



Papel de los polimorfismos del gen del transforming growth factor β_1 en el desarrollo de nefropatía crónica del injerto en pacientes trasplantados renales

P. Íñigo¹, S. Lario², J. M. Campistol³, M. Bescós², B. Campos⁴ y F. Oppenheimer³

¹Servicio de Nefrología del Hospital Clínico de Zaragoza. ²Laboratorio de Hormonal. ³Unidad de Trasplante Renal Hospital Clínico, IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Agusti Pi i Sunyer). ⁴Unidad de Bioestadística del Departamento de Salud Pública. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

RESUMEN

La nefropatía crónica del injerto renal (NCIR) es la principal causa de pérdida del injerto después del primer año post-trasplante y en la biopsia renal encontramos un predominio de las lesiones fibróticas. El transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1) es la principal citoquina profibrogenética y ha sido implicada en el mecanismo de producción de la NCIR. Se han descrito varios polimorfismos del gen del TGF- β_1 , algunos de ellos se han relacionado con el desarrollo de enfermedades. El objetivo de este estudio es analizar la posible relación entre estos polimorfismos y el desarrollo de NCIR en un grupo de pacientes trasplantados renales con largo tiempo de seguimiento.

Mediante enzimas de restricción identificamos cuatro polimorfismos del gen del TGF- β en el codon 10, 25 y en -800 y -509 (en el promotor). Realizamos un estudio retrospectivo de casos y controles donde se estudiaron 60 pacientes trasplantados renales con 8 años de seguimiento post-trasplante, 22 de ellos con NCIR (casos) y 38 con normofunción (controles), analizamos también población general para el estudio de la distribución genotípica en el área geográfica (grupo control externo, n = 73).

Las frecuencias genotípicas fueron similares en el grupo control y de estudio. La presencia de NCIR se asoció de forma significativa con la combinación de los polimorfismos Pro/Pro¹⁰ TT⁵⁰⁹ del gen del TGF- β_1 y estos pacientes además desarrollaron NCIR de forma más precoz que el resto. La NCIR se asoció también con la diferencia de edad entre el receptor y el donante (Δ edad r-d), siendo los donantes mayores que el receptor un factor de riesgo para el desarrollo de NCIR. El análisis mediante regresión logística confirmó el papel independiente del polimorfismo TT⁵⁰⁹ Pro/Pro¹⁰ en la NCIR, con un Odd Ratio de 5,8 (1,14-29,7), siendo la edad Δ r-d un parámetro que no modifica el proceso de formas más determinante que el polimorfismo, pero pudiendo añadir al efecto

Recibido: 23-XII-2002.

En versión definitiva: 7-IV-2003

Aceptado: 7-IV-2003.

Correspondencia: Dr. D. Pablo J. Íñigo
Servicio de Nefrología
Hospital Clínico «Lozano Blesa»
Avda. S. Juan Bosco, 15
50009 Zaragoza
E-mail: pinigo@comz.org

de éste un carácter más marcado. Estos datos sugieren un papel importante de los polimorfismos del gen del TGF- β_1 en el desarrollo de NCIR (TT⁵⁰⁹Pro/Pro¹⁰). La identificación de esta predisposición genética para el desarrollo de NCIR podría jugar un papel decisivo en la prevención de esta frecuente patología.

Palabras clave: Polimorfismos del TGF- β_1 . Nefropatía crónica del injerto. Trasplante renal.

ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1 GENE POLYMORPHISMS IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

SUMMARY

Background: Chronic allograft nephropathy (CAN) is the main cause of graft loss after the first year of transplantation, and renal biopsies show a predominance of fibrotic lesions. Human transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1) is the principal profibrogenetic cytokine which has been recently implicated in the development of CAN. Seven TGF- β_1 gene polymorphisms have been recently described and some of them have been related to the development of several diseases.

Aim: to analyse the relationship between TGF- β_1 gene polymorphisms and the development of CAN in a group of renal transplant patients with a long-term follow-up.

Methods: a restriction enzyme-based method for TGF- β_1 genotyping was used to detect four TGF- β_1 gene polymorphisms in codon 10, 25 and 5'-flanking region (-800 and -509 positions). A retrospective case-control study were performed on sixty renal transplant recipients with 8 years of post-transplant, 22 of them with CAN (cases) and 38 with normal graft function (controls). We studied 73 subjects to analyse the distribution of the genotypes in the area.

Results: the genotype frequencies were similar in the study and control group. The presence of chronic allograft nephropathy was statistically associated with the combination Pro/Pro¹⁰ TT⁵⁰⁹ polymorphism in the TGF- β_1 gene, and these patients develop chronic rejection more quickly than the rest of the patients. Chronic allograft nephropathy was also associated with Δ age recipient-donor, with older donors being a significant risk factor for chronic nephropathy. The logistic regression analysis confirmed the independent role of TT⁵⁰⁹ Pro/Pro¹⁰ TGF- β_1 polymorphism with a Odd Ratio of 5.8 (1.14-29.7) in chronic nephropathy being the Δ age recipient-donor a confounder factor but not an effect modifier. The rest of the TGF- β_1 gene polymorphisms and the classic risk factors were not associated with the development of chronic allograft nephropathy.

Conclusions: these data suggest a leading role for TGF- β_1 gene polymorphisms (TT⁵⁰⁹Pro/Pro¹⁰) in the development of chronic allograft nephropathy. The identification of this genetic predisposition to chronic allograft rejection could play a decisive role in the prevention of this common pathology.

Key words: TGF- β . Chronic allograft nephropathy. Kidney transplantation. Gene polymorphisms.

INTRODUCCIÓN

La principal causa de pérdida del injerto renal después del primer año post-trasplante renal es la denominada nefropatía crónica del injerto renal

(NCIR). La patogénesis de ésta entidad no está todavía muy bien caracterizada. El trasplante renal con NCIR muestra un progresivo deterioro de la función renal apareciendo hipertensión arterial y/o proteinuria de forma asociada. Los hallazgos histológicos se

caracterizan por fibrosis de la íntima y media arterial, lesiones arteriolas exudativas, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular¹.

El Transforming growth factor β_1 o factor transformador del crecimiento (TGF- β_1) es una citoquina que actúa en un amplio espectro de actividades biológicas de nuestro organismo incluyendo el control de la proliferación, diferenciación y adhesión celular². La implicación del TGF- β_1 en la inflamación y reparación tisular ha sido bien establecida en los últimos años, sugiriendo un papel crucial de esta citoquina en el desarrollo de varias patologías del sistema cardiovascular (hipertrofia ventricular izquierda), riñón (NCIR, glomerulonefritis, nefropatía diabética)³⁻⁵, hueso (osteoporosis)⁶, piel (esclerosis sistémica)⁷, pulmón (fibrosis pulmonar idiopática y asma)⁸ y en hígado, donde la fibrosis tisular es la principal patología, la cirrosis⁹. El gen del TGF- β_1 se localiza en 19q13, se divide en 7 exones con 6 intrones dando lugar a una proteína precursora de 390 aminoácidos, el cual es proteolíticamente procesado a una proteína de 112 aminoácidos¹⁰, su promotor también ha sido caracterizado¹¹.

Se han descrito siete polimorfismos del gen del TGF- β_1 mediante técnicas de SSCP (single-stranded conformational polymorphisms) y se analizaron en un estudio multicéntrico en una amplia población, el estudio ECTIM (Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde)¹². Tres de estas siete variantes polimórficas fueron localizadas en la 5'-flanking región del gen del TGF- β_1 (en las posiciones -988, -800 y -509), tres en regiones codificantes (codones 10, 25 y 263), y una inserción fue también descrita en la 5'-UTR (untranslated región) en la posición +72. Varios estudios han evaluado el papel de los polimorfismos del gen del TGF- β_1 en diversas enfermedades. Cambien y cols., mostraron como el alelo prolina (Pro) en el codón 25 se asociaba con el incremento del riesgo de padecer infarto de miocardio y reducir el riesgo de padecer hipertensión arterial¹²; Sirrys sugirió tras un estudio con 900 pacientes que estos polimorfismos no se asociaban con el desarrollo de enfermedad arterial coronaria¹³; mientras, por otro lado, Li y cols., reportaron que la mayoría de los pacientes hipertensos eran homocigotos para el alelo arginina (Arg) en el codón 25¹⁴. Yamada y cols., demostraron que el alelo Pro en el codón 10 es uno de los determinantes genéticos de pérdida de masa ósea y un factor de riesgo independiente en la susceptibilidad genética para padecer osteoporosis en mujeres japonesas postmenopáusicas⁶; y finalmente Awad y cols., mostraron la asociación entre el alelo Arg en el codón 25 y la aparición de fibrosis en el injerto pulmonar post-trasplante de dicho órgano¹⁵.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el papel de los polimorfismos del gen del TGF- β_1 como un posible factor de riesgo añadido en el desarrollo de nefropatía crónica del injerto en pacientes receptores de un trasplante renal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo de casos y controles, donde los casos fueron los sujetos que desarrollaron NCIR y los controles los trasplantados en ese mismo año sin evidencias de NCIR. Realizamos también otro grupo control externo para demostrar que no existe sesgo de partida en la distribución genotípica entre la población sana y los pacientes trasplantados en nuestra área geográfica. Este grupo control, fueron 73 donantes de órganos del Hospital Clínic de Barcelona (46 varones), con una media de edad de 35 ± 18 (SD) años. Descartamos donantes con antecedentes de hipertensión arterial o diabetes mellitus; el grupo de estudio fue una cohorte de 90 pacientes trasplantados renales en el año 1990. De ellos, 86 fueron primeros trasplantes y los 4 restantes segundos trasplantes. El protocolo inmunosupresor de inicio en aquel momento consistió en ciclosporina (10 mg/kg/día) y esteroides. En 1998, cuando comenzamos este estudio, 20 pacientes habían fallecido (16 de ellos con injerto funcional), en otros 7 casos fue imposible contactar con ellos para obtener la muestra de sangre para DNA dado que estaban controlados en otras Comunidades Autónomas. Fueron excluidos del análisis 3 casos por disfunción primaria del injerto.

Finalmente, el grupo de estudio fueron 60 pacientes (40 varones). La edad media del grupo de estudio fue de $42,1 \pm 14,4$ (SD) años (rango de 11 a 66). Clasificamos a los pacientes en dos grupos según el estado de su función renal 8 años post-trasplante: *injerto normofuncionante* o *controles* (NF) o *injerto en nefropatía crónica* o *casos* (NCIR). El diagnóstico de NCIR se confirmó histológicamente aplicando criterios de Banff. Los criterios de normofunción fueron creatinina sérica (Creat_s) menor de 2 mg/dL, proteinuria < 300 mg/24 h y no deterioro de la función renal en los 6 meses previos. Treinta y ocho pacientes (63,3%) estaban en el grupo NF y 22 pacientes (36,7%) en el NCIR. De los 22 pacientes del grupo de NCIR, 17 habían reiniciado ya programa de hemodiálisis tras nefropatía NCIR (en estos, el injerto había tenido una duración media de $3,6 \pm 2,5$ años) y 5 estaban en NCIR con Creat_s de

3,8 \pm 1,3 mg/dl. En el grupo de NF el tiempo medio de seguimiento post-trasplante fue de 8 años. Se recogieron los datos clínicos y factores de riesgo para el desarrollo de NCIR de todos los pacientes: edad del donante, edad del receptor, diferencia de edad receptor-donante (Δ r-d), presencia de necrosis tubular aguda post-trasplante, tiempo de isquemia fría, infección por CMV, rechazos agudos, n.^o de compatibilidades HLA, dislipemia, hipertensión arterial; algunos de ellos se resumen en la tabla I.

Extracción del DNA y genotipado del TGF- β_1

Se recogieron muestras de sangre venosa anticoagulada (5 ml) según las recomendaciones NBA. El DNA se obtuvo desde sangre completa usando una precipitación con fenol y digestión con proteinasa K. Los genotipos del TGF- β_1 fueron determinados mediante amplificación por PCR (polymerase chain reaction) y usado enzimas de restricción tal y como describimos recientemente¹⁶. Nos referiremos a los diferentes polimorfismos del TGF- β_1 de la siguiente manera y nomenclatura GG⁻⁸⁰⁰, GA⁻⁸⁰⁰, AA⁻⁸⁰⁰, CC⁻⁵⁰⁹, CT⁻⁵⁰⁹, TT⁻⁵⁰⁹, Leu/Leu¹⁰, Leu/Pro¹⁰, Pro/Pro¹⁰ y Arg/Arg²⁵, Arg/Pro²⁵, Pro/Pro²⁵.

Análisis estadístico

En ambos grupos, cada uno de los polimorfismos fue testado mediante un equilibrio de Hardy-Weinberg usando GraphPad. Las comparaciones entre el grupo control del estudio ECTIM, nuestro grupo control y el grupo de estudio para las diferentes frecuencias genotípicas fueron realizadas aplicando un test de Chi-cuadrado a las tablas de contingencia de las variables contables. Las combinaciones genotípi-

cas (o asociaciones polimórficas) fueron también tabuladas para cuantificar el grado de variabilidad genética en los receptores del trasplante renal.

La asociación estadística entre la función renal y cada uno de los polimorfismos del TGF- β_1 fue llevada a cabo por análisis categórico de los datos. La odds ratio estimada (OR) y el riesgo relativo (RR) de los genotipos identificados como potenciales factores de riesgo fueron calculados directamente desde una tabla 2 \times 2.

Un análisis múltiple de regresión logística fue realizado para ajustar el OR estimado para los diferentes polimorfismos y otras covariables clínicas. Para ser incluidas en este modelo, las variables fueron seleccionadas mediante comparaciones univariadas (t-test, test de Chi-cuadrado y test exacto de Fisher). Este análisis se hizo empleando el Programa BMDP-LR, incluyendo las siguientes variables: polimorfismo T⁻⁵⁰⁹Pro/Pro¹⁰, edad del donante, edad del receptor y Δ edad r-d.

RESULTADOS

La distribución genotípica tanto para casos como para controles estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg para dos alelos.

Las frecuencias de la distribución de los genotipos del TGF- β_1 en ambos grupos se muestran en la tabla II. Tampoco se observaron diferencias significativas en la distribución entre estos dos grupos y el grupo control del estudio ECTIM (p = ns).

Tan solo 13, de las 36 posibles combinaciones genotípicas fueron identificadas en el grupo de estudio, y de éstas, tan sólo 3 estaban presentes con una prevalencia mayor del 10%: GG⁻⁸⁰⁰ CT⁻⁵⁰⁹Leu/Pro¹⁰ Arg/Arg²⁵ (28,3%), GG⁻⁸⁰⁰ CC⁻⁵⁰⁹ Leu/Leu¹⁰ Arg/Arg²⁵ (18,3%) y GG⁻⁸⁰⁰ TT⁻⁵⁰⁹ Pro/Pro¹⁰ Arg/Arg²⁵ (16,7%). En estas combinaciones, todos los pacientes presentaban los mismos polimorfismos en las posiciones -800 y codón 25, diferenciándose tan sólo por las combinaciones del -509 y codón 10.

Encontramos ligamientos con una frecuencia estadísticamente significativa en las siguientes asociaciones polimórficas: codón 10 y -509 (Leu/Leu¹⁰ CC⁻⁵⁰⁹, Leu/Pro¹⁰ CT⁻⁵⁰⁹ y Pro/Pro¹⁰ TT⁻⁵⁰⁹, con p < 0,000); codón 10 y -800 (Leu/Leu¹⁰ GA⁻⁸⁰⁰, con p = 0,003) y codón 25 con -509 (Arg/Pro²⁵CC⁻⁵⁰⁹, p = 0,03).

La figura 1 muestra la distribución de los polimorfismos del TGF- β_1 según la función renal. Testamos cada polimorfismo aislado como factor de riesgo potencial para el desarrollo de NCIR y sólo en el codón 10 (el polimorfismo Pro/Pro¹⁰) demostró significación estadística (test exacto de Fisher, p =

Tabla I. Distribución y análisis univariante de los casos y controles (NCIR y NF) según variables demográficas y factores de riesgo de NCIR

Variable	Controles (NF) n = 38	Casos (NCIR) n = 22	Valor p
Sexo del receptor (% mujeres)	34,2%	31,8%	ns
Sexo del donante (% mujeres)	23,6%	22,7%	ns
Edad del receptor	43,7 \pm 14	41,5 \pm 14	ns
Edad del donante	31,7 \pm 16	43,4 \pm 16	0,007
Δ edad r-d	12 \pm 18	-2,1 \pm 20	0,009
NTA/paciente	0,42	0,40	ns
N ^o rechazos agudos/paciente	0,42	0,45	ns
Identidades HLA	2,18	2,09	ns
Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁻⁵⁰⁹	38,5	61,5%	0,05

Tabla II. Distribución de los genotipos del TGF-β₁ en los grupos control y de estudio. Comparación con el grupo control del estudio ECTIM. Los valores se muestran en %

	-800			-509			codon 10			codon 25		
	GG	GA	AA	C	CT	TT	Leu/Leu	Leu/Pro	Pro/Pro	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro
Estudio ECTIM (n = 629)	84,9	14,1	1	41,8	47,2	11*	35,8	47,2	17	86,8	12,9	0,3
Grupo control externo (n = 73)	82,2	16,4	1,4	35,6	46,6	17,8	30,1	46,6	23,3	87,8	9,6	2,7
Grupo de estudio (n = 60)	91,7	8,3	-	36,6	36,6	26,7*	31,6	46,6	21,7	90	10	-
Controles-normofunción (n = 38)	61,9	80	-	72,8	63,7	50	73,7	67,8	38,5	61,2	83,4	-
Casos-NCIR (n = 22)	38,1	20	-	27,2	36,3	50	26,3	32,3	61,5	38,8	16,6	-
χ ²		2,5			14,2			2,2			0,5	
Grados de libertad (DF) =		2			4			4			2	
p =		0,2 (ns)			0,007*			0,68 (ns)			0,771 (ns)	

(*) Comparando Grupo de Estudio con ECTIM.

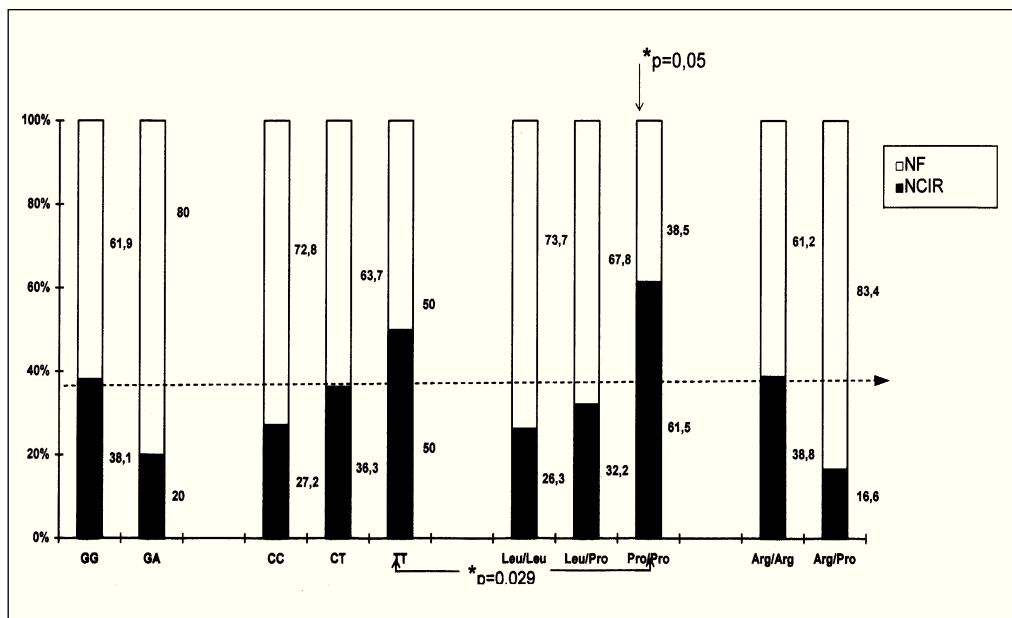


Fig. 1.—Distribución del polimorfismo según el estado de la función renal.

0,052). El riesgo relativo estimado de aparecer NCIR comparando el polimorfismo Pro/Pro¹⁰ con el resto, fue de 2,06 (95% CI: 1,1-3,8). El odds-ratio estimado fue mayor con un más amplio intervalo de confianza (OR = 3,77; 95% CI: 1,05-13,6). Dado que encontramos una importante asociación entre los polimorfismos en el codón 10 y -509, estudiamos si esta asociación tenía un efecto modificador como factor de riesgo. Analizamos el efecto del genotipo Pro/Pro¹⁰ TT⁻⁵⁰⁹ en el desarrollo de NCIR y encontramos resultados estadísticamente significativos (test exacto de Fisher p = 0,029) con un riesgo relativo de 2,33 (95% CI: 1,3-4,2) y odds-ratio de 5,4 (95% CI: 1,2-24,0). Los pacientes con el genotipo

Pro/Pro¹⁰TT⁻⁵⁰⁹ desarrollaron NCIR en un tiempo medio de 2,5 ± 2 (SD) años post-trasplante, comparado con 4,2 ± 2,2 años en el resto de pacientes. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p = 0,160), pero el dato si lo es desde el punto de vista clínico y achacamos esta ausencia de significación a la diferencia y escasez de «n» entre ambos grupos comparados.

El resto de variables que se consideran clásicamente factores de riesgo para el desarrollo de NCIR fueron analizadas (compatibilidad HLA, NTA, rechazos agudos previos, dislipemia, hipertensión arterial, infección por CMV, edad del donante y receptor, etc.). El grado de compatibilidad HLA

donante-receptor fue similar en ambos grupos, NF y NCIR, sin diferencias significativas (NF 2,18 vs 2,09 en NCIR). En la tabla I se recogen las principales diferencias entre casos y controles en cuanto a algunas de estas variables.

Los resultados fueron negativos para todas las variables con excepción de la diferencia de edad entre el receptor y el donante (Δ edad r-d) ($t = -2,71$, $p = 0,009$). En el grupo NF, la media de Δ edad r-d fue de 12 ± 18 años (los donantes eran una media de 12 años más jóvenes que los receptores) y en el grupo NCIR fue de $-2,1 \pm 20$ (los donantes fueron 2,1 años mayores que los receptores). El grupo de pacientes con NCIR con el genotipo Pro/Pro¹⁰-TT⁵⁰⁹ tenía una Δ edad r-d de -1 año (sus donantes eran una media de 1 año mayores que ellos) mientras que el resto de pacientes con NCIR fue de -2,6 años, no siendo significativa esta diferencia.

Al encontrar dos variables en este estudio como factor de riesgo de desarrollo de NCIR (polimorfismo y Δ edad r-d) llevamos a cabo un modelo logístico en el que se introdujo el genotipo citado del TGF- β como factor de riesgo y la Δ edad r-d para ver si uno era modificador o «matizador» del efecto del otro factor. En primer lugar, el genotipo Pro/Pro¹⁰ y el TT⁵⁰⁹ fueron incluidos como variables independientes sin obtener resultados significativos. Posteriormente se introdujo la asociación Pro/Pro¹⁰-TT⁵⁰⁹ como factor de riesgo, codificándolo

la como 1 a TT⁵⁰⁹ Pro/Pro¹⁰ (es decir, presencia de la asociación) y como 0 a las otras (ausencia de la asociación). Edad del donante, edad del receptor y Δ edad r-d fueron analizadas como posibles covariables. Tan solo la Δ edad r-d resultó positiva para ser introducida en el modelo. El análisis logístico fue llevado a cabo mediante el método de selección por etapas o escalones. El polimorfismo fue introducido en el primer escalón (dado que los resultados del análisis independiente le dotaban de mayor significación) y la Δ edad r-d lo hizo en un segundo escalón produciendo un descenso significativo del long-likelihood, indicando que esta variable actúa como un factor que «matiza» el efecto del polimorfismo como factor de riesgo pero no llega a modificarlo de forma significativa. Los resultados de este modelo se explican en la tabla III. La odds-ratio estimada ajustada obtenida por el modelo de regresión para el genotipo Pro/Pro¹⁰-TT⁵⁰⁹ fue de 5,8 con un CI del 95% (1,14-29,7). Por otro lado, la Δ edad r-d se comporta un factor protector (OR = 0,964; 95% CI: 0,934-0,994), significando que cuanto más joven es el donante menor es la probabilidad de desarrollo de NCIR. En la tabla III se muestra un modelo predictivo de la probabilidad de desarrollo de NCIR según este presente o no el genotipo Pro/Pro¹⁰-TT⁵⁰⁹ y según la Δ edad r-d sea = 0 o bien el donante sea 10 años menor que el receptor.

Tabla III. En A, resumen de los resultados en el modelo multivariable. En B, las odds-ratio estimadas ajustadas por las variables del modelo. En C, explicamos las probabilidades de desarrollo de NCIR según la presencia o no del genotipo Pro/Pro¹⁰-TT⁵⁰⁹ y unas Δ edad r-d posibles de 0 ó 10 años.

A					
Step N. ^o	Factores	DF	Log Likelihood	Chi-Square	p-val
0			-39.429		
1	Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹		-36.652	5.555	0,018
2	Δ edad d-r	1	-33.332	6.639	0,010

B					
Factor	Coficiente	Error	Coef/SE	Odd ratio	Int. inferior y superior
Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹	1,763	0,813	2,17	5,83	1,14 29,7
Δ edad d-r	-0,3710E-01	0,154E-01	-2,40	0,964	0,934 0,994
Constante	-0,6613	0,330	-2,00	0,516	0,267 1,00

C			
Situaciones	Δ edad r-d	g (x)	probabilidad de NCIR
No Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹	0	-0,6613	0,34
No Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹	10	-1,0323	0,26
Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹	0	1,1017	0,75
Pro/Pro ¹⁰ -TT ⁵⁰⁹	10	0,7307	0,67

DISCUSIÓN

El presente estudio ha identificado el papel que pueden jugar determinados polimorfismos del gen del TGF- β_1 en el desarrollo de NCIR en pacientes trasplantados renales. Los pacientes con el genotipo Pro/Pro^{10TT-509} desarrollaron de forma significativa con más frecuencia y de forma más temprana NCIR que el resto de pacientes. En este estudio, se confirman también otros datos ya apuntados en la literatura que confieren relevancia como factor de riesgo de NCIR a la edad del donante, aunque en nuestro estudio, este factor no modificó de forma importante al factor de riesgo genotípico sino que matizó la intensidad del mismo. De hecho, en el grupo de pacientes con susceptibilidad genética (Pro/Pro^{10TT-509}), la Δ edad r-d fue similar que en el resto de los pacientes con NCIR (-1 año y 2,6 años, respectivamente). Este hallazgo, remarca el papel del genotipo Pro/Pro^{10TT-509} del TGF- β_1 como factor de riesgo independiente de la Δ edad r-d. El resto de los polimorfismos del gen del TGF- β_1 que fueron analizados, no se asociaron con el desarrollo de NCIR con diferencias estadísticamente significativas, ni tampoco con los otros factores de riesgo. Entre los resultados del estudio, cabe destacar también que la distribución de los polimorfismos estudiados del TGF- β_1 fue semejante en los casos, controles y grupo de control externo con respecto al grupo control del estudio ECTIM, lo que enfatiza la importancia del hallazgo de un genotipo «favorecedor» del desarrollo de NCIR.

Estos resultados coinciden con datos recientes publicados por Yamada y cols., que reportan la asociación del polimorfismo Pro/Pro¹⁰ del TGF- β_1 con la susceptibilidad a desarrollar osteoporosis en mujeres post-menopáusicas⁶. Estos autores encontraron también una correlación significativa entre el polimorfismo del codón 10 y el desarrollo de enfermedad pero no reportaron en su estudio correlación con asociaciones polimórficas, aunque de hecho, la asociación entre el polimorfismo del Pro/Pro¹⁰ es muy elevada con el TT-509. En general, parece que los polimorfismos en este gen predisponen al desarrollo de procesos fibróticos. También en trasplante de órganos, Awad y cols., mostraron que, en pacientes que requerían trasplante de pulmón por una enfermedad fibrótica de dicho órgano, había una predominancia de lo que ellos denominan «alelo altamente productor de TGF- β_1 » (Arg/Arg²⁵), demostrando *in vitro* en cultivos linfocitarios de pacientes con este genotipo una mayor producción de TGF- β_1 . Este genotipo se asoció también con mayor frecuencia de aparición de fibrosis sobre el injerto implantado, demostrándolo por medio de biopsias

pulmonares y comparándolo con controles y con otros pacientes trasplantados sin dicho alelo¹⁶. Estudiar la asociación entre los polimorfismos del gen del TGF- β_1 y los niveles plasmáticos de dicha citocina en pacientes trasplantados en riñón se antoja extremadamente difícil desde nuestro punto de vista, y esto se debe a que los niveles plasmáticos de este factor de crecimiento están influenciados por muchos factores como pueden ser el tratamiento inmunosupresor, algunos tratamientos antihipertensivos (IECAs, ARAs), la presencia de dislipemias y/o sus tratamientos. El efecto de algunos inmunosupresores, como los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A y tacrolimus) tienen sobre la estimulación del TGF- β_1 en cultivos celulares está claramente reportado en la literatura¹⁷, aunque poca información hay sobre las diferencias en cuanto a esta estimulación según esos linfocitos cultivados tengan uno u otros polimorfismos.

LA NCIR representa la principal causa de pérdida de injertos renales tras el primer año post-trasplante. Esta patología se caracteriza sobre todo por la predominancia de las lesiones de tipo fibrótico en glomérulo, vasos y tejido intersticial. El resultado final es una excesiva acumulación de matriz extracelular que conduce a la pérdida de función del injerto renal principalmente por glomeruloesclerosis. TGF- β_1 es la principal citocina con carácter fibrogénico, estimula directamente la síntesis de matriz extracelular y bloquea la degradación de la misma por activación de los inhibidores de la proteasas como el PAI-1 (plasminogen activation inhibidor 1) y el TIMP-1 (tisular inhibitor of metalloproteinase-1). La producción de TGF- β_1 en estas circunstancias puede ser modulada por el sistema renina-angiotensina (RAS) intrarrenal; sabemos que la angiotensina II (Ang II) induce la producción y secreción de TGF- β por parte de las células mesangiales y también por otras estirpes celulares renales cuando por ejemplo, se estimula *in vitro* su producción por efecto directo de la ciclosporina A¹⁸. Existen muchas evidencias que sugieren que el eje RAS intrarrenal está activado de forma importante en la nefropatía crónica por ciclosporina A. También, en recientes estudios, se muestra el efecto del TGF- β_1 en la estimulación de la síntesis de endotelina-1 (ET-1), el cual es considerado el más potente vasoconstrictor del organismo, y que un aumento en su expresión se está considerando como un factor de riesgo importantísimo en el desarrollo de la NCIR, TGF- β a su vez disminuiría la síntesis de óxido nítrico (potente vasodilatador) en las células endoteliales^{19,20}.

El papel que los polimorfismos del gen del TGF- β_1 puede tener en NCIR no es del todo bien conocido, podría explicarse mediante una mayor susceptibili-

dad o respuesta del sistema monocito-macrófago produciendo mayor producción de TGF- β_1 . Hay evidencias *in vitro* de que estos polimorfismos podrían modular la síntesis de TGF- β_1 , diferenciando así entre «altos» y «bajos» productores¹⁵, dichas diferencias podrían constituir un papel fundamental en el desarrollo de la NCIR.

Estudios recientes aportan datos sobre el papel de otras alteraciones genéticas como factores que predisponen al desarrollo de NCIR, por ejemplo, polimorfismos de genes tales como los de moléculas de adhesión o de la ECA^{21,22}. McLaren y cols., mostraron que polimorfismos en ICAM-1 (exón 4 y exón 6) pueden determinar un factor genético de riesgo para NCIR mediante un cambio en la actividad de la molécula²¹. Por otro lado, Barocci y cols., han demostrado que el polimorfismo DD del gen de la ECA se asocia con una supervivencia más corta del injerto renal post-trasplante y sugieren que constituye un cofactor de riesgo no inmunológico en la progresión de la NCIR²².

La identificación de estos factores genéticos que predisponen a NCIR, tales como polimorfismos en ICAM-1, ECA o genotipo Pro/Pro¹⁰TT⁻⁵⁰⁹ del TGF- β_1 podría jugar un papel importante en la prevención de esta frecuente patología. En este grupo de pacientes con esta predeterminación, debería de instaurarse un tratamiento más estricto de otros factores de riesgo tales como una mejor adecuación de la edad del donante, control estricto de la TA y dislipemias y una mayor optimización del tratamiento inmunosupresor, introduciendo tratamientos como el mofetil micofenolato y la rapamicina con menores efectos sobre la producción de TGF- β . El uso de ARAs como fármaco renoprotector y con capacidad de bloquear la síntesis de TGF- β sería de gran utilidad sobre todo en este tipo de pacientes.

En resumen, hemos identificado que el genotipo Pro/Pro¹⁰ TT⁻⁵⁰⁹ del TGF- β_1 se asocia de forma importante y significativa con la aparición de NCIR. La edad del donante y sobre todo, la diferencia de edad entre receptor y donante también se identificó como un factor de riesgo de NCIR. Se requieren estudios con más población para identificar si el genotipo del donante o la coincidencia de genotipos de riesgo entre donante y receptor podrían agravar o magnificar el grado de lesión y anticipar la presencia de la patología, en estos estudios deberían de incluirse una batería de genes interesantes, tales como ECA, PAI-1, receptores del TGF- β_1 , TNF- α , IL-10, e IFN- γ . El conocimiento de esta predisposición genética podría ser de importante valor en la prevención de esta entidad, la cual, representa la principal causa de pérdida de función de injertos renales.

Agradecimientos

Los autores desean mostrar su agradecimiento al Dr. I. Hutchinson y Vera Pravica (School of Biological Sciences, University of Manchester, UK) quienes generosamente nos proporcionaron las secuencias para los primeros de F3-F4. Gracias al Dr. Jaume Martorell (Servicio de Inmunología, Hospital Clínic. Barcelona) por su inestimable colaboración.

Este trabajo fue realizado mediante financiación obtenida de una Beca FIS 99/0176, Beca PENSA de la Sociedad Catalana de Nefrología 1998 y Beca de la FCT (Fundación Catalana de Transplantament 1999).

BIBLIOGRAFÍA

1. Matas AJ, Burke JF Jr, DeVault GA Jr, Monaco A, Pirsch JD: Chroic rejection. *J Am Soc Nephrol* 4 (Supl. 8): 23S-29S, 1994.
2. Border WA, Noble NA: TGF- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331 (9): 1286-1292, 1994.
3. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y, Weffer MI: Expression of TGF-beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 50: 1904-1913, 1996.
4. Taniguchi Y, Yorioka N, Masaki T y cols.: Role of transforming growth factor- β_1 in glomerulonephritis. *J Int Med Res* 25: 71-80, 1997.
5. Border WA, Noble NA: Evidence that TGF- β should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 54: 1390-1391, 1998.
6. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J y cols.: Association of a polymorphism of the transforming growth factor- β_1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13 (10): 1569-1576, 1998.
7. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ: TGF- β_1 , a role in systemic sclerosis? *J Pathol* 184: 4-6, 1998.
8. McKay S, De Jongste JC, Saxena PR, Sharma HS: Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor- β_1 . *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 823-833, 1998.
9. Sanderson N, Factor VM, Nagy P y cols.: Hepatic expression of mature transforming growth factor β_1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci* 92: 2572-2576, 1995.
10. Derynck R, Rhee L, Chen EY, Van Tilburg A: Intron-exon structure of the human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucl Acids Res* 15: 3187, 1987.
11. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB: Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor β_1 gene. *J Biol Chem* 264: 402-408, 1989.
12. Cambien F, Ricard S, Troesch A y cols.: Polymorphisms of the transforming growth factor- β_1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) study. *Hypertension* 28: 881-887, 1996.
13. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC y cols.: Transforming growth factor- β_1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci* 95: 659-667, 1998.
14. Li B, Khanna A, Sharma V, Sing T, Suthanthiran M, August P: TGF- β_1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension* 33: 271-275, 1999.

15. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnot PJ, Hutchinson IV: Genotypic variation in the transforming growth factor- β_1 gene. *Transplantation* 66: 1014-1020, 1998.
16. Lario S, Íñigo P, Campistol JM, Poch E, Rivera F, Oppenheimer F: Restriction enzyme-based method for TGF- β_1 genotyping: non-isotopic detection of codon 10, 25 and 5'-flanking region polymorphisms. *Clin Chem* 45 (8): 1290-1292, 1999.
17. Mohamed MA, Walmsley M, Robertson H, Kirby JA, Talbot D: The effect of cyclosporin A and tacrolimus on cultured human epithelial cells: the role of TGF-beta. *Transplant Proc* 21 (1-2): 1173, 1999.
18. Border WA, Noble NA: Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31: 181-188, 1998.
19. Perella MA, Jain MK, Lee ME: Role of TGF-beta in vascular development and vascular reactivity. *Miner Electrolyte Metab* 24: 136-143, 1998.
20. Gellai M: Physiological role of endothelin in cardiovascular and renal hemodynamics: studies in animals. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 64-68, 1997.
21. McLaren AJ, Marshall SE, Haldar NA, Mullighan CG, Fuggle SV, Morris PJ, Welsh KI: Adhesion molecule polymorphisms in chronic renal allograft failure. *Kidney Int* 55: 1977-1982, 1999.
22. Barocci S, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Noce-
ra A: Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients. *Transplantation* 67 (4): 534-538, 1999.