8(6):582-7.
- (82) Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
- (83) Rowart P, Ercicum P, Detry O, Weekers L, Gregoire C, Lechanteur C, et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Ischemia/Reperfusion Injury
1. J Immunol Res 2015;2015:602597.
- (84) Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation
16. Nephrol Dial Transplant 2014 Jun;29(6):1134-40.
- (85) Schroppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation
1. Kidney Int 2014 Aug;86(2):251-8.
- (86) Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft
1. Curr Opin Organ Transplant 2014 Aug;19(4):395-400.
- (87) Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from

- serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group
4. *Ann Intern Med* 1999 Mar;130(6):461-70.
 - (88) Herget-Rosenthal S, Bokenkamp A, Hofmann W. How to estimate GFR--serum creatinine, serum cystatin C or equations?
 6. *Clin Biochem* 2007 Feb;40(3-4):153-61.
 - (89) Levey AS, Stevens LA. Estimating GFR using the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions
 2. *Am J Kidney Dis* 2010 Apr;55(4):622-7.
 - (90) Rodrigo E, Serrano M, Albinos Z, Arias M. Medida de la función renal: validez de las fórmulas de estimación del filtrado glomerular en el trasplante renal. *Nefrología* 2015;1(Supl Ext 2):3-10.
 - (91) Martensson J, Martling CR, Bell M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability
 1. *Br J Anaesth* 2012 Dec;109(6):843-50.
 - (92) Nan-Ya K, Kajihara M, Kojima N, Degawa M. Usefulness of urinary kidney injury molecule-1 (Kim-1) as a biomarker for cisplatin-induced sub-chronic kidney injury
 1. *J Appl Toxicol* 2015 Feb;35(2):124-32.
 - (93) Pfaller W, Gstraunthaler G. Nephrotoxicity testing in vitro-- what we know and what we need to know
 3. *Environ Health Perspect* 1998 Apr;106 Suppl 2:559-69.
 - (94) Sharma A, Mucino MJ, Ronco C. Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury
 1. *Nephron Clin Pract* 2014;127(1-4):94-100.
 - (95) Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts
 1. *Clin Chem* 1992 Oct;38(10):1933-53.
 - (96) Solomon R, Segal A. Defining acute kidney injury: what is the most appropriate metric?
 1. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008 Apr;4(4):208-15.
 - (97) Sancho-Martinez SM, Vicente-Vicente L, Prieto-García L, Blanco-Gozalo V, Prieto M, Quiros Y, et al. New diagnostic challenges for a renewed concept of acute kidney injury: Towards an integral diagnostic system. *Tes* 2015.
 - (98) Bagshaw SM, Bellomo R. Early diagnosis of acute kidney injury
 50. *Curr Opin Crit Care* 2007 Dec;13(6):638-44.
 - (99) Perazella MA, Coca SG. Traditional urinary biomarkers in the assessment of hospital-acquired AKI
 3. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012 Jan;7(1):167-74.
 - (100) Espinel CH. The FENa test. Use in the differential diagnosis of acute renal failure
 1. *JAMA* 1976 Aug 9;236(6):579-81.
 - (101) Miller TR, Anderson RJ, Linas SL, Henrich WL, Berns AS, Gabow PA, et al. Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study
 24. *Ann Intern Med* 1978 Jul;89(1):47-50.
 - (102) Kaplan AA, Kohn OF. Fractional excretion of urea as a guide to renal dysfunction
 2. *Am J Nephrol* 1992;12(1-2):49-54.

- (103) Carvounis CP, Nisar S, Guro-Razuman S. Significance of the fractional excretion of urea in the differential diagnosis of acute renal failure
2. *Kidney Int* 2002 Dec;62(6):2223-9.
- (104) Bagshaw SM, Langenberg C, Bellomo R. Urinary biochemistry and microscopy in septic acute renal failure: a systematic review
1. *Am J Kidney Dis* 2006 Nov;48(5):695-705.
- (105) Marcussen N, Schumann J, Campbell P, Kjellstrand C. Cytodiagnostic urinalysis is very useful in the differential diagnosis of acute renal failure and can predict the severity
1. *Ren Fail* 1995 Nov;17(6):721-9.
- (106) Chesney PJ, Davis JP, Purdy WK, Wand PJ, Chesney RW. Clinical manifestations of toxic shock syndrome
12. *JAMA* 1981 Aug 14;246(7):741-8.
- (107) Diamond JR, Yoburn DC. Nonoliguric acute renal failure associated with a low fractional excretion of sodium
3. *Ann Intern Med* 1982 May;96(5):597-600.
- (108) Graber M, Lane B, Lamia R, Pastoriza-Munoz E. Bubble cells: renal tubular cells in the urinary sediment with characteristics of viability
1. *J Am Soc Nephrol* 1991 Jan;1(7):999-1004.
- (109) Richmond JM, Sibbald WJ, Linton AM, Linton AL. Patterns of urinary protein excretion in patients with sepsis
1. *Nephron* 1982;31(3):219-23.
- (110) Herget-Rosenthal S, Poppen D, Husing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis
1. *Clin Chem* 2004 Mar;50(3):552-8.
- (111) Thorevska N, Sabahi R, Upadya A, Manthous C, Amoateng-Adjepong Y. Microalbuminuria in critically ill medical patients: prevalence, predictors, and prognostic significance
1. *Crit Care Med* 2003 Apr;31(4):1075-81.
- (112) Jensen MB, Ejlersen E, Eliassen KR, Lokkegaard H. [Prognosis for patients admitted to intensive care units with acute renal failure requiring dialysis]. *Ugeskr Laeger* 1995 May 1;157(18):2564-9.
- (113) Endre ZH, Kellum JA, Di SS, Doi K, Goldstein SL, Koyner JL, et al. Differential diagnosis of AKI in clinical practice by functional and damage biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference
2. *Contrib Nephrol* 2013;182:30-44.
- (114) Ronco C, Kellum JA, Haase M. Subclinical AKI is still AKI. *Crit Care* 2012;16(3):313.
- (115) Ronco C, Stacul F, McCullough PA. Subclinical acute kidney injury (AKI) due to iodine-based contrast media
8. *Eur Radiol* 2013 Feb;23(2):319-23.
- (116) Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury
14. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:463-93.
- (117) Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis

- Quality Initiative consensus conference
1. *Kidney Int* 2014 Mar;85(3):513-21.
- (118) Katz R. Biomarkers and surrogate markers: an FDA perspective
26. *NeuroRx* 2004 Apr;1(2):189-95.
- (119) Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans
5. *Clin Transl Sci* 2008 Dec;1(3):200-8.
- (120) Chawla LS, Kellum JA. Acute kidney injury in 2011: Biomarkers are transforming our understanding of AKI
14. *Nat Rev Nephrol* 2012 Feb;8(2):68-70.
- (121) Vaidya VS, Bonventre JV. Mechanistic biomarkers for cytotoxic acute kidney injury
1. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006 Oct;2(5):697-713.
- (122) Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity
12. *Nat Biotechnol* 2010 May;28(5):436-40.
- (123) Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Canetta P, Forster C, Singer E, Sise M, et al. Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: a multicenter prospective cohort study
1. *J Am Coll Cardiol* 2012 Jan 17;59(3):246-55.
- (124) Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes
3. *Kidney Int* 2011 Aug;80(4):405-14.
- (125) Srisawat N, Wen X, Lee M, Kong L, Elder M, Carter M, et al. Urinary biomarkers and renal recovery in critically ill patients with renal support
1. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011 Aug;6(8):1815-23.
- (126) Endre ZH, Walker RJ, Pickering JW, Shaw GM, Frampton CM, Henderson SJ, et al. Early intervention with erythropoietin does not affect the outcome of acute kidney injury (the EARLYARF trial)
1. *Kidney Int* 2010 Jun;77(11):1020-30.
- (127) Mehta RL. Timed and targeted therapy for acute kidney injury: a glimpse of the future
1. *Kidney Int* 2010 Jun;77(11):947-9.
- (128) Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Aloisi C, Nicocia G, Frisina N, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Jan;23(1):414-6.
- (129) Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans JL, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates
1. *Transplantation* 2003 Sep 27;76(6):969-73.
- (130) Cooper JE, Wiseman AC. Acute kidney injury in kidney transplantation
3. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013 Nov;22(6):698-703.
- (131) Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury
14. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:463-93.

- (132) Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury
1. *Pediatr Nephrol* 2008 Dec;23(12):2151-7.
- (133) Waikar SS, Bonventre JV. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury
14. *Nephron Clin Pract* 2008;109(4):c192-c197.
- (134) Schiffl H, Lang SM. Update on biomarkers of acute kidney injury: moving closer to clinical impact?
2. *Mol Diagn Ther* 2012 Aug 1;16(4):199-207.
- (135) Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ, Devarajan P, Edelstein CL, Bonventre JV, et al. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function
3. *Kidney Int* 2011 May;79(10):1119-30.
- (136) Koyner JL, Bennett MR, Worcester EM, Ma Q, Raman J, Jeevanandam V, et al. Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery
5. *Kidney Int* 2008 Oct;74(8):1059-69.
- (137) Liangos O, Tighiouart H, Perianayagam MC, Kolyada A, Han WK, Wald R, et al. Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass
1. *Biomarkers* 2009 Sep;14(6):423-31.
- (138) Koyner JL, Vaidya VS, Bennett MR, Ma Q, Worcester E, Akhter SA, et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury
3. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010 Dec;5(12):2154-65.
- (139) Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Westhuyzen J, Shaw GM, Frampton CM, et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit
2. *Crit Care* 2010;14(3):R85.
- (140) Soto K, Coelho S, Rodrigues B, Martins H, Frade F, Lopes S, et al. Cystatin C as a marker of acute kidney injury in the emergency department
1. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010 Oct;5(10):1745-54.
- (141) Hall IE, Koyner JL, Doshi MD, Marcus RJ, Parikh CR. Urine cystatin C as a biomarker of proximal tubular function immediately after kidney transplantation
1. *Am J Nephrol* 2011;33(5):407-13.
- (142) Singer E, Marko L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Muller DN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications
1. *Acta Physiol (Oxf)* 2013 Apr;207(4):663-72.
- (143) Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury
7. *J Am Soc Nephrol* 2003 Oct;14(10):2534-43.
- (144) Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity
5. *Am J Nephrol* 2004 May;24(3):307-15.
- (145) Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel

- biomarker for human renal proximal tubule injury
1. *Kidney Int* 2002 Jul;62(1):237-44.
- (146) Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease
16. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008;241:89-94.
- (147) Mehran R, Nikolsky E. Contrast-induced nephropathy: definition, epidemiology, and patients at risk
21. *Kidney Int Suppl* 2006 Apr;(100):S11-S15.
- (148) Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martinez SM, Gonzalez-Buitrago JM, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein
2. *Kidney Int* 2010 Nov;78(10):1006-15.
- (149) Vicente-Vicente L, Ferreira L, Gonzalez-Buitrago JM, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM, Morales AI. Increased urinary excretion of albumin, hemopexin, transferrin and VDBP correlates with chronic sensitization to gentamicin nephrotoxicity in rats
2. *Toxicology* 2013 Feb 8;304:83-91.
- (150) Vicente-Vicente L, Sanchez-Juanes F, Garcia-Sanchez O, Blanco-Goza V, Pescador M, Sevilla MA, et al. Sub-nephrotoxic cisplatin sensitizes rats to acute renal failure and increases urinary excretion of fumarylacetoacetase
1. *Toxicol Lett* 2015 Apr 16;234(2):99-109.
- (151) Basi S, Fesler P, Mimran A, Lewis JB. Microalbuminuria in type 2 diabetes and hypertension: a marker, treatment target, or innocent bystander?
3. *Diabetes Care* 2008 Feb;31 Suppl 2:S194-S201.
- (152) Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease
108. *J Am Soc Nephrol* 2007 Mar;18(3):913-22.
- (153) Williams RE, Lock EA. D-serine-induced nephrotoxicity: possible interaction with tyrosine metabolism
5. *Toxicology* 2004 Sep 1;201(1-3):231-8.
- (154) Marenzi G, Cabiati A, Milazzo V, Rubino M. Contrast-induced nephropathy
1. *Intern Emerg Med* 2012 Oct;7 Suppl 3:S181-S183.
- (155) Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S, Khamaisi M. Why is diabetes mellitus a risk factor for contrast-induced nephropathy?
2. *Biomed Res Int* 2013;2013:123589.
- (156) Caixeta A, Mehran R. Evidence-based management of patients undergoing PCI: contrast-induced acute kidney injury
3. *Catheter Cardiovasc Interv* 2010 Mar 1;75 Suppl 1:S15-S20.
- (157) Real Decreto 53/2013. Normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluidos la docencia. BOE 2013 Feb 1;34:11370-421.
- (158) Lopez-Farre A, Gomez-Garre D, Bernabeu F, Lopez-Novoa JM. A role for endothelin in the maintenance of post-ischaemic renal failure in the rat
1. *J Physiol* 1991 Dec;444:513-22.
- (159) Ley Orgánica 15/1999. Protección de Datos de Carácter Personal. BOE 1999 Dec 13;298:43088-99.

- (160) Real Decreto 1720/2007. Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. BOE 2007 Dec 21;19.
- (161) European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient
1. Nephrol Dial Transplant 2002;17 Suppl 4:1-67.
- (162) Jaffé M. Zisch Physiol Chem 1886;10:391.
- (163) Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea
1. Clin Chem 1975 Jul;21(8):1136-40.
- (164) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976 May 7;72:248-54.
- (165) Inal BB, Oguz O, Emre T, Usta M, Inal H, Altunoglu E, et al. Evaluation of MDRD, Cockcroft-Gault, and CKD-EPI formulas in the estimated glomerular filtration rate
1. Clin Lab 2014;60(10):1685-94.
- (166) Ferreira L, Quiros Y, Sancho-Martinez SM, Garcia-Sanchez O, Raposo C, Lopez-Novoa JM, et al. Urinary levels of regenerating islet-derived protein III beta and gelsolin differentiate gentamicin from cisplatin-induced acute kidney injury in rats
1. Kidney Int 2011 Mar;79(5):518-28.
- (167) Waring WS, Moonie A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury
6. Clin Toxicol (Phila) 2011 Oct;49(8):720-8.
- (168) Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin
2. Toxicol Sci 2011 Feb;119(2):245-56.
- (169) Wasilewska AM, Kuroczycka-Saniutycz E, Zoch-Zwierz W. Effect of cyclosporin A on proteinuria in the course of glomerulopathy associated with WT1 mutations
1. Eur J Pediatr 2011 Mar;170(3):389-91.
- (170) Heilman RL, Smith ML, Kurian SM, Huskey J, Batra RK, Chakkera HA, et al. Transplanting Kidneys from Deceased Donors With Severe Acute Kidney Injury
1. Am J Transplant 2015 Aug;15(8):2143-51.
- (171) Ali T, Dimassi W, Elgamal H, Alabassi A, Aleid H, Altalhi M, et al. Outcomes of kidneys utilized from deceased donors with severe acute kidney injury
1. QJM 2015 Oct;108(10):803-11.
- (172) Molina M, Apaza J, Gonzalez ME, Gutierrez ME, Sevillano AM, Marin JP, et al. Results of kidney transplantation from deceased donors with acute kidney injury
1. Transplant Proc 2015 Jan;47(1):42-4.
- (173) El-Husseini A, Sabry A, Zahran A, Shoker A. Can donor implantation renal biopsy predict long-term renal allograft outcome?
1. Am J Nephrol 2007;27(2):144-51.
- (174) Wang CJ, Wetmore JB, Crary GS, Kasiske BL. The Donor Kidney Biopsy and Its Implications in Predicting Graft Outcomes: A Systematic Review
1. Am J Transplant 2015 Jul;15(7):1903-14.

- (175) Reese PP, Hall IE, Weng FL, Schroppel B, Doshi MD, Hasz RD, et al. Associations between Deceased-Donor Urine Injury Biomarkers and Kidney Transplant Outcomes
1. J Am Soc Nephrol 2015 Sep 15.
- (176) Hall IE, Doshi MD, Reese PP, Marcus RJ, Thiessen-Philbrook H, Parikh CR. Association between peritransplant kidney injury biomarkers and 1-year allograft outcomes
1. Clin J Am Soc Nephrol 2012 Aug;7(8):1224-33.
- (177) Szeto CC, Kwan BC, Lai KB, Lai FM, Chow KM, Wang G, et al. Urinary expression of kidney injury markers in renal transplant recipients
1. Clin J Am Soc Nephrol 2010 Dec;5(12):2329-37.
- (178) Kanter J, Beltran S, Molina D, Vallecillo J, Sancho A, Gavela E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin after kidney transplantation: is it a good biomarker to assess delayed graft function?
1. Transplant Proc 2013 May;45(4):1368-70.
- (179) Hoogland ER, de Vries EE, Christiaans MH, Winkens B, Snoeijs MG, van Heurn LW. The value of machine perfusion biomarker concentration in DCD kidney transplantations
1. Transplantation 2013 Feb 27;95(4):603-10.
- (180) Hollmen ME, Kyllonen LE, Inkinen KA, Lalla ML, Salmela KT. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker of graft recovery after kidney transplantation
4. Kidney Int 2011 Jan;79(1):89-98.
- (181) Field M, Dronavalli V, Mistry P, Drayson M, Ready A, Cobbold M, et al. Urinary biomarkers of acute kidney injury in deceased organ donors--kidney injury molecule-1 as an adjunct to predicting outcome
1. Clin Transplant 2014 Jul;28(7):808-15.
- (182) Buemi A, Musuamba F, Frederic S, Douhet A, De MM, De PL, et al. Is plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) determination in donors and recipients predictive of renal function after kidney transplantation?
1. Clin Biochem 2014 Oct;47(15):68-72.
- (183) Bhangoo RS, Hall IE, Reese PP, Parikh CR. Deceased-donor kidney perfusate and urine biomarkers for kidney allograft outcomes: a systematic review
1. Nephrol Dial Transplant 2012 Aug;27(8):3305-14.
- (184) Hall IE, Schroppel B, Doshi MD, Ficek J, Weng FL, Hasz RD, et al. Associations of deceased donor kidney injury with kidney discard and function after transplantation
2. Am J Transplant 2015 Jun;15(6):1623-31.
- (185) Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants
2. J Am Soc Nephrol 2012 May;23(5):948-58.
- (186) Quintana LF, Banon-Maneus E, Sole-Gonzalez A, Campistol JM. Urine proteomics biomarkers in renal transplantation: an overview
1. Transplantation 2009 Aug 15;88(3 Suppl):S45-S49.