



IV. NUEVOS METODOS DIAGNÓSTICOS EN EL TRASPLANTE RENAL

Análisis de factores de riesgo genéticos asociados a la nefropatía crónica del trasplante renal: polimorfismos genéticos de citoquinas, moléculas de adhesión, sistema de coagulación-plaquetar y marcadores de riesgo cardiovascular

M. Cobo, Y. Barrios, P. Iñigo*, C. Bigo, A. Álvarez, B. Martín, J. M. Campistol*, D. Hernández, E. Salido y A. Torres

Servicio de Nefrología y Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias. Tenerife. *Unidad de Trasplante renal del Hospital Clínico. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

El trasplante renal es el tratamiento de elección en la mayoría de pacientes con insuficiencia renal crónica. Gracias al avance realizado en los tratamientos inmunosupresores, durante los últimos años hemos asistido a un aumento de la supervivencia de los injertos, tanto a corto como a largo plazo. A pesar de esto, cada año se pierden aproximadamente un 7% de los injertos funcionantes¹, siendo las dos principales causas de pérdida la nefropatía crónica del trasplante (NCT) y la muerte del paciente con injerto funcionante. Desde el punto de vista clínico, la NCT se caracteriza por un deterioro progresivo de la función del injerto, que aparece a partir del tercer mes del trasplante, acompañado con frecuencia de proteinuria y agravamiento o aparición de hipertensión arterial (HTA). Para el diagnóstico, se requiere además una comprobación histológica que demuestre la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular², aunque con frecuencia existe una afectación de prácticamente todos los componentes del parénquima renal. Aunque no completamente definidos, sobre el desarrollo de NCT influyen factores inmunológicos (histocompatibilidad, episodios de rechazo agudo, tipo de inmunosupresión) y no inmunológicos (edad y causa de éxitus del donante, tiempos de isquemia, presencia de

función renal retrasada, alteraciones lipídicas, HTA y/o diabetes en el receptor, etc.). Sin embargo, ante unos mismos factores de riesgo, unos pacientes desarrollan NCT y otros no. Esto hace pensar que, al igual que en otras enfermedades complejas o multifactoriales (como la aterosclerosis, HTA o la diabetes), pueda existir una susceptibilidad genética, que en la actualidad es posible analizar gracias al avance realizado en las técnicas de biología molecular. A diferencia de las enfermedades monogénicas, en las que un único gen mutante confiere una alteración crítica de la función de la proteína codificada y que siguen un patrón de herencia mendeliana, las enfermedades complejas se caracterizan por la interacción entre factores genéticos y ambientales. En este caso, el efecto genético se debe a la existencia de polimorfismos en la secuencia de ADN de los genes involucrados, que dan lugar a más de una forma alélica observándose cada uno de estos alelos con una frecuencia en la población general superior al 1%. La variabilidad genética producida por estos polimorfismos se basa en cambios de un solo nucleótido (SNP), en inserciones/delecciones o en diferentes número de copias de secuencias repetidas. Las consecuencias funcionales de estos polimorfismos aún no están del todo establecidas. De todas formas, parece que podrían dar lugar a una alteración sutil en la expresión o actividad de las proteínas codificadas, haciendo al sujeto más susceptible a padecer la enfermedad cuando está expuesto a ciertos factores ambientales.

En el campo del trasplante renal, el estudio de distintos polimorfismos en los genes que codifican para diferentes moléculas implicadas en la patogenia de

Correspondencia: M.^a Ángeles Cobo Caso
Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Canarias
Ofra, s/n.
38320 La Laguna (Tenerife)
E-mail: macobo@comtf.es

la NCT resulta un interesante campo de investigación, ya que la posible alteración funcional derivada de estos polimorfismos aporta una excelente explicación para justificar la variación en la susceptibilidad a la enfermedad y progresión de la misma entre los distintos individuos. Distintos grupos de trabajo han analizado la influencia polimorfismos genéticos de diferentes tipos de moléculas (citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de los sistemas de coagulación-fibrinólisis, factores de riesgo cardiovascular, moléculas presentadoras de antígenos y coestimuladoras, factores de crecimiento) en la evolución del trasplante renal. Debido a los complicados y aún no totalmente conocidos mecanismos etio-patogénicos involucrados en el desarrollo del rechazo crónico, son muchos los polimorfismos estudiados hasta la actualidad (tabla I).

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOQUINAS

Las citoquinas son importantes mediadores de la regulación de la respuesta inmune. La existencia de diferencias inter-individuales en la producción de estas moléculas puede tener una potencial influencia en la respuesta inmunológica dentro del injerto. La influencia de los polimorfismos de las citoquinas y sus receptores en el trasplante de órganos ha sido analizada por distintos autores, con resultados muy variables (tabla I).

Entre todas las citoquinas, las que han suscitado más interés en el trasplante renal son el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleuquina 10 (IL-10) y, sobre todo, el *transforming growth factor- β* (TGF- β). Se ha descrito una influencia genética en la producción de citoquinas. Un polimorfismo localizado en la posición -308 del promotor del gen del TNF- α (-308 G/A), que da lugar a la presencia de dos alelos distintos (TNF1 y TNF2), se ha relacionado con variaciones en la transcripción del gen y en la producción de TNF- α *in vitro*, de tal forma que se consideran bajos productores de TNF- α (TNF- α *Lo*) a los pacientes homocigotos para TNF1 y altos productores (TNF- α *Hi*) a los pacientes con los genotipos TNF1/TNF2 y TNF2/TNF2³. Igualmente, para la interleuquina-10 (IL-10), un polimorfismo en posición -1082 del promotor del gen (-1082 G/A) se ha relacionado con una menor producción de IL-10 en linfocitos estimulados en los pacientes homocigotos AA³. En varios trabajos se ha analizado el papel de estos polimorfismos genéticos en la evolución el trasplante renal. Algunos autores encuentran una asociación entre los genotipos TNF- α *Hi* y IL-10 *Hi*, así como otros polimorfismos de varias citoquinas, con una mayor incidencia y severidad de

Tabla I. Polimorfismos relacionados con la evolución del trasplante renal

Molécula	Polimorfismo	Referencia	
		Asociación	No asociación
Citoquinas y receptores			
TNF- α	-308 G/A	3*,4	3*,5,6,7,42,43 42,43
	-238 A/G		
	+488 A/G		
IL-10	-1082 G/A	3*,7,8	3*,4,5,6,42,43 4,5,6,42,43 4,5,6,42,43
	-819 C/T		
	-592 C/A		
IL-1 α	-889 T/C		42,43
IL-1 β	-511 T/C		42,43
	+3962 T/C		42,43
IL-1R	970 T/C		42,43
IL-1R antagon	11100 T/C		42,43
IL-4	-590 G/T	7	5,42,43
IL-4R	+1902 G/A		4,42,43
IL-6	-174 G/C	9,43	4,5,42
	+3247 G/A		42
IFN- γ	(CA)n	8	3*,4,5
Linfotoxina (o TNF-beta)	+249 A/G		42,43
	+365 C/G		42,43
	+720 C/A		42,43
TGF- β 1	aa25 R/P		3*,6,7,42
	aa10 L/P	10	6,42,43
	-509 C/T	10	42,43
	-800 G/A		42,43
Quimiocinas y receptores			
MCP-1	2518G/A	13	
CCR5	Δ 32	11,12	
	59029 A/G	12	
CCR2	V64I		12,13
CX3CR1	V249I		12
	T280M		12
Moléculas de adhesión			
ICAM-1	+241 G/R	41	
	+469 E/K	41	
L-selectina	+206 F/L		41
E-selectina	+128 S/R		41
	+554 L/F		41
Sistemas de coagulación-fibrinólisis-Plaquetar			
PAI-1	-675(4G/5G)	14	15
Factor V	-1691 G/A	16,17,18,19,20	
GP III A	PIA2	21	
Protrombina	-20210 G/A	18,22,23	
Factores de riesgo cardiovascular			
ENOS	894 G/T		24,25
	-786 T/C		25
	774 T/C		25
Proteína G	-825 C/T	26**,28	24,26***,27
ECA	I/D	3*,29,30,31	32,33,34
AGT	-235 M/T	32	30,35
	-6 G/A	31	
AT1receptor	-1166 A/C		30,31
AT2receptor	-1237 G/A		30,31
MTHFR	-667 C/T	18	36,37
Apo E	E2/E3/E4	38	
Apo A-I	+83 C/T		39
Apo C-III	Sst I		39
Apo A-IV	Thr347Ser Gln360His		39
Moléculas asociadas al CMH			
TAP1			3*
TAP2			3*
LMP2			3*
HLA-DMA	0102	3*	3*
HLA-DMB			3*
Moléculas co-estimuladoras			
CTLA4	Exón 3 (AT)n +49 (A/G)	3*	3*
Factores de crecimiento			
VEGF	-1154 G/A	40	
	-2578 C/A	40	

*La referencia 3 es un trabajo de recopilación realizado por Akalin que recoge varias publicaciones.**Se refiere al polimorfismo en el donante.*** Se refiere al polimorfismo en el receptor.

episodios de rechazo agudo. Por el contrario, otros grupos no han encontrado esta relación (tabla I). Igual de dispares son los resultados en cuanto a supervivencia y evolución a largo plazo del injerto. Asderakis ha descrito una peor evolución del injerto a largo plazo en pacientes con genotipo altamente productor de interferón- α (IFN- α), así como un efecto protector del genotipo IL-10 *Hi*⁸. Por el contrario, Melk en un trabajo en trasplante pediátrico no encontró asociación entre los polimorfismos genéticos de TNF- α , TGF- β e IL-10 con la disfunción crónica del injerto renal⁶. Por último, un grupo germánico ha descrito una menor supervivencia del injerto a tres años en pacientes con el polimorfismo desfavorable del promotor del gen de la IL-6⁹. Pero también han sido objeto de estudio los polimorfismos genéticos de citoquinas en el donante. Poole ha analizado la influencia de genotipos de citoquinas (TNF- α , IL-10, IL-4 y TGF- β) del donante y receptor en el rechazo agudo del trasplante renal y han encontrado un mayor número de episodios de rechazo en el grupo receptores y donantes con baja producción de IL-4, y en el grupo receptores de alta producción y donantes de baja producción de IL-10⁷. Como vemos, nos encontramos ante unos resultados bastante contradictorios. Por ello, quizá los trabajos de mayor relevancia sean los realizados por Marshall y cols.^{42,43} que han analizado la influencia de múltiples polimorfismos genéticos de citoquinas y receptores de citoquinas, tanto en el receptor (22 polimorfismos) como en el donante (20 polimorfismos) en la incidencia y severidad de los episodios de rechazo agudo del trasplante renal. De todos los polimorfismos analizados, únicamente se demostró esta relación con el polimorfismo del donante en el gen de la IL-6 en posición -174.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL TGF- β 1

El TGF- β 1 es una citoquina multifuncional que interviene en distintos procesos como la proliferación, diferenciación y adhesión celular. De todos sus efectos, el más relevante es actuar como inductor de fibrogenesis, ya que estimula directamente la síntesis de matriz extracelular y bloquea su degradación, disminuyendo la síntesis de enzimas proteolíticas y aumentando los niveles locales de sus inhibidores (como el PAI-1 y TIMP-1). Diversos estudios avalan la implicación de esta molécula en la NCT, sin embargo, establecer su concreta participación es difícil, ya que el TGF- β 1 actúa a distintos niveles, y mantiene una interacción estrecha con otras moléculas (angiotensina II, endotelina, factores de crecimiento, óxido nítrico). Además, hay que tener en cuenta que

muchos de los tratamientos habituales del paciente trasplantado (anticalcineurínicos, IECAS, ARAS, estatinas) modulan la producción de TGF- β 1. Se han descrito varios polimorfismos de esta molécula: tres se localizan en el promotor (posiciones -988, -800 y -509), tres en regiones codificantes (codón 10 y codón 25 y 263) y la última es una inserción en la 5'-UTR. El posible papel de los polimorfismos genéticos del TGF- β 1 en la evolución del injerto renal ha sido analizado en distintos trabajos (tabla I). En algunos de ellos no se ha encontrado ninguna relación^{3,6,7}, sin embargo en otro trabajo publicado recientemente en esta revista se describe una asociación significativa entre la combinación de polimorfismos del codón 10 (Pro/Pro) y del promotor en posición -509 (TT) y el desarrollo de NCT¹⁰.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE QUIMIOCINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son citoquinas que regulan el tráfico de leucocitos e intervienen en procesos inflamatorios e inmunológicos. El rechazo agudo del trasplante renal se caracteriza por la interacción entre la células del donante y del receptor. En este proceso se ha demostrado que existe un aumento de la expresión de quimiocinas que se acompaña de una infiltración del injerto por linfocitos T, monocitos y macrófagos. Varios polimorfismos genéticos de quimiocinas y sus receptores han sido analizados recientemente en el trasplante renal (tabla I). Fische-reder ha encontrado una supervivencia del injerto significativamente mayor (90% *versus* 25% a 20 años) en pacientes homocigotos para una variante genética en el receptor 5 de quimiocinas (CCR5) consistente en una delección de 32 pares de bases que cursa con un receptor no funcionante¹¹. Por otro lado, otro estudio de distintas variantes genéticas de receptores de quimiocinas, encuentra que los pacientes homocigotos para el alelo CCR5-59029-A o portadores del alelo CCR2-64I tienen menos riesgo de rechazo agudo¹². Por último, Kruger ha descrito un mayor riesgo de pérdida precoz del injerto en pacientes homocigotos -2518 G/G del gen de la quimiocina MCP-1¹³.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son mediadores de la interacción entre las células del donante y receptor, facilitando la migración de leucocitos al foco anti-

génico que supone el injerto. Además son moléculas que intervienen en la co-estimulación y activación linfocitaria. Varios estudios demuestran un aumento de expresión de estas moléculas en el rechazo agudo y crónico del trasplante renal. Se han identificado varios polimorfismos de los genes codificantes para estas moléculas. Aunque no se ha definido claramente una repercusión funcional de estos polimorfismos, es posible pensar que esta variabilidad genética puede influir en la susceptibilidad a presentar rechazo y en la evolución del injerto. De los distintos polimorfismos genéticos analizados en trasplante renal, la variante alélica R241 del gen del ICAM-1 se encuentra con mayor frecuencia en receptores con disfunción crónica del injerto, mientras que la variante E469 se relaciona con una evolución más rápida de la disfunción crónica del injerto⁴¹. No se ha demostrado mayor susceptibilidad a NCT asociada a polimorfismos genéticos de otras moléculas de adhesión⁴¹.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON LOS PROCESOS DE COAGULACIÓN, FIBRINÓLISIS Y TROMBOFILIA

La presencia de trombofilia en pacientes trasplantados renales parece ser un factor de riesgo en la trombosis del injerto, y se postula que el daño endotelial y la subsecuente trombosis, tienen un importante papel en el proceso del rechazo agudo y en las pérdidas de injerto. En este sentido, se ha especulado la posible influencia de distintos factores del sistema de coagulación y fibrinólisis, así como sus polimorfismos, sobre el rechazo agudo y la evolución del injerto renal. Entre los factores más estudiados destacan el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), el factor V Leiden, la glicoproteína IIIa/IIb y la protrombina.

El PAI-1 es el principal inhibidor de la fibrinólisis y el aumento de su concentración plasmática se asocia a fenómenos trombóticos. También participa en mecanismos de reparación de tejidos y es capaz de interactuar con otras citoquinas implicadas en la NCT, como IL-1beta, TNF y TGF-beta. Varios trabajos demuestran la implicación de esta molécula en la evolución del injerto renal. Un polimorfismo localizado en la región promotora del gen (-675 4G/5G) se ha relacionado con variaciones en la transcripción del gen y la concentración plasmática de PAI. Mientras que unos autores refieren que este polimorfismo parece modular la evolución del injerto tras un rechazo agudo¹⁴, otros autores no encuentran relación entre este polimorfismo y la NCT¹⁵.

La presencia del factor V Leiden es un conocido factor de trombofilia. Consiste en una mutación del gen del factor V (-1691G/A) que se asocia a elevado riesgo de trombosis venosa. Además, en trasplante renal, también se ha relacionado con un elevado riesgo de trombosis, pérdidas del injerto y rechazo agudo¹⁶⁻²⁰.

La glucoproteína IIIa/IIb es una molécula situada en la superficie de la plaqueta, donde desempeña un papel importante en la agregación plaquetaria. El polimorfismo PIA2 se debe al cambio de una citosina por una timina en posición 1565 del exón 2 del gen de la glucoproteína IIIa/IIb, dando lugar a la sustitución de una leucina (PIA1) por una prolina (PIA2) en el residuo 33 de la proteína madura. En trasplante renal, nuestro grupo de trabajo ha identificado una asociación de este polimorfismo con el rechazo agudo, de tal forma que, los pacientes con el genotipo PIA2 presentan una mayor incidencia de rechazo agudo y peor supervivencia del injerto a los dos años²¹.

Por último, una mutación del gen de la protrombina (G20210A) se ha relacionado con elevadas concentraciones plasmáticas de protrombina y con un aumento del riesgo de pérdida de injerto^{22,23} y mayor incidencia de rechazo agudo¹⁸.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Las lesiones histológicas que aparecen en la NCT remedian, en gran parte, a las lesiones típicas de la aterosclerosis. Además, algunos de los factores tradicionales de riesgo cardiovascular, como la HTA y las alteraciones lipídicas, también se asocian a la NCT. Por este motivo, distintos autores han analizado la potencial influencia de polimorfismos genéticos de moléculas relacionadas con los factores de riesgo cardiovascular (óxido nítrico, proteína G, sistema renina-angiotensina, homocisteína y apolipoproteínas) en la evolución del trasplante renal (tabla I).

El óxido nítrico (NO) es un potente agente vasodilatador dependiente de endotelio, que además interviene en la angiogénesis regulando la proliferación y migración de células musculares y endoteliales y estimulando la expresión de citoquinas. En el rechazo agudo del trasplante renal, se ha observado un aumento de los niveles séricos y urinarios de radicales del óxido nítrico. La síntesis de NO es catalizada por la sintasas del NO. En los estudios publicados hasta ahora, no se ha encontrado relación entre distintos polimorfismos genéticos de estas enzimas con la función del injerto a largo plazo^{24,25}.

Las proteínas G son intermediarios moleculares que participan en los mecanismos de comunicación intracelular. Un polimorfismo (C825T) en el gen que codifica para la subunidad β_3 de estas proteínas se ha relacionado con distinto grado de activación de las mismas, y con la incidencia de hipertensión arterial en pacientes caucásicos. Se postula que el mecanismo implicado es un aumento la proliferación de células musculares lisas, dando lugar a una hipertrofia vascular, fenómenos que se presentan con frecuencia en pacientes con NCT. En trasplante renal, se ha descrito un elevado riesgo de pérdida de injerto asociado a donantes con el genotipo desfavorable (G β_3 825TT)²⁶. Los resultados publicados sobre la relación entre el genotipo del receptor y la evolución del injerto renal son contradictorios^{24, 26-28}.

Dadas las distintas líneas de evidencia que sugieren un papel importante del sistema renina-angiotensina en la NCT, los polimorfismos genéticos de los componentes de este sistema son firmes candidatos a estudio. Así, la influencia del polimorfismo I/D del gen de la ECA en la supervivencia del injerto renal ha sido analizada en varios estudios (tabla I). En algunos casos, se ha encontrado una relación entre la presencia del alelo D y peor evolución del injerto renal^{3, 29-31}. Sin embargo, otros autores no encuentran esta relación³²⁻³⁴. Algo similar ocurre con el polimorfismo AGT M235T del angiotensinógeno ya que mientras unos autores describen su relación con la función del injerto a largo plazo³², otros por el contrario, no encuentran relación^{30, 35}. Esta variante genética se encuentra en casi total desequilibrio de ligamiento con otra variante bialélica A G en posición -6, que también se ha relacionado con una peor evolución de los injertos renales³¹. En la actualidad, no se ha encontrado relación entre los genotipos de los receptores de la angiotensina II, y la supervivencia del injerto renal^{30, 31}.

La hiperhomocisteinemia se considera un importante factor de riesgo de aterosclerosis que está presente con frecuencia en pacientes trasplantados renales. La MTHFR es un enzima que interviene en el metabolismo de la homocisteína, de tal forma que, una disminución de la actividad de este enzima da lugar a un aumento de la concentración plasmática de homocisteína. El polimorfismo del gen de la MTHFR C667T se ha relacionado con la incidencia de rechazo agudo¹⁸. Sin embargo, no se ha demostrado que este polimorfismo (tanto del donante como del receptor) influya en la supervivencia del injerto^{36, 37}.

Las alteraciones lipídicas pueden contribuir a la aparición o progresión de la NCT. Los polimorfismos de las apolipoproteínas pueden modular el metabo-

lismo lipídico. En trasplante renal, se ha descrito una progresión acelerada de la insuficiencia renal en pacientes portadores del alelo $\Delta 4$ de la apolipoproteína E³⁸. En concordancia con este estudio, también nuestro grupo de trabajo ha descrito que la presencia de este alelo $\Delta 4$ actúa como factor de riesgo independiente para la NCT (Hernández y cols. *J Am Soc Nephrol* 11: 690A, 2000). Hasta ahora, no se ha encontrado relación entre genotipos de apo A-I, apo-CIII y apo A-IV y la supervivencia de injerto y paciente³⁹.

OTROS GENES CANDIDATOS

Otros polimorfismos de genes candidatos han sido objeto de estudio. Así, existen varios trabajos que han intentado relacionar polimorfismos de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), tanto en donante como en receptor, con el rechazo agudo del trasplante renal. Alguno de ellos ha encontrado una mayor incidencia de rechazo agudo en pacientes HLA-DMA*0102, mientras que otros no encuentran tal relación con esta, o con otras moléculas del CMH (ver tabla I).

Las vías co-estimuladoras participan en el proceso de reconocimiento de antígenos externos en la respuesta inmunológica. Se ha descrito una relación entre polimorfismos genéticos del antígeno 4 citotóxico de linfocitos T (CTLA4) y la incidencia de rechazo agudo³.

Por último, dos polimorfismos genéticos del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (-1154 G/A y -2578C/A) se han relacionado con la producción de VEGF y con mayor incidencia de rechazo agudo renal⁴⁰. El VEGF es un potente regulador de la angiogénesis que interviene en la adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio y se expresa de forma amplia en el tejido renal y en linfocitos T.

EXPERIENCIA EN NUESTRO CENTRO

Nuestro grupo de trabajo ha realizado un estudio prospectivo en 309 receptores consecutivos de injerto renal de cadáver (excluidas las pérdidas técnicas) realizados en nuestro centro desde 1996 a 1999 con un período de seguimiento entre 1 y 5 años (Cobo y cols. *J Am Soc Nephrol* 13: 46P, 2002). Se recogieron variables demográficas y clínicas de donantes y receptores, así como datos inmunológicos (transfusiones, anticuerpos anti -HLA, compatibilidad HLA), del injerto (tiempos de isquemia) y de la evolución del trasplante (función renal retrasada, re-

chazos agudos, NCT, nefrotoxicidad por anticalcineurínicos y función renal), incluyendo factores de riesgo cardiovascular y fármacos utilizados para su tratamiento y prevención. Tanto en donantes como en receptores, se realizó el tipaje molecular de los antígenos HLA-DRbeta y se determinaron 24 genotipos de 19 moléculas potencialmente implicadas en la patogenia de la NCT: TNF-beta ó linfoxina (250 G/A), TGF-beta1 (-509 C/T, -800 G/A, codón 10 Leu/Pro, codón 25 Arg/Pro y codón 263 Thr/Ile), ICAM-1 (+241 G/R), ELAM-1 o selectina-E (+128 S/R), PECAM-1 (125 Leu/Val), ECA (I/D), AT1R (-1166 A/C), proteína G (-825 C/T), eNOS (eNOSi4 b/a, eNOSp -786T/C), MTHFR (223 Ala/Val), apolipoproteína E (E2, E3 y E4), t-PA (I/D), PAI-1 (-675 G4/G5), fibrinógeno (-445 G/A), GPIIIa (33 Leu/Pro), Glicoproteína Ib (145 M/T), protrombina (-20210 G/A), Factor V (506 Arg/Gln), Factor von Willebrand (I/V). Definimos NCT cuando, en ausencia de estenosis de la arteria del injerto, nefrotoxicidad crónica por anticalcineurínicos constatada por biopsia, u otra complicación, se observó un descenso de la inversa de la creatinina desde el tercer mes al año del trasplante mayor del 30%, o documentación histológica de NCT. Un total de 31 receptores de 239 (un 13%), cumplían estos criterios. En el análisis de regresión logística, las variables clínicas que se asociaron a NCT fueron la edad del donante, los episodios de rechazo agudo y el título de anticuerpos anti-HLA (tabla II). De todos los polimorfismos analizados, las únicas variables genéticas que resultaron predictoras de NCT fueron los polimorfismos desfavorables del ELAM-I (SR/RR), apolipoproteína-E (E4) y TNF-beta (GG) del receptor. En conclusión, en nuestros pacientes, aquellos receptores portadores de algún alelo de riesgo del polimorfismo S/R de la molécula de adhesión ELAM, del E3/E4 de la apolipoproteína-E o A/G del TNFbeta tienen mayor riesgo de desarrollar nefropatía crónica del trasplante. La relación encontrada con el polimorfismo del ELAM difiere del único estudio previo realizado por McLaren en NCT⁴¹. Sin embargo, se trata de un estudio

retrospectivo y los criterios utilizados fueron distintos a los nuestros. Por otro lado, la asociación que encontramos con el polimorfismo de la apolipoproteína-E sí está en concordancia con estudios previos³⁸ y remarca la importancia de las alteraciones lipídicas en la evolución del trasplante renal. Hasta ahora, no se han descrito otros trabajos analizando la relación entre polimorfismos del TNF-beta y NCT. Únicamente, en un trabajo de Kimball⁴⁴ se ha descrito una asociación de este polimorfismo con la incidencia de infecciones urinarias en pacientes trasplantados renales. Estos autores no encontraron relación con la supervivencia del injerto. Sin embargo, se trata de un estudio pequeño (75 pacientes) y con un período de seguimiento muy corto.

LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN LA NCT

Tal y como hemos visto, los resultados publicados hasta ahora intentando relacionar distintos factores genéticos con la evolución del injerto renal pueden parecer confusos y, en ocasiones, contradictorios. Probablemente esto se justifique por varias razones: Estos estudios se han realizado en distintos tipos de poblaciones (distinto componente étnico), con tratamientos inmunosupresores variables, en ocasiones con un número limitado de enfermos, y los criterios de evaluación no han sido uniformes. Además, en la mayoría de los casos se trata de estudios retrospectivos. Dada la complejidad de mecanismos y factores implicados en la NCT, para realizar estudios de asociación en este tipo enfermedad, deberían de aplicarse criterios de validación similares a los utilizados en otras enfermedades complejas (tabla III). Para una correcta interpretación de los resultados en este tipo de trabajos es deseable que los estudios a realizar tengan un tamaño muestral amplio, un seguimiento prolongado, sean preferentemente prospectivos y con un adecuado control de otras variables confundentes. Los polimorfismos a analizar

Tabla II. Resultados. Análisis de regresión logística

<i>Variable</i>	<i>OR (95% IC)</i>	<i>P</i>
Edad Donante (por cada año)	1,03 (1,004-1,057)	0,02
Episodios de Rechazo Agudo	2,84 (1,4-5,9)	0,005
Anticuerpos anti-HLA (por cada 1%)	1,03 (1,008-1,056)	0,009
Genotipo SR/RR ELAM (Receptor)	2,7 (1,1-6,8)	0,03
Algún alelo E4 de APOE (Receptor)	3,8 (1,4-10,3)	0,008
Genotipo GG de TNF-Beta (Receptor)	4 (1,1-14,3)	0,04

Factores predictivos de NCT en 239 trasplantes renales consecutivos con, al menos un año de seguimiento, realizados en el Hospital Universitario de Canarias.

Tabla III. Criterios de validación de estudios de asociación de polimorfismos con enfermedades complejas

1. Hipótesis biológica plausible.
2. Concordancia de observaciones en muestras independientes.
3. Concordancia de asociación con fenotipos secundarios.
4. Características de la población:
 - a. Conservación del equilibrio de Hardy-Weinberg.
 - b. Elección adecuada del grupo control (en estudios de casos y controles).
 - c. Tamaño adecuado de la muestra.
 - d. Caracterización precisa del fenotipo.
 - e. Diseño del estudio (prospectivo mejor que retrospectivo).
 - f. Homogeneidad étnica.
 - g. Control estadístico de las variables confundentes.
5. Adecuado poder estadístico de la asociación.
6. Especificidad del efecto.
7. Efecto dosis alélica presente.
8. Relación de los alelos con la función *in vitro* e *in vivo*.
9. Control del sesgo de estratificación de la muestra mediante marcadores neutros a lo largo del genoma.

deben de mostrar una funcionalidad y tener un significado biológico. Es deseable que los resultados tengan una alta significación estadística y sean reproducibles en otras muestras independientes. Por último deberían utilizarse marcadores neutros a lo largo del genoma para evitar el sesgo de estratificación de la población de estudio.

PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL FUTURO DE TRASPLANTE RENAL

Los estudios de polimorfismos genéticos en el campo del trasplante renal realizados hasta ahora sugieren que, aparte de los factores de riesgo clásicos, pueda existir un componente genético asociado a la aparición y progresión de la NCT. La existencia de una susceptibilidad genética aporta una excelente explicación a la variabilidad individual en la evolución del trasplante. Dada la complejidad de factores y procesos biológicos implicados en la patogenia de la NCT, es probable que, al igual que en otras enfermedades complejas, sean distintas variantes genéticas las implicadas, y que su efecto sea la consecuencia de la interacción de estas variables entre sí, y con distintos factores ambientales. Nos encontramos en la fases iniciales de este área de trabajo, y aún es prematuro el pretender establecer un perfil de riesgo en el paciente de acuerdo con estas variables genéticas. En el futuro, la aplicación de distintos avances tecnológicos en el campo de la biología molecular permitirá analizar de manera simultánea y más sencilla un gran número de variantes genéticas. La aplicación de estas técnicas en am-

plios estudios poblacionales permitirá determinar el perfil de riesgo genético en estos pacientes y con ello, su aplicación a la práctica clínica, ya que nos ayudará a individualizar el manejo y tratamiento inmunosupresor más adecuado para cada paciente, en función de este riesgo genético y del resto de variables habitualmente utilizadas hasta ahora en la práctica clínica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Renal Data System: USRDS 1998 annual data report. Bethesda, Md: National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases, april 1998: 39 (NIH publication no. 98-3176).
2. Racusen LC, Solez K, Colvin RB y cols.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55: 713-23, 1999.
3. Akalin E, Murphy B: Gene polymorphisms and trasplantation. *Curr Op Immunol* 13: 572-6, 2001.
4. Hahn AB, Kasten-Jolly JC, Constantino DM y cols.: TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. *Transplantation* 72: 660-5, 2001.
5. Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG y cols.: A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transplant Immunol* 8: 237-44, 2001.
6. Melk A, Henne T, Kollmar T y cols.: Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. *Kidney Int* 64: 314-20, 2003.
7. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR y cols.: Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transplant Immunol* 8: 259-65, 2001.
8. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P y cols.: Association of polymorphisms on the human interferon-gamma and interleukin 10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on trasplantation. *Trasplantation* 71: 674-7, 2001.
9. Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B y cols.: The interleukin-6-174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int* 62: 1824-7, 2002.
10. Íñigo P, Lario S, Campistol J y cols.: Papel de los polimorfismos del gen del transforming growth factor beta1 en el desarrollo de nefropatía crónica del injerto en pacientes trasplantados renales. *Nefrología* 23: 312-20, 2003.
11. Fischereder M, Luckow B, Hoher B y cols.: CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 357: 1758-61, 2001.
12. Abdi R, Huong TT, Sahagún-Ruiz A y cols.: Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13: 754-8, 2002.
13. Kruger B, Schroppel B, Ashkan R y cols.: A monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13: 2585-9, 2002.
14. Chow KM, Szeto CC, Szeto CY y cols.: Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism is associated with progressive renal dysfunction after acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 74: 1791-4, 2002.
15. Lahlou A, Peraldi MN, Thervet E y cols.: Chronic graft dysfunction in renal transplant patients: role of plasminogen activator inhibitor type 1. *Transplantation* 27: 1290-5, 2002.

M. COBO y cols.

16. Fischereder M, Goring P, Schneeberger H y cols.: Early loss of renal transplants in patients with thrombophilia. *Transplantation* 1998; 936-9, 1998.
17. Heidenreich S, Dercken C, August C y cols.: High rate of acute rejections in renal allograft recipients with thrombotic risk factors. *J Am Soc Nephrol* 9: 1309-13, 1998.
18. Heidenreich S, Junker JR, Wolters H y cols.: Outcome of kidney transplantation in patients with inherited thrombophilia: data of a retrospective study. *J Am Soc Nephrol* 14: 234-9, 2003.
19. Ekberg H, Svensson PJ, Simanaitis M y cols.: Factor V R506Q mutation (activated protein C resistance) is an additional risk factor for early graft loss associated with acute vascular rejection. *Transplantation* 69: 1577-81, 2000.
20. Irish AB, Green FR, Gray DW y cols.: The factor V Leiden (R506Q) mutation and risk of thrombosis in renal transplant recipients. *Transplantation* 64: 604-7, 1997.
21. Salido E, Martín B, Barrios Y y cols.: The PLA2 polymorphism of the platelet glycoprotein IIIA gene as a risk factor for acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 10: 2599-605, 1999.
22. Oh J, Dchaefer F, Veldmann A y cols.: Heterozygous prothrombin gene mutation: a new risk factor for early renal allograft thrombosis. *Transplantation* 68: 575-81, 1999.
23. Fischereder M, Schneeberger H, Lohse P y cols.: Increased rate of renal transplant failure in patients with the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Am J Kidney Dis* 38: 1061-1064, 2001.
24. Viklicky O, Hubacek JA, Vitko S y cols.: G-protein beta-3-subunit and eNOS gene polymorphism in transplant recipients with long-term renal allograft function. *Kidney Blood Press Res* 25: 245-9, 2002.
25. Shenker NS, Haldar NA, Reilly JJ y cols.: The impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on long-term renal allograft outcome. *Transpl Int* 16: 391-395, 2003.
26. Beige J, Engeli S, Ringel J y cols.: Donor G Protein $\beta 3$ Subunit 825 TT Genotype is associated with Reduced Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol* 10: 1717-21, 1999.
27. Wuthrich RP, Cicvara S, Widmer U y cols.: The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit beta3 does not influence blood pressure and renal function in kidney transplants recipients. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1663-6, 2000.
28. Beige J, Kreutz R, Tscherkaschina I y cols.: Matrix analysis for the dissection of interactions of G-protein beta3 subunit C825T genotype, allograft function, and posttransplant hypertension in kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 40: 1319-24, 2002.
29. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G y cols.: Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: a role for angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) polymorphism? *J Am Soc Nephrol* 9: 2075-81, 1998.
30. Filler G, Yang F, Martin A y cols.: Renin-angiotensin system gene polymorphisms in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 5: 166-73, 2001.
31. Abdi R, Huang T, Zee R y cols.: Angiotensin gene polymorphism as a determinant of posttransplantation renal dysfunction and hypertension. *Transplantation* 72: 726-9, 2001.
32. Prasad GV, Pinnaduwaage D, Parkes RK y cols.: Angiotensinogen M235T genotype predicts progression in chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 75: 209-16, 2003.
33. Beige J, Offermann G, Distler A y cols.: Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion genotype and long-term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 13: 735-38, 1998.
34. Beige J, Scherer S, Weber A y cols.: Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 8: 1319-23, 1997.
35. Beige J, Weber S, Engeli S y cols.: Angiotensinogen-M235T and post-transplant hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 11: 1538-41, 1995.
36. Liangos O, Kreutz R, Beige J y cols.: Methylenetetrahydrofolate-reductase gene C677T variant and kidney-transplant survival. *Nephrol Dial Transplant* 13: 2351-4, 1998.
37. Hagen W, Fodinger M, Heinz G y cols.: Effect of MTHFR genotypes and hyperhomocysteinemia on patient and graft survival in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 59 (Supl. 78): S253-7, 2001.
38. Roussos L, Flor C, Carlson J y cols.: Increased prevalence of apolipoprotein E3/E4 genotype among Swedish renal transplant recipients. *Nephron* 83: 25-30, 1999.
39. Cofan M, Cofan F, Campos B y cols.: Effect of apolipoprotein polymorphisms in renal transplants recipients. *Transplant Proc* 35: 1725-6, 2003.
40. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V y cols.: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13: 260-4, 2002.
41. McLaren AJ, Marshall SE, Haldar NA y cols.: Adhesión molecule polymorphisms in renal allograft failure. *Kidney Int* 55: 1977-82, 1999.
42. Marshall SE, McLaren AJ, Haldar NA y cols.: The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 70: 1485-9, 2000.
43. Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF y cols.: Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 71: 469-76, 2001.
44. Kimball P, Reid F: Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms associated with urinary tract infections after renal transplantation. *Transplantation* 73: 1110-2, 2002.