



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL
CURSO DE POSGRADO EN NEFROLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN RENAL DE LA
“MOLECULA DE DAÑO RENAL TIPO-1” (Kim-1) EN
PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL

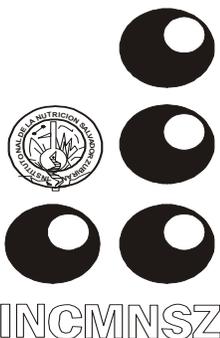
T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD DE:
NEFROLOGÍA

PRESENTA:
DR. ANTONIO ENRIQUE CATANEO DAVILA

TUTOR:

Dr. RICARDO CORREA ROTTER



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

A MI MADRE:

A quien le debo todo lo que soy y lo que puedo llegar a ser. Esto es para tí donde quiera que te encuentres.

A MI PADRE:

Por tu guía y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

A REGINA:

Por tu amor y comprensión en todos estos años. Gracias por ser el pilar de mi vida y compartir este sueño, este logro también es tuyo.

A MIS HERMANAS:

Gracias por su apoyo en los momentos más difíciles.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Gracias por todos los momentos compartidos.

A LOS DOCTORES

RICARDO CORREA ROTTER Y LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO.

A LAS DOCTORAS

JOSEFINA ALBERU GOMEZ Y NORMA BOBADILLA SANDOVAL:

Por su dedicación e interés y gracias a quienes este trabajo fue posible.

ÍNDICE:	Página:
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- RESUMEN	2
III.- MARCO TEÓRICO	4
IV.- OBJETIVOS	14
V.- HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
VI.- JUSTIFICACIÓN	15
VII.- METODOLOGÍA	16
7.1.- TAMAÑO DE LA MUESTRA	16
7.2.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN	16
7.3.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	17
7.4.- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	17
7.5.- DISEÑO DEL ESTUDIO	18
7.6.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y AMPLIFICACION DE Kim-1 POR PCR	19
7.7.- DESENLACES	21
7.8.- VARIABLES	22
7.9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
VIII.- RESULTADOS	23
IX.- DISCUSIÓN	29
X.- CONCLUSIONES	32
XI.- BIBLIOGRAFÍA	33

PALABRAS CLAVE: Molécula de daño renal tipo 1, trasplante renal, rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto, daño tubular.

INTRODUCCIÓN

El rechazo agudo y/o crónico a un riñón trasplantado continúa siendo la principal limitación al éxito del trasplante. El estándar de oro para el diagnóstico del rechazo es la biopsia del injerto. Considerando la alta incidencia de rechazo durante el primer año post-trasplante y de su repercusión negativa sobre la función del injerto a largo plazo, se requieren nuevos métodos de diagnóstico que permitan un reconocimiento temprano de este proceso.

La molécula de daño renal tipo 1 (Kim-1 por sus siglas en inglés) es una proteína de membrana tipo I y su expresión es principalmente renal. Se sabe que en condiciones normales la expresión renal de Kim-1 es baja, sin embargo, se ha descrito que los niveles de ARNm de Kim-1 se sobre-expresan en procesos de isquemia-reperfusión o secundario a daño tóxico por fármacos.

La sobre-expresión renal de ARNm de Kim-1 sugiere un proceso patológico en evolución, esta sobre-expresión está asociada a la dediferenciación de células epiteliales tubulares. Se desconoce si esta propiedad puede ser de utilidad en la detección de rechazo al injerto.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue la de evaluar la expresión renal de ARNm de Kim-1, en pacientes receptores de trasplante renal. Se obtuvo tejido renal de pacientes donadores sanos al momento de la nefrectomía, así como de receptores de trasplante renal sometidos a biopsia del injerto por indicación clínica. El tejido obtenido se conservó en una solución de "RNA later" por 16 hrs. guardándose a una temperatura de -80°C hasta la extracción del ARN total por medio de Trizol, posteriormente se midió la expresión de ARNm de Kim-1 por medio de transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-PCR) en tiempo real. Se incluyeron 35 biopsias renales de pacientes trasplantados (grupo de estudio), se dividieron en 3 subgrupos: biopsias con reporte histopatológico normal (subgrupo 1, n=6), biopsias con reporte de rechazo agudo (RA) o lesión limítrofe (LL) (subgrupo 2, n=6) y biopsias con reporte de nefropatía crónica del injerto (NCI) o toxicidad crónica por inhibidores de calcineurina (ICN) (subgrupo 3, n=23). Al no existir un valor estandarizado para la expresión renal de ARNm de Kim-1 se tomó el valor promedio de la expresión de ARNm de 11 biopsias renales de donadores sanos al momento de la nefrectomía (grupo control), asignándose un valor de 1. Cuando se comparó el valor promedio de ARNm de Kim-1 del grupo de estudio se observó una diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo control (46.9 ± 99 vs. 1 $p<0.001$). Aunque al hacer la comparación por subgrupos se observó que solamente los subgrupos 2 y 3 tenían diferencia estadísticamente significativa en

los valores de ARNm de Kim-1 en relación al grupo control (4.31 ± 3.1 vs. 1 y 69.8 ± 116 vs. 1, $p=0.03$ y $p<0.001$ respectivamente). Al comparar el valor de ARNm de Kim-1 entre los diferentes subgrupos del grupo de estudio, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el subgrupo 3 en comparación al subgrupo 1 (69.8 ± 116 vs. 1.8 ± 1.3 $p<0.01$). En pacientes receptores de trasplante renal con evidencia histológica de RA, LL, NCI o toxicidad por ICN, la expresión renal de ARNm de Kim-1 se encontró incrementada en forma significativa en relación al grupo control. Kim-1 puede ser un marcador potencialmente útil para la detección de daño tubular agudo o crónico asociado a rechazo del injerto. Se requieren estudios adicionales para explorar su correlación tanto clínica como histopatológica.

MARCO TEÓRICO

En 1998 Ichimura, Bonventre y cols. utilizando un modelo de isquemia renal, informaron la identificación de una nueva proteína de membrana tanto en modelos murinos como en humanos, que contenía un dominio tipo inmunoglobulina característico y un dominio tipo mucina, denominándose a dicha proteína “molécula de daño renal tipo 1” (Kim-1 por sus siglas en inglés)⁽¹⁾.

Estructuralmente Kim-1 es una proteína de membrana tipo I de aproximadamente 359 aminoácidos y su expresión es predominantemente renal. Su estructura proteica revela que el extremo amino de localización extracelular está compuesto por un dominio tipo inmunoglobulina con 6 cisteínas y un dominio tipo mucina; el primero ha sido implicado en las interacciones célula-célula y célula-proteínas de la matrix extracelular, el dominio mucina pudiera tener un papel tanto en la protección, como en la adhesión celular, en este extremo se han localizado múltiples sitios de glucosilación. Por otro lado, el dominio carboxilo se encuentra intracelularmente, en el se han localizado sitios potenciales de fosforilación que podrían estar involucrados con la transducción de señales al interior de la célula ^(1,2,3).

En condiciones normales la expresión renal de Kim-1 es muy baja, sin embargo se ha observado, mediante estudios de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ*, que Kim-1 se sobre-expresa en las células epiteliales dediferenciadas

(vimentina positivas) y en proliferación (bromodeoxiuridina positivas) del túbulo proximal y en las células del asa de Henle después de procesos de isquemia-reperfusión o secundario a daño tóxico por fármacos como el ácido fólico y el cisplatino ^(1,4,5).

El remodelamiento de la arquitectura tisular que ocurre durante el desarrollo también se presenta durante la reparación de los tejidos después de una lesión. Las células pueden proliferar, diferenciarse o caer en apoptosis, todo esto basado en las señales que reciben del medio extracelular. Para la mayoría de las células este desenlace depende de los factores de crecimiento solubles y del grado de adhesión a la matrix extracelular o a las células adyacentes.

Las moléculas/receptores de adhesión celular son glucoproteínas de membrana que actúan en la superficie celular para mediar interacciones específicas con otras moléculas de adhesión de células adyacentes o con proteínas de la matrix extracelular. Las moléculas de adhesión celular se clasifican en diversas familias dependiendo su estructura e incluye a las integrinas, cadherinas, selectinas y a la superfamilia de inmunoglobulinas. Estas moléculas pueden influir en la expresión de factores de crecimiento y por el contrario, dichos factores pueden modular la producción de las moléculas de adhesión celular y la expresión de proteínas de la matrix extracelular. Kim-1 es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas siendo semejante a la molécula de adhesión celular de adresina-1 (MAdCAM-1) ^(1,2,3).

Durante el proceso de reparación del túbulo proximal, el epitelio tubular pasa por diversas etapas que incluyen: 1) muerte celular y formación de cilindros en la luz tubular; 2) proliferación de las células epiteliales sobrevivientes; 3) formación de un epitelio de regeneración pobremente diferenciado sobre la membrana basal desnuda (este epitelio simplificado expresa a la vimentina como un marcador mesenquimatoso); y 4) diferenciación del epitelio en regeneración para formar células epiteliales totalmente funcionales.

La estructura y expresión de Kim-1 sugiere que es una molécula de adhesión celular sobre-expresada en células epiteliales del túbulo proximal en regeneración.

En humanos se detectó y cuantificó Kim-1 mediante ELISA en orina de individuos que presentaban necrosis tubular aguda; por el contrario, no se detectó en el grupo de individuos sanos. Estudios en animales mostraron, al igual que en humanos, que Kim-1 prácticamente no se expresa en el riñón de ratas normales pero es inducida en ratas sometidas a isquemia/reperfusión ^(3,5).

En la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán se llevaron a cabo diversos estudios en modelos murinos en donde las ratas eran sometidas a isquemia renal bilateral por diferentes periodos de tiempo (de 10 a 45 minutos), con un periodo de reperfusión de 24 hrs. posterior al cual eran sacrificadas. A las ratas se les determinó función renal,

proteinuria total, niveles de ARNm de Kim-1 en tejido renal por medio de TR-PCR en tiempo real, y de proteína de Kim-1 en orina (por medio de ELISA). Se observó a los 20 minutos de isquemia una disminución significativa de la función renal en comparación al grupo control, sin embargo no se observó una proteinuria significativa hasta los 45 minutos de isquemia. También se observó que los niveles de ARNm en tejido renal y de los niveles urinarios de la proteína de Kim-1 aumentaron de manera progresiva conforme aumenta el periodo de isquemia. Hubo una correlación inversamente proporcional entre la función renal y la expresión renal de ARNm de Kim-1: conforme se redujo la función renal aumentó la expresión de Kim-1 de manera significativa. Al realizar el análisis de los niveles urinarios Kim-1 se observó un aumento estadísticamente significativo en la excreción desde los 10 minutos de isquemia en comparación al grupo control ⁽⁶⁾.

Por otra parte en un modelo en ratones con enfermedad renal poliquística autosómica dominante (en donde se considera que la isquemia local, conjuntamente a la dediferenciación y proliferación de las células tubulares pueden tener un rol importante en la fisiopatología de esta enfermedad) se investigó la expresión renal de Kim-1 encontrándose una mayor expresión de la proteína de Kim-1 (por medio de Western Blot e inmunohistoquímica) en el tejido renal de ratones con enfermedad poliquística en comparación a los ratones normales ⁽⁷⁾.

Adicionalmente se ha descrito una sobre-expresión de la proteína de Kim-1 en pacientes con carcinoma renal, particularmente en carcinoma papilar y de células claras (que se consideran derivan de las células epiteliales del túbulo proximal), así mismo los niveles urinarios de Kim-1 se encontraban incrementados en estos pacientes. De los pacientes en los que se determinó los niveles urinarios antes y después de la nefrectomía se observó una disminución de los niveles urinarios de Kim-1 posterior a la nefrectomía a valores casi indetectables. Por lo que Kim-1 puede servir como un biomarcador para el diagnóstico y/o seguimiento de pacientes con carcinoma renal ⁽⁸⁾.

Recientemente Mukherjea y cols. demostraron por primera vez la expresión de ARNm de Kim-1 en una localización extrarenal. En un modelo murino de ototoxicidad secundaria a la administración de cisplatino, observó que el ARNm de Kim-1 se encontraba presente en la cóclea de ratas normales aunque en una cantidad menor en comparación a la corteza renal de las mismas ratas. Posterior a la administración de cisplatino, se observó un incremento de ARNm de Kim-1 a nivel de la cóclea de hasta 12 veces en comparación de los controles a las 72 hrs. de administrado el cisplatino, por otro lado la expresión renal de ARNm de Kim-1 incrementó unas 200 veces posterior a la administración del cisplatino en comparación a los controles ⁽⁹⁾.

Por todo lo anterior, la sobre-expresión renal de Kim-1 sugiere un proceso patológico en desarrollo resultando en la dediferenciación y proliferación de las

células epiteliales tubulares. Esta propiedad puede ser de utilidad en la detección de rechazo al injerto renal. Actualmente se desconoce si Kim-1 es un biomarcador específico útil para detectar la presencia de rechazo en el injerto renal.

El éxito de un trasplante renal (o de cualquier órgano) es medido por la combinación de la sobrevida del propio injerto, así como la disminución al mínimo posible de las complicaciones. Esta sobrevida del injerto se logra por medio de algún método de inmunosupresión/inmunomodulación con el objetivo de que el injerto no sea reconocido por el sistema inmune del receptor como extraño.

El rechazo del injerto continúa siendo la principal limitación al éxito del trasplante. Este proceso de rechazo, el reconocimiento e inicio de una respuesta inmune contra el injerto por el sistema inmune del receptor, inicia desde la colocación del riñón. Casi inmediatamente los antígenos del donador ingresan al sistema circulatorio y linfático del receptor accediendo al sistema linfoide secundario (bazo y ganglios linfáticos) donde la células T nativas son activadas, iniciando la generación de una respuesta inmune específica a los antígenos del donador, resultando en un reconocimiento directo e indirecto del injerto que culmina con la destrucción del mismo ⁽¹⁰⁾.

Se han descrito varios tipos de rechazo del injerto: rechazo hiperagudo, rechazo agudo celular, rechazo humoral mediado por anticuerpos y la nefropatía crónica del injerto:

1.-El rechazo hiperagudo se presenta a los pocos minutos de realizada la perfusión del injerto; infrecuente debido a la realización de las pruebas cruzadas pretrasplante. Obedece a anticuerpos preformados específicos dirigidos contra antígenos endoteliales del injerto siendo la mayoría anticuerpos anti-HLA.

2.-El rechazo agudo celular representa el 70 al 85% de los rechazos agudos, típicamente se presenta entre los 7 y 30 días post-trasplante, aunque puede presentarse después de varios años y es secundario a la infiltración del injerto con células T, la producción de diversas citocinas y el reclutamiento de otras células tales como monocitos/macrófagos y eosinófilos. Los hallazgos histopatológicos incluyen infiltración del epitelio tubular por linfocitos (tubulitis) y edema intersticial, la mayoría de las células halladas son células T (CD8 y CD4), algunas células B y células plasmáticas.

3.-El rechazo humoral/mediado por anticuerpos, representa del 5 al 10% de los rechazos agudos, puede estar presente desde varias horas a algunas semanas post-trasplante, es producido por anticuerpos específicos presensibilizados contra el donador (IgG) con depósito de los mismos en el injerto, activación del complemento y reclutamiento de linfocitos y polimorfonucleares. A nivel

histopatológico se puede observar necrosis fibrinoide de la pared vascular, glomerulonefritis aguda con infiltración del glomérulo con mononucleares, polimorfonucleares y tinción + para C4d en capilares peritubulares. Actualmente la incidencia reportada de rechazo agudo va del 10 al 25% durante el primer año post-trasplante ⁽¹⁰⁾.

4.-La nefropatía crónica del injerto es secundaria a una combinación de una respuesta inmune contra el injerto, daño farmacológico, la respuesta al daño y una variedad de factores que incluyen: daño tubular temprano post-trasplante, formación de radicales libres de oxígeno, isquemia crónica, hipertensión arterial, proteinuria, infecciones, incremento del factor de crecimiento transformante beta, entre otros. En la biopsia renal se puede observar principalmente glomeruloesclerosis, duplicación de la membrana basal glomerular, atrofia tubular, fibrosis túbulo-intersticial, proliferación de la íntima vascular, simplificación del epitelio tubular ⁽¹⁰⁾. A un año post-trasplante más del 90% de las biopsias, aún en pacientes con adecuada evolución (biopsias anuales protocolizadas), presentan algún grado de nefropatía crónica ^(10,11).

El estándar de oro para el diagnóstico del rechazo es la biopsia renal del injerto. La frecuencia de complicaciones graves de este procedimiento es baja. En un estudio que incluyó a más de 650 biopsias de injertos renales, no hubo muertes ni pérdidas del injerto por complicaciones relacionadas a la biopsia. El sangrado fue la complicación principal, se observó hematuria macroscópica y microscópica

en el 9 y 64% de los casos respectivamente, el 1.1% del total de los casos requirió transfusión sanguínea, y en el 0.4% se realizó embolización del sitio de sangrado ^(12,13).

Considerando la alta incidencia de rechazo durante el primer año post-trasplante y de su negativa repercusión sobre la función del injerto a largo plazo, se han evaluado nuevos métodos de diagnóstico que pudieran permitir un reconocimiento temprano de este proceso.

Varios grupos han evaluado diversos biomarcadores de rechazo renal, como por ejemplo el grupo del Dr. Suthanthiran encontró que la expresión de ARNm de granzima B y perforina en células urinarias descamadas se encontraban elevadas en el rechazo agudo, pudiendo servir como un método no invasivo para la detección de rechazo agudo⁽¹⁴⁾. Adicionalmente este mismo grupo demostró en células urinarias descamadas una sobre-expresión de ARNm de CD103, molécula de superficie encontrada en células T y que interactúa con la E-cadherina expresada en las células epiteliales tubulares, en pacientes con evidencia de tubulitis/rechazo agudo ⁽¹⁵⁾. Lederer y cols. observaron una mayor excreción urinaria de diversas moléculas de adhesión celular, así como de C4d en pacientes con rechazo agudo ⁽¹⁶⁾. Muthukumar y cols. encontraron que el inhibidor de la serin proteinasa 9, un bloqueador endógeno de la vía de granzima B/perforina se encontraba sobre-expresada durante episodios de rechazo agudo ⁽¹⁷⁾. Por otra parte el grupo del Dr. Halloran encontró mayor expresión renal de

p16INK4a, un inhibidor del ciclo celular, asociado generalmente al envejecimiento de las células somáticas, en pacientes con atrofia tubular y/o fibrosis atribuidas a nefropatía crónica del injerto, correlacionándose con una peor evolución en la función del injerto en relación a los que no presentaron dicho incremento ⁽¹⁸⁾.

Todo esto ejemplifica el interés actual y la necesidad de evaluar nuevos métodos de diagnóstico temprano del rechazo, agudo o crónico, por lo que Kim-1 pudiera ser un biomarcador útil para la detección de rechazo al injerto renal.

OBJETIVOS

1.-Determinar si en presencia de rechazo agudo y/o crónico en el injerto renal la expresión de ARNm de Kim-1 se encuentra elevada.

2.-Determinar si los valores de ARNm de Kim-1 pueden servir para diferenciar entre el rechazo agudo del crónico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.-La expresión renal de Kim-1 se encontrará elevada en pacientes con evidencia histológica de rechazo agudo.

2.-La expresión renal de Kim-1 se encontrará elevada en pacientes con evidencia histológica de rechazo crónico.

3.-La expresión renal de Kim-1 no se modificará en pacientes sin evidencia histológica de algún tipo de rechazo.

JUSTIFICACIÓN

El rechazo agudo y/o crónico continúan siendo las causas más frecuentes de pérdida del injerto renal. Su diagnóstico y tratamiento oportuno puede mejorar el pronóstico del injerto, por lo que se requiere la evaluación de nuevos métodos que permitan una detección temprana del mismo.

METODOLOGÍA

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Por tratarse de un estudio exploratorio el tamaño de la muestra no está basado en consideraciones estadísticas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.-Pacientes donadores renales sanos, en protocolo de estudio para donación renal (grupo control).

- 2.-Pacientes receptores de trasplante renal (donador vivo o cadavérico) en quienes se les realizará biopsia del injerto renal (indicado por los médicos de los Departamentos de Trasplantes o Nefrología) por sospecha de rechazo agudo, deterioro crónico de la función renal o al cumplir un año post-trasplante (grupo de estudio).

- 3.-Que no participen en ningún otro protocolo de investigación

- 4.-Consentimiento informado por escrito (el paciente o responsable legal).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1.-Paciente trasplantado quien tenga contraindicación para realización de biopsia renal, aún cuando reúna criterios clínicos que justifiquen la realización de la misma (rechazo agudo o deterioro crónico).

2.-Paciente o responsable legal incapaz o renuente de dar consentimiento informado por escrito.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1.-Pacientes en los que no se logró obtener suficiente tejido renal para el análisis.

2.-Evidencia histopatológica de necrosis tubular aguda.

3.-Evidencia histopatológica de glomerulopatías (recurrencias o de novo).

4.-Evidencia histopatológica sugestiva de infección por BK-virus.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, controlado y abierto, donde se comparó la expresión en tejido renal de ARNm de Kim-1 entre 2 grupos:

El primer grupo corresponde a los donadores renales vivos (grupo control) en quienes se les tomó una biopsia renal al momento de la procuración del riñón, registrándose el tiempo de isquemia caliente y de isquemia fría hasta la toma de la biopsia. Se realizó un primer pase al riñón, el cilindro obtenido se destinó a su análisis histopatológico, posteriormente se realizó un segundo pase y el cilindro obtenido se sumergió inmediatamente en “RNA later” por espacio de 16 hrs. y posteriormente se conservó a – 80° C hasta la extracción a partir del tejido renal del ARN total.

El segundo grupo corresponde a los receptores de trasplante renal (grupo de estudio) en quienes se les realizó una biopsia renal del injerto por sospecha clínica de rechazo agudo, deterioro crónico de la función renal o al cumplir un año post-trasplante (biopsia protocolizada). Se realizó un primer pase al injerto, el cilindro obtenido se destinó a su análisis histopatológico, en caso de haberse obtenido suficiente material para su estudio, de mantenerse la presión arterial sistólica mayor a 105 mmHg y menor de 140 mmHg y de no presentar el paciente dolor significativo en la zona de la biopsia, se realizó un segundo pase, el cilindro obtenido se sumergió inmediatamente en “RNA later” por espacio de

16 hrs. y posteriormente se conservó a -80°C hasta la extracción a partir del tejido renal del ARN total. En caso de que en el primer pase al injerto no se obtuviera suficiente tejido para su estudio histopatológico, el material obtenido de los pases posteriores se destinó únicamente a su estudio histopatológico, por lo que para fines del protocolo el paciente fue sometido a un máximo de 2 pases al injerto renal (procedimiento usual y rutinario en estos casos).

Las biopsias fueron indicadas y realizadas por médicos del Departamento de Trasplantes. Los resultados histopatológicos de las biopsias obtenidas se revisaron con la nefropatóloga del Instituto y en el caso del grupo de estudio las biopsias se estratificaron en 3 subgrupos: 1) Normales, 2) Rechazo agudo o lesión limítrofe y 3) Nefropatía crónica del injerto o toxicidad por inhibidores de calcineurinas.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y AMPLIFICACION DE Kim-1 POR PCR

El ARN total del tejido renal se extrajo utilizando Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se determinó la concentración e integridad del ARN total mediante espectrofotometría de luz ultravioleta (uv) y geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 1 μg de ARN total, se ajustó a un volumen de 11 μl con agua grado biología molecular, incubándose con 9 μl

de una mezcla conteniendo 200 U unidades de transcriptasa reversa (MMLV Invitrogen), 100 pmol de hexámeros, 0.5 mM de cada nucleótido (dNTP) y 1x de buffer RT. La reacción se incubó a 37° C durante 1 hora y al finalizar se calentó a 95° C por 5 minutos para desnaturalizar la enzima, finalmente se agregaron 20 µl de agua para completar un volumen final de 40 µl.

La amplificación de Kim-1 se realizó mediante PCR en tiempo real, esta es una técnica que mide la acumulación del producto de PCR en un número de ciclos predeterminado. Esta cuantificación se efectúa mediante la colocación de un reportero, específicamente un colorante fluorescente ligado a extremo 5' de la sonda de hibridación. Durante la fase de la extensión del ciclo de PCR, se rompe la sonda de hibridación unida a la cadena de ADN por la actividad 5' nucleasa de la Taq ADN polimerasa. La degradación por la nucleasa emite fluorescencia del colorante dando por resultado un aumento en la emisión máxima del colorante.

El Ct está definido como un número de ciclos fraccionario al cual la fluorescencia generada por la ruptura de la prueba supera la fluorescencia de fondo, es decir 10 veces la desviación estándar de la línea base.

Las sondas de KIM-1 humano y 18S (este último como control interno) fueron diseñadas en base a la secuencia reportada por el Gene Bank y fabricadas por Applied biosystems. Se realizaron curvas estándar a partir de diluciones seriadas

de ADNc para conocer la concentración adecuada de ADNc a la que se amplificarán de manera rutinaria las muestras.

Las reacciones de PCR se realizaron con 5 µl de ADNc, 12.5 µl de buffer 2X universal Taqman Mastermix (Applied Biosystems) y 2.5 µl de cada sonda: Kim-1 (Hs00273334_m1 Applied Biosystems) y 18S (4310893E Applied Biosystems), además de 5 µl de agua grado biología molecular hasta un volumen final de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron por triplicado en un termociclador ABI-PRISM 7000 Applied biosystems, con las siguientes condiciones, 2 minutos a 55° C, 10 minutos a 95° C, seguido por 50 ciclos que constó de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C cada uno.

Los niveles de KIM-1 se cuantificaron como la diferencia de Ct de Kim-1 y 18 S. Se estableció que los niveles de ARNm de Kim-1 en el grupo control fueran de 1 y se comparó con los niveles de ARNm del grupo de estudio ⁽¹⁹⁾.

DESENLACES

El desenlace primario fue la diferencia de los niveles de ARNm en tejido renal entre el grupo control y el grupo de estudio estratificado este último de acuerdo a los hallazgos histopatológicos (normal, rechazo agudo y/o lesión limítrofe, rechazo crónico y/o toxicidad por inhibidores de calcineurina).

VARIABLES

Se analizaron las siguientes variables: edad, género, índice de masa corporal, presencia de diabetes mellitus e hipertensión arterial, donador vivo o cadavérico, presencia y tipo de rechazo (grupo de estudio), tiempo de isquemia fría y de isquemia caliente (grupo control), esquema de inmunosupresión.

Variables de laboratorio en sangre: creatinina sérica (CrS), nitrógeno ureico (NUS), ácido úrico, hemoglobina, glucosa, colesterol total, triglicéridos.

Variables de laboratorio en orina: micro/albuminuria. Depuración de creatinina (DCr) calculada con la fórmula de Cockcroft-Gault.

Los valores del laboratorio fueron recabados del expediente clínico al momento de que el paciente aceptó su participación en el presente estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y análisis post hoc para la medición de diferencias significativas entre las medias de los grupos. Se utilizó la U de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas.

Se consideró estadísticamente significativa a una $p < 0.05$

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 40 biopsias de injertos renales en el grupo de estudio. En 5 de las biopsias no se obtuvo suficiente material para la extracción del ARN total, por lo que solamente se incluyeron en el análisis a 35 biopsias de las 40 biopsias, agrupándose de acuerdo al reporte histopatológico en los siguientes subgrupos:

- Subgrupo 1: Biopsias con reporte histopatológico normal (n=6).
- Subgrupo 2: Biopsias con reporte histopatológico de rechazo agudo (RA) o lesión limítrofe (LL) de acuerdo a la clasificación de Banff 97 (n=6).
- Subgrupo 3: Biopsias con reporte histopatológico de toxicidad crónica por inhibidores de calcineurina (ICN) o nefropatía crónica del injerto (NCI) de acuerdo a la clasificación de Banff 97 (n=23).

En el grupo control se incluyeron un total de 11 biopsias renales de donadores sanos al momento de la nefrectomía.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de NUS, CrS y DCr entre el grupo de estudio en comparación al grupo control (22.8 ± 13 vs. 11 ± 3.3 $p < 0.01$, 1.68 ± 1.7 vs. 0.88 ± 0.12 $p < 0.001$, 62 ± 26 vs. 112 ± 19.5 $p < 0.001$, respectivamente).

.Las características demográficas y de laboratorio de ambos grupos se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas y de laboratorio

	Grupo control N=11	Grupo de estudio N=35	P
Género (Hombres)	7 (63.6%)	13 (37.1%)	NS
Edad (años)	29.4±7	33.8±12	NS
IMC (kg/m ²)	24.09±1.9	24.1±5.2	NS
Glucosa (mg/dL)	80±13	89±17	NS
NUS (mg/dL)	11±3.3	22.8±13	<0.01
CrS (mg/dL)	0.88±0.12	1.68±1.7	<0.001
Hemoglobina (g/	14.8±1.6	13.5±2	NS
Acido Urico	5.0±0.86	5.9±1.3	NS
Albúmina Sérica (g/dL)	4.01±0.19	3.9±0.4	NS
Colesterol Total	170±40	176±25	NS
Triglicéridos	133±43	139±61	NS
Indice AlbU/CrU (g/g)	0	0.15±0.36	NS
Depuración de Creatinina (ml/min) (Cockcroft-Gault)	112±19.5	62±26	<0.001
Tiempo de isquemia caliente (minutos)	2.1±0.46	NA	NA
Tiempo de isquemia fría (minutos)	8.8±2.47	NA	NA

NA= No aplica NS=No significativa

Al comparar los tres subgrupos del grupo de estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CrS entre el subgrupo 2 en comparación del subgrupo 1 (1.55±0.4 vs. 1.02±0.3 p<0.01) y de triglicéridos entre el subgrupo 2 en comparación del subgrupo 1 y 3 (201±105 vs. 111±40 p<0.01 y 201±105 vs. 130±39 p<0.01, respectivamente)

Las características demográficas y de laboratorio se observan en la tabla 2.

**Tabla 2. Características demográficas y de laboratorio
(Subgrupos de estudio)**

	Subgrupo 1 (n=6)	Subgrupo 2 (n=6)	Subgrupo 3 (n=23)	P
Género (Hombres)	3 (50%)	3 (50%)	7 (43.7%)	NS
Edad (años)	38±16	24±7	35±11	NS
IMC (kg/m ²)	22±2	21±2.2	25±6	NS
DM	0	0	1 (3.8%)	NS
HAS	1 (16.6%)	2 (33.3%)	14 (60.8%)	NS
Inmunosupresión				
• Esteroides	6 (100%)	6 (100%)	23 (100%)	NS
• ICN	6 (100%)	6 (100%)	23 (100%)	NS
• MMF	6 (100%)	4 (66.6%)	14 (60.8%)	NS
• AZA	0	2 (33.3%)	6 (26%)	NS
• Sirolimus	0	0	1 (3.8%)	NS
Donador Vivo	4 (66.6%)	6 (100%)	17 (73.9%)	NS
Glucosa (mg/dL)	95±26.4	88±9.4	88±16	NS
NUS (mg/dL)	15+/-5.1	23+/-4.7	24+/-15	NS
CrS (mg/dL)	1.02±0.3	1.55±0.4*	1.88±2.06	<0.01* vs. subgrupo 1
Hemoglobina (g/	13.1±1.7	13.6±2.1	13.5±2.1	NS
Acido Urico	5.6±1.2	5.3±1.9	6.2±1.2	NS
Albúmina Sérica (g/dL)	3.9±0.17	4.0±0.26	3.8±0.47	NS
Colesterol Total	179±22	169±19	178±27	NS
Triglicéridos	111±40	201±105*	130±39	<0.01* vs. subgrupo 1 y 3
Indice AlbU/CrU (g/g)	.006±0.01	.071±0.16	.213±.43	NS
Depuración de Creatinina (ml/min) (Cockcroft-Gault)	82±17	54±12	59±29	NS

NS=No significativa

Al no existir valores establecidos de ARNm de Kim-1 en tejido renal se tomó el valor promedio de ARNm de Kim-1 de las 11 biopsias de donadores sanos y se le asignó el valor de 1, tomando a este valor como referencia para los demás grupos.

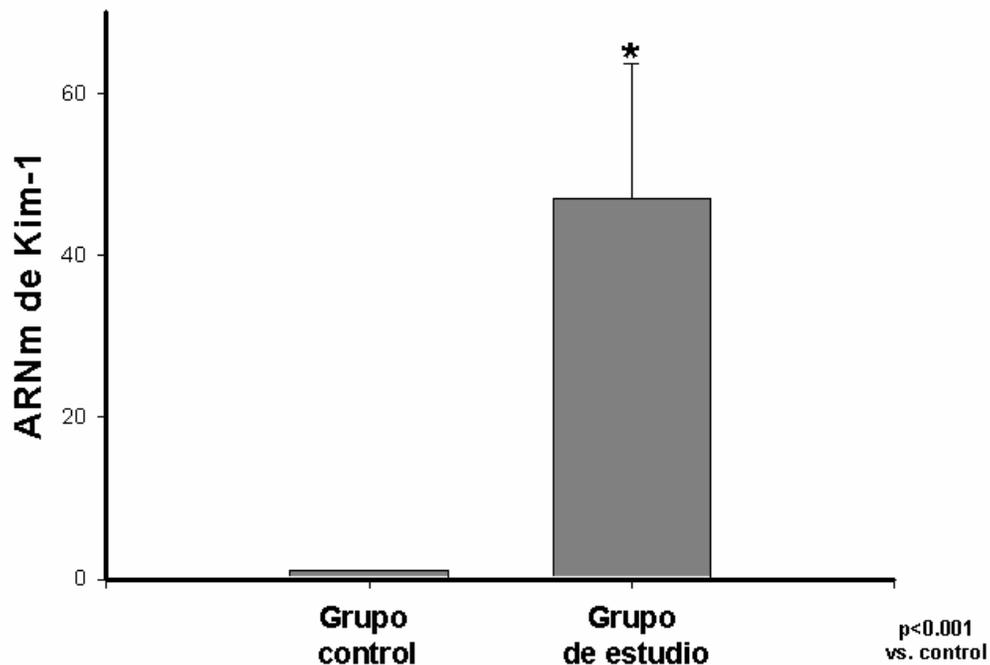
En la tabla 3 se observa la comparación del valor promedio de ARNm de Kim-1 del grupo de estudio (35 biopsias) en relación al grupo control (11 biopsias), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (46.9 ± 99 vs. 1 $p < 0.001$) (Gráfica 1).

Tabla 3. Comparación de ARNm de Kim-1 entre el grupo de estudio y el grupo control.

	Grupo control (n=11)	Grupo de estudio (n=35)	Subgrupo 1 (n=6)	Subgrupo 2 (n=6)	Subgrupo 3 (n=23)	P
ARNm Kim-1	1	$46.9 \pm 99^*$	$1.8 \pm 1.3^{***}$	$4.313. \pm 1^{**}$	$69.811 \pm 6^*$	< 0.001 *vs. grupo control 0.03 **vs. grupo control NS *** vs. grupo control

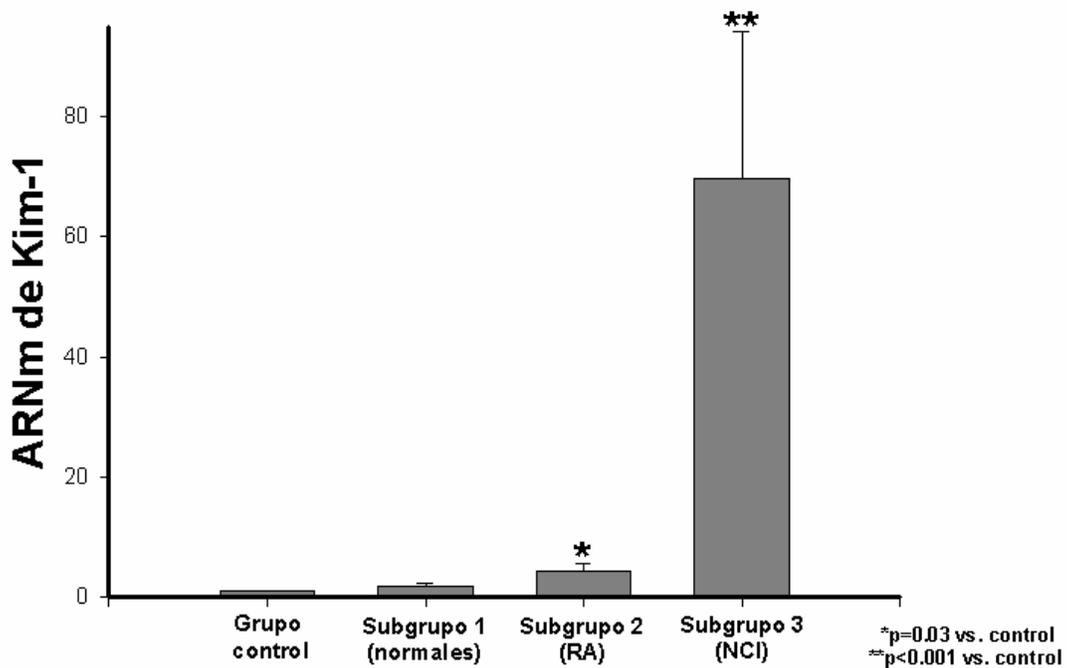
NS=No significativa

Gráfica 1. Niveles de ARNm de Kim-1 entre el grupo control y el grupo de estudio



De igual forma se observa en la tabla 3 que al comparar los valores de los subgrupos de estudio solamente los subgrupos 2 y 3 tenían diferencia estadísticamente significativa en los valores de ARNm de Kim-1 en relación al grupo control ($4.313. \pm 1$ vs. 1 $p=0.03$, 69.811 ± 6 vs. 1 $p<0.001$, respectivamente) (Gráfica 2).

Gráfica 2. Niveles de ARNm de Kim-1 entre los subgrupos de estudio y el grupo control



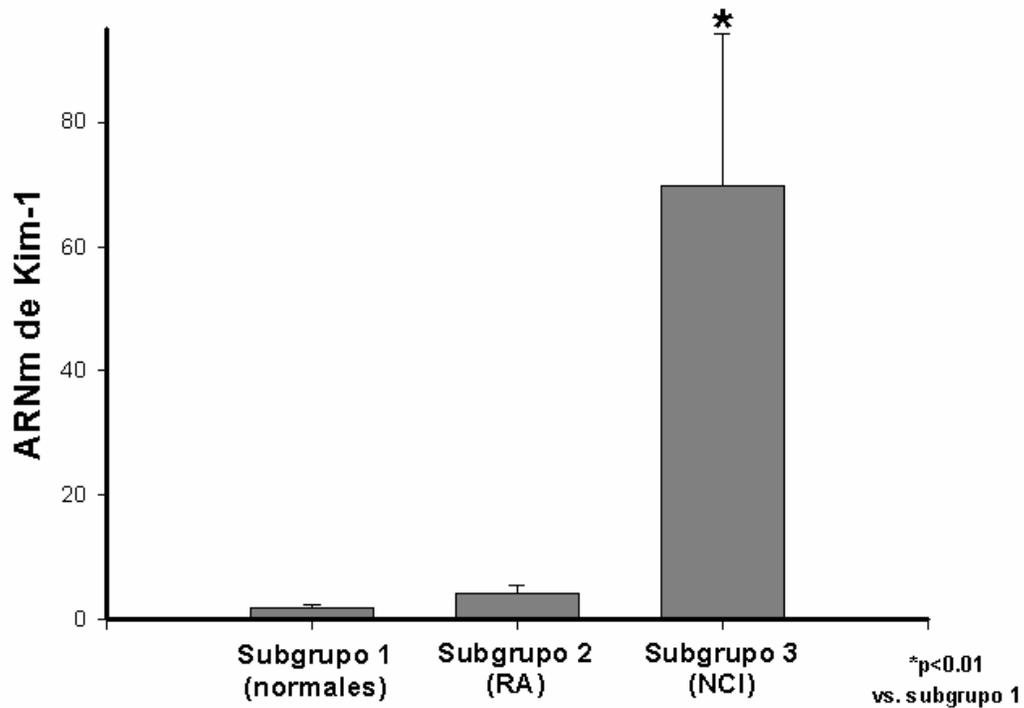
Al comparar el valor de ARNm de Kim-1 entre los diferentes subgrupos del grupo de estudio, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el subgrupo 3 en comparación al subgrupo 1 (69.8 ± 116 vs. 1.8 ± 1.3 $p<0.01$) (Tabla 4 y gráfica 3).

Tabla 4. Comparación de ARNm de Kim-1 entre los subgrupos del grupo de estudio

	Subgrupo 1 (n=6)	Subgrupo 2 (n=6)	Subgrupo 3 (n=23)	P
ARNm Kim-1	1.8±1.3	4.31±3.1**	69.8±116*	<0.01 *vs. subgrupo 1 NS ** vs. subgrupo 1

NS=No significativa

Gráfica 3. Niveles de ARNm de Kim-1 entre los subgrupos de estudio



DISCUSIÓN

En los primeros estudios realizados de Kim-1 se observó una sobre-expresión de esta proteína primordialmente en células epiteliales dediferenciadas y en proliferación del túbulo proximal posterior a daño por isquemia-reperfusión, así como por toxicidad de diversos fármacos tales como cisplatino y ácido fólico.

Estudios posteriores demostraron una sobre-expresión de Kim-1 en otras entidades en las que predominaba la dediferenciación y proliferación de las células epiteliales tubulares como es el caso del carcinoma renal en humanos y en un modelo murino de enfermedad renal poliquística.

Aún no se ha determinado el papel que juega esta proteína en la reparación del daño del epitelio tubular posterior a una daño tóxico o por isquemia-reperfusión. Se cree que pudiera estar involucrada en la migración de las células epiteliales tubulares en proliferación para cubrir nuevamente la membrana basal denudada del túbulo. Adicionalmente se piensa que el dominio mucina de esta proteína tiene que ver con la protección celular, protegiendo a la célula epitelial en regeneración de mayor daño provocado por el microambiente adverso secundario la presencia de detritus celulares y mediadores inflamatorios en la luz tubular.

Estudios previos han mostrado que Kim-1 es un biomarcador asociado a un proceso patológico en evolución a nivel del túbulo proximal, por lo que

hipotetizamos que esta propiedad podía ser de utilidad en la detección de rechazo a un riñón trasplantado.

En este estudio se encontró una mayor expresión de ARNm de Kim-1 en biopsias provenientes de injertos renales con evidencia histopatológica de daño tubular agudo o crónico en comparación a las biopsias renales provenientes de donadores sanos. Aquí cabe resaltar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión de ARNm de Kim-1 entre las biopsias de injertos renales reportadas como normales y las del grupo control, lo que sugiere que la sobre-expresión de Kim-1 no es inherente a un injerto renal por sí mismo, sino que se requiere de un proceso patológico en evolución a nivel tubular como es el caso del rechazo.

Por otra parte cuando se realizó el subanálisis del grupo de estudio, tomando como referencia los valores de Kim-1 del subgrupo 1 (biopsias de injertos renales reportadas como normales) se encontró nuevamente una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de ARNm de Kim-1 en el subgrupo 3 (biopsias con NCI o toxicidad por ICN) no así en el subgrupo 2 (biopsias con RA o LL), esto último probablemente debido a dos factores: los niveles discretamente más elevados de ARNm de Kim-1 en el subgrupo 1 en comparación del grupo control (1.8 ± 1.3 vs. 1) y al pequeño número de biopsias en el subgrupo 2, por lo que cabe esperar que al incrementar el número de biopsias en el subgrupo de RA o LL se alcance diferencia estadística.

Se observó una variabilidad importante en los valores de ARNm de Kim-1 dentro de los diversos subgrupos de estudio, esto puede deberse a diferencias en el muestreo del tejido renal, pudieron haber mayor porcentaje de fibrosis o tubulitis en unas muestras que en otras sin que esto refleje el proceso global en el injerto. Esto puede evitarse en estudios posteriores al haber métodos ampliamente disponible que permitan la cuantificación de Kim-1 en orina (actualmente en desarrollo por el grupo del Dr. Bonventre).

En este estudio se observó en forma interesante una tendencia a mayor sobre-expresión de ARNm de Kim-1 en biopsias de injertos renales con daño tubular crónico (secundario a NCI o toxicidad por ICN) en comparación de biopsias con daño tubular agudo (tubulitis).

Estos resultados son consistentes con los reportados por Sarwal y cols.⁽²⁰⁾ quienes utilizando un modelo de microarreglos en biopsias de injertos renales, encontraron una mayor expresión de genes involucrados en la proliferación y ciclo celular en el “cluster” correspondiente a las biopsias con NCI en comparación de la mayoría de las biopsias con rechazo agudo, lo que sugiere un proceso de reparación y regeneración tisular particularmente activo en las biopsias con NCI.

Falta por definir la participación de Kim-1 en el desarrollo de daño agudo y/o crónico en el contexto rechazo al injerto. Adicionalmente a su papel como biomarcador de rechazo en el injerto renal, su sobre-expresión pudiera repercutir de forma positiva o negativa sobre la función del injerto renal.

CONCLUSIONES

Kim-1 es una proteína de membrana con expresión predominantemente renal y su sobre-expresión refleja un proceso activo de daño tubular secundario a diversos agresores. Este estudio mostró por primera vez que los niveles de ARNm de Kim-1 se encuentran incrementados en biopsias provenientes de injertos renales que cursaban con algún tipo de daño tubular asociado a rechazo agudo o crónico o secundario a toxicidad por ICN, por lo que Kim-1 puede ser un biomarcador potencialmente útil para la detección de estas entidades, aunque se requieren de estudios adicionales para explorar su correlación tanto con la clínica como con los hallazgos histopatológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- T. Ichimura, J. Bonventre, V. Bailly y cols: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a Putative Epithelial Cell Adhesion Molecule Containing a Novel Immunoglobulin Domain, Is Up-regulated in Renal Cells after Injury. *JBC* 273:7 4135-4142, 1998.
- 2.-V. Bailly, Z. Zhang, W. Meier y cols : Shedding of Kidney Injury Molecule-1, a Putative Adhesion Protein Involved in Renal Regeneration. *J Biol Chem* 277: 39739–39748, 2002.
- 3.-W. Han, V. Bailly, R. Abichandani y cols: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62:237-244, 2002.
- 4.- T. Ichimura, C. Hung, S. Yang y cols: Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F552–F563, 2004.
- 5.-S. Rosen y S. Heyman: Concerns about KIM-1 as a urinary biomarker for acute tubular necrosis (ATN). *Kidney Int* 63(5): 1955, 2003.
- 6.- V. Vaidya, V. Ramirez, T. Ichimura y cols: Quantitation of Rat Urinary Kidney injury molecule-1 (rKim-1): assay for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F517–F529, 2006.
- 7.-E. Kuehn, K. Park, S. Somlo y cols: Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1326–F1336, 2002
- 8.-W. Han, A. Alinani, C. Wu y cols: Human Kidney Injury Molecule-1 Is a Tissue and Urinary Tumor Marker of Renal Cell Carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 16: 1126-1134, 2005.
- 9.-D. Mukherjea, C. Witworth, S. Nandish y cols: Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 139(2): 733-740, 2006.
- 10.-C. Davis: Transplant: Immunology and Treatment of Rejection. *American Journal of Kidney Diseases*. 43: 1116-1134, 2004.
- 11.-B. Nankivell, R. Borrows, C. Fung y cols: The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy. *N Engl J Med* 349:2326-33, 2003.
- 12.-J. Rosen y H. Heiss: Efficacy, risks and risk factors of transplant biopsies with a biopsy device. *J Am Soc Nephrol* 7: 1911, 1996.

- 13.-D. Rothstein, A. Woolf, E. Neilson y cols: The transplant recipient from initial transplant hospitalization to 1 year post transplant. *Nephrol Dial Transplant* 15 (Supp 7): 52-75, 2000.
- 14.-Suthanthiran y cols: Noninvasive surrogate for protocol biopsies of renal allografts and a mechanistic guide for the weaning of immunosuppressive therapy. Abstract. *American Journal of Transplantation* 3 (Supp 5): 448, 2003.
- 15.- Suthanthiran y cols: CD103 mRNA is hyperexpressed in urinary cells from patients with acute rejection of renal allografts: a noninvasive determination of tubulitis. Abstract. *American Journal of Transplantation* 2 (Supp 3): 339, 2002.
- 16.- S. Lederer, N. Friedrich, C. Regenbogen y cols: Non-invasive monitoring of renal transplant recipients: Urinary excretion of soluble adhesion molecules and of the complement-split product C4d. *Nephron Clin Pract* 94:c19-c26, 2003.
- 17.- A. Muthukumar, A. Rowshani, S. Florquin y cols: Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 75:1565-1570, 2003.
- 18.-A. Melk, B. Schmidt, A. Vongwiwatana y cols: Increased Expression of Senescence-Associated Cell Cycle Inhibitor p16INK4a in Deteriorating Renal Transplants and Diseased Native Kidney. *American Journal of Transplantation* 5: 1375-1382, 2005.
- 19.-D. Kielar, W. Dietmaier, T. Langmann y cols: Rapid Quantification of Human *ABCA1* mRNA in Various Cell Types and Tissues by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Clinical Chemistry* 47:12 2089–2097, 2001.
- 20.-M. Sarwal, M. Chua, N. Kambham y cols: Molecular Heterogeneity in Acute Renal Allograft Rejection Identified by DNA Microarray Profiling. *N Engl J Med* 2003;349:125-38.