



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE MEDICINA INTERNA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS
VARIABLES QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN
DE DONANTE EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI
[ADP-RIBOSA] POLIMERASA 1 (PARP1)

RAIMUNDO GARCIA DEL MORAL MARTÍN

GRANADA, 2013.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Raimundo García del Moral Martín
D.L.: GR 1903-2014
ISBN: 978-84-9083-081-9

Texto sobre derechos del documento:



Granada 2013

Raimundo García del Moral Martín y Universidad de Granada.
Contenidos distribuidos bajo la licencia Creative Commons

Granada, noviembre 2013

D. FRANCISCO O'VALLE RAVASSA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA E HISTORIA DE LA CIENCIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **“ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN DE DONANTE EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI [ADP-RIBOSA] POLIMERASA 1 (PARP1)”**, presentada por Raimundo García del Moral Martín han sido realizados bajo mi supervisión y dirección y reúnen las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda firmo la presente en

Granada a 10 de diciembre de 2013

Fdo: Francisco O'Valle Ravassa

D. PEDRO NAVARRETE NAVARRO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **“ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN DE DONANTE EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI [ADP-RIBOSA] POLIMERASA 1 (PARP1)”**, presentada por Raimundo García del Moral Martín han sido realizados bajo mi supervisión y dirección y reúnen las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda firmo la presente en

Granada a 10 de diciembre de 2013

Fdo: Pedro Navarrete Navarro

**D. ANTONIO OSUNA ORTEGA, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR
ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada:
**“ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS VARIABLES
QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN DE DONANTE
EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI [ADP-RIBOSA]
POLIMERASA 1 (PARP1)”**, presentada por Raimundo García del Moral
Martín han sido realizados bajo mi supervisión y dirección y reúnen las
condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al
grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda firmo la presente en

Granada a 10 de diciembre de 2013

Fdo: Antonio Osuna Ortega

ÍNDICE

Agradecimientos.....	9
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA TESIS DOCTORAL	
1.1 La tesis como compendio de trabajo publicados.....	13
1.2 La tesis doctoral como trabajo de investigación no publicado	14
2. TESIS DOCTORAL-PRIMERA PARTE: COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS	
2.1 Introducción.....	17
2.2 Trabajos publicados.....	21
2.3 Resumen.....	27
2.4 Objetivos de la investigación.....	28
2.5 Aportaciones del doctorando.....	29
2.6 Metodología utilizada.....	30
2.7 Resultados: Trabajos publicados.....	35
2.8 Principales resultados y análisis crítico de los mismos.	64
2.9 Conclusiones del compendio de trabajos.....	68
2.10 Enumeración de los problemas no resueltos en estos trabajos.....	69
2.11 Actualización Bibliográfica del tema.....	71
2.12 Apéndice 1: Factor de impacto, citas acumuladas y áreas temáticas de las revistas.....	73
3. TESIS DOCTORAL-SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN DE DONANTE EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI PAPEL DE LA POLI [ADP-RIBOSA] POLIMERASA 1 (PARP1)	
3.1 INTRODUCCIÓN	
3.1.1 Evolución de los pacientes trasplantados con riñones procedentes de donantes con criterios expandidos.....	79
3.1.2 Biopsia preimplante.....	81
3.1.3 Recomendaciones para la realización de biopsia en el donante.....	82
3.1.4 Características de la biopsia.....	82
3.1.5 Propuesta Andaluza para la valoración de la biopsia renal preimplante.....	83
3.1.6 Muerte encefálica y daño renal.....	85
3.1.7 Soporte vasoactivo (uso de catecolaminas) en el paciente potencialmente donante de órganos.....	87
3.1.8 Factores utilizados para la valoración del donante renal con criterios expandidos.....	88
3.1.9 Importancia del tiempo de isquemia fría en la evolución del injerto renal.....	94
3.1.10 ¿Podemos predecir la evolución de los injertos renales procedentes de donantes con criterios expandidos? Scores predictivos.....	96
3.1.11 Papel de la Poli ADP ribosa polimerasa-1	100

3.2	METODOLOGÍA	
3.2.1	Tipo de estudio	103
3.2.2	Pacientes	103
3.2.3	Período de estudio	103
3.2.4	Ámbito	104
3.2.5	Protocolo de biopsia	105
3.2.6	Protocolo de seguimiento de receptores	106
3.2.7	Análisis estadístico	107
3.2.8	Definiciones	109
3.3	RESULTADOS	
3.3.1	Análisis descriptivo de los grupo de estudio	111
3.3.2	Análisis descriptivo de los receptores	113
3.3.3	Evolución postquirúrgica de los receptores	115
3.3.4	Factores que condicionan la validez renal	117
3.3.5	Análisis de los factores que influyen en el desarrollo de necrosis tubular aguda y función retardada del injerto renal	123
3.3.6	Supervivencia del injerto renal	127
3.3.7	Relación de la PARP1 con la lesión renal inducida por la muerte encefálica	132
3.3.8	Influencia de la expresión de PARP1 sobre la evolución del receptor	137
3.3.9	Influencia del tratamiento con DVA sobre la evolución del injerto a corto plazo	139
3.4	DISCUSIÓN	
3.4.1	Factores que determinan la aparición de NTA y FRI	143
3.4.2	¿Podemos seleccionar según variable clínicas y	
3.4.3	analíticas a los donantes potenciales? Modelo Andaluz de Selección de Donantes	145
3.4.4	Supervivencia del injerto renal procedente de donantes con criterios expandidos	150
3.4.5	Expresión de PARP1 a nivel del injerto renal	153
3.4.6	Influencia de la expresión de PARP1 sobre la evolución del injerto	155
3.4.7	Tratamiento con drogas vasoactivas y función inicial del injerto renal	157
4.	CONCLUSIONES	160
5.	BIBLIOGRAFÍA	163

AGRADECIMIENTOS:

- A mi padre que me ha inculcado su pasión por la Medicina y me ha impedido abandonar este proyecto en numerosas ocasiones.
- A Jorge. En sus siestas he escrito numerosas páginas de esta tesis doctoral.
- A toda mi familia. Sois un estímulo constante para continuar avanzando en la vida y en la Medicina.
- A Francisco O' Valle Ravassa, sin cuyo apoyo y estímulo no hubiera sido posible la realización de esta tesis doctoral.
- A Juan Bravo Soto que me ha cedido datos y me ha asesorado en una parte indispensable para el desarrollo de esta tesis doctoral.
- A FIBAO y en particular a Amanda Rocío González Ramírez que ha realizado el análisis estadístico.
- A María Dolores Rodríguez que ha invertido horas en la inmunohistoquímica.
- A Rosa Ríos Pelegrina que ha revisado las muestras histológicas.
- A la coordinación sectorial de trasplantes de Granada-Jaén y en especial a Manuel Burgos que me ha facilitado el acceso a la información imprescindible para realizar esta tesis doctoral.

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA TESIS

Considerando el plazo de tiempo empleado en la realización de esta Tesis así como los resultados obtenidos y publicados en sus primeras aportaciones, el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha planteado como un híbrido entre Tesis interpretada como Compendio de Trabajos Científicos (primera parte) y Tesis como Trabajo de Investigación todavía no publicado (segunda parte). Este último sencillamente surge como evolución natural de las referidas publicaciones ante las nuevas incógnitas clínicas, anatomopatológicas y experimentales planteadas.

1.1. LA TESIS COMO COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS

Esta parte de la Tesis Doctoral de acuerdo con los informes correspondientes y habiendo sido autorizada por los Directores de Tesis y Órganos Responsables del Programa de Doctorado se presenta como un compendio de cinco trabajos, cuatro de ellos previamente publicados y uno aceptado y actualmente en prensa, a la espera de su publicación en la revista *The Scientific World Journal open Access* de la editorial Hindawi. Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis Doctoral son las siguientes:

1. O'Valle F, Benitez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, del Moral RM, Martín-Oliva D, Oliver FJ, del Moral RG. Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly (ADP-ribose) polymerase. *Transplant Proc.* 2004 Apr; 36(3):733-5. PubMed PMID: 15110646.
2. O'Valle F, Benítez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, Del Moral RM, Martín-Oliva D, Oliver FJ, Del Moral RG. Role of poly-(ADP-ribose) polymerase in transplant acute tubular necrosis and its relationship with delayed renal function. *Transplant Proc.* 2005 Apr; 37(3):1421-3. PubMed PMID: 15866623.
3. O'Valle F, Gómez-Morales M, Del Moral RM, Serón D, Moreso F, Osuna A, Oliver FJ, Del Moral RG. Poly (ADP-ribose) polymerase expression in kidney transplantation: from alfa (alpha) to Omega (Omega). *Transplant Proc.* 2007 Sep; 39(7):2099-101. PubMed PMID: 17889105.
4. O'Valle F, Del Moral RG, Benítez M del C, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, Aguilar D, Aneiros-Fernández J, Hernández-Cortés P, Osuna A, Moreso F, Serón D, Oliver FJ,

Del Moral RG. Poly [ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation. PLoS One. 2009 Sep 28; 4(9):e7138. doi: 10.1371/journal.pone.0007138. PubMed PMID: 19784367; PubMed Central PMCID: PMC2745752.

5. R. García del Moral, Mercedes Gómez Morales, Pedro Hernández-Cortés, José Aneiros-Fernández, Mercedes Caba-Molina, M^a Dolores Rodríguez-Martínez, Andreina Peralta, Pablo Galindo, Antonio Osuna, F. Javier Oliver, Raimundo G. del Moral, Francisco O'Valle. PARP inhibition attenuates histopathological lesion in ischemia/reperfusion renal mouse model after cold prolonged ischemia. The Scientific World Journal, vol. 2013, Article ID 486574, 8 pages, 2013. doi:10.1155/2013/486574.

1.2. LA TESIS COMO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN NO PUBLICADO

Como consecuencia de las nuevas interrogantes surgidas de los trabajos publicados y mi propio desarrollo profesional, cuando en el año 2010 fui nombrado Coordinador de Trasplantes del Hospital Santa Ana del Área de Gestión Sur de Granada, se ha planteado el trabajo adicional de investigación que se incluye como segunda parte de esta Tesis Doctoral.

**2. TESIS DOCTORAL-PRIMERA PARTE:
COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS**

2.1. INTRODUCCIÓN.

La poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP1) es una enzima nuclear presente en todas las células eucariotas.¹ Es una enzima de 113 kDa con seis dominios, de los cuales cuatro están bien caracterizados. Un dominio N-terminal, DNA-ligando, que contiene dos puentes de zinc y cuya unión al ADN activa el dominio catalítico, un dominio automodificante que permite su autoinactivación, un dominio C-terminal catalítico y un dominio central que se une a la caspasa y puede estar implicado en la muerte celular por apoptosis.² Cataliza la transferencia de unidades de NAD sobre residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de una serie de proteínas nucleares que incluyen a histonas, DNA polimerasas, topoisomerasas, etc.

Actúa regulando numerosos procesos celulares como la reparación del DNA; la diferenciación y división celular; replicación, amplificación, transformación y expresión génica del DNA; la función mitocondrial y la muerte celular.³ Se activa en respuesta a daños en el ADN como consecuencia de agentes genotóxicos como la radiación ionizante, los agentes alquilantes y/o radicales libres.

La activación de la PARP es importante para la reparación celular, pero su sobreexpresión en situaciones patológicas como la lesión por isquemia-reperfusion conduce a consumo de NAD y ATP que pueden disminuir hasta niveles inferiores al 20% de los normales en una hora. La poli ADP-ribosilación de proteínas es por tanto una modificación covalente transitoria en determinadas proteínas nucleares permitiendo que modifiquen su función biológica ante mecanismos de estrés que requieren una adaptación rápida.⁴

Una vez detectado el daño en el ADN, la PARP se activa e inicia la síntesis del polímero de ADP-ribosa, modificando las proteínas necesarias para la reparación del daño. La propia síntesis del polímero inactiva a la enzima separándola del DNA una vez ha cumplido su función y el polímero se degrada.

El conocimiento de las funciones biológicas de la PARP ha sido posible gracias al desarrollo de modelos murinos genéticamente deficientes en *Parp* y tratados con inhibidores del efecto de la misma.

Dos laboratorios han desarrollado independientemente ratones *Parp1*^{-/-}.^{5,6} En ambos casos los animales son viables y fértiles, presentan extremada sensibilidad a la irradiación gamma y los agentes alquilantes y gran inestabilidad genética medida por intercambio de cromátidas hermanas y la lentitud de reparación de las rupturas de la cadena del ADN.⁷ En las células de los ratones *Parp1*^{-/-}, la sensibilidad a la citolisis por apoptosis está muy incrementada. Al mismo tiempo, la acumulación intracelular de la proteína p53, en respuesta a la acción genotóxica, es mucho más elevada en células deficientes en PARP1 que en células con fenotipo *Parp1*^{+/+}. Este hecho sugiere indirectamente que la persistencia de daños no reparados en las células PARP^{-/-} mantiene el estímulo hacia la síntesis de p53⁸.

Uno de los aspectos más destacados de los estudios con ratones *Parp1 knockout* es que la eliminación de los genes *Parp1* resulta en un beneficio frente a la isquemia cerebral⁹, enfermedades de base inflamatoria como diabetes tipo I,¹⁰ shock séptico^{11,12} y hemorrágico,¹³ así como procesos inflamatorios crónicos.¹⁴

Del mismo modo los ratones tratados con inhibidores de la PARP1 mostraron mayor protección frente a procesos inflamatorios y lesión por isquemia reperusión, debido a un menor estrés oxidativo y una disminución de la transcripción de factores dependientes de la PARP en modelos de traumatismo craneoencefálico,¹⁵ isquemia cerebral perinatal,¹⁶ estrés oxidativo inducido por disfunción endotelial¹⁷ y enterocolitis necrotizante.¹⁸ La conservación en una solución con un inhibidor de la PARP1 de corazones de rata sometidos a lesión por isquemia reperusión ha puesto de manifiesto una mejor recuperación funcional y menor liberación enzimática,¹⁹ frente al grupo control.

La insuficiencia renal aguda secundaria a lesión por isquemia-reperusión está vinculada a la agresión por radicales libres,²⁰ que conllevan la generación de aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (NO) durante la reperusión tisular. En esta situación

el NO se comporta como un tóxico al generarse el altamente reactivo anión peroxinitrito que causa rápida oxidación y modificación covalente por nitración e hidroxilación de las proteínas e induce daños en el DNA, pudiendo llegar a producir roturas de doble cadena, que pueden activar a la PARP,²¹ con deplección masiva del NAD intracelular que solo puede ser repuesto por consumo de ATP, algo solamente accesible para tejidos en homeostasis.

El desarrollo de lesión renal aguda es un proceso complejo que afecta a células tubulares epiteliales, endoteliales e inflamatorias. Las células tubulares epiteliales tienen una alta sensibilidad a la lesión renal y pueden tener un papel mediador en la iniciación y desarrollo de la fibrosis renal.²² El mecanismo fisiopatológico que la sustenta es el proceso de muerte y ulterior descamación de las células epiteliales tubulares que ocurre simultáneamente por apoptosis y necrosis. La extensión e intensidad de dicha lesión depende de la proporción de células afectadas por cada uno de los procesos, habiéndose postulado que cuando se trata de anoxia total mantenida dominan los fenómenos de necrosis, y cuando la injuria es más leve o parcial lo hacen los de apoptosis. También se ha descrito diversa sensibilidad de algunas porciones del riñón frente a la isquemia, siendo las más susceptibles el túbulo contorneado proximal y la porción ascendente del asa de Henle, por lo que hipotéticamente se ha propuesto que a igualdad de lesión, a este nivel serían más frecuentes los procesos de necrosis y en resto del recorrido de la nefrona los de apoptosis.²³ El excesivo consumo de ATP requerido puede conducir a las células desde una lesión subletal hasta el punto de no retorno que conduce a la muerte celular por necrosis.^{24,25}

Este hecho ha sido demostrado en modelos experimentales in vitro o de isquemia-reperfusión in vivo donde empleando agentes farmacológicos inhibidores de la PARP se ha mejorado la viabilidad de células sometidas a la agresión oxidativa y apreciado significativa disminución de las lesiones renales en la rata.^{26,27} Los ratones *Parp1 knockout* carentes de la expresión de PARP1) presentan menor sensibilidad renal a la toxicidad por cisplatino, con mejor funcionalidad a los cinco días y menor presencia de

necrosis tubular inducida por el estrés oxidativo.²⁸ La inflamación y fibrosis en riñones de ratas sin actividad PARP1 fue inferior en un modelo de ratones con ligadura ureteral,²⁹ disminuyendo los cambios histopatológicos, pero no la apoptosis. Estos datos parecen asociar a la PARP con el daño tubular y necrosis de células renales en la insuficiencia renal aguda.

Además la presencia de lesiones tubulares histológicas precede al desarrollo de las mismas a nivel glomerular, lo que hace que el estudio de la PARP1 a nivel tubular pueda resultar muy interesante para valorar la idoneidad de los injertos renales y predecir el desarrollo de función retardada del injerto.

2.2. TRABAJOS PUBLICADOS

Las publicaciones han sido clasificadas por orden cronológico como A, B, C, D y E

Publicación A:



Correlation of Morphological Findings With Functional Reserve in the Aging Donor: Role of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase

F. O'Valle, M.C. Benítez, M. Gómez-Morales, J. Bravo, A. Osuna, R.M.G. del Moral, D. Martín-Oliva, F.J. Oliver, and R.G. del Moral

ABSTRACT

Introduction. The enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) participates in the first events of DNA repair in higher organisms. Under conditions of tissue ischemia, this action can lead to significant decreases in NAD(+), massive adenosine triphosphate (ATP) depletion, and cell death. In renal grafts with pretransplantation cold ischemia and subsequent ischemia-reperfusion injury, overactivation of PARP-1 may lead to a higher index of acute tubular necrosis, a delay in total recovery of the function of the transplanted organ, and an early progression to chronic graft nephropathy. The present study examined whether increased tubular expression of PARP-1 in kidneys from aged donors contributed to recipient renal function.

Material and Method. We studied the nuclear expression of PARP-1 using immunohistochemistry with monoclonal antibody PAR01 in 75 kidney biopsy specimens from 40 aged donors.

Results. Immunohistochemical expression of PARP-1 showed a statistically significant relationship with donor age ($r = .408$, $P = .006$, Spearman test), with time required to achieve effective diuresis ($r = .386$, $P = .01$, Spearman test) and with creatinine levels in the first 3 months. We also highlighted a greater intensity of PARP-1 expression in suboptimal donor kidneys that failed to reduce the serum creatinine levels to <1.7 mg/dL (creatinine <1.7 PARP: 1.29 ± 1.49 vs creatinine >1.7 PARP: 2.29 ± 1.33 , $P = .047$, Mann-Whitney U test).

Conclusion. We conclude that the determination of PARP-1 in biopsy specimens from aged donors may be a useful predictive factor for renal graft function.

POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP-1) a nuclear zinc-finger, DNA-binding protein of molecular weight 113 kDa, specifically detects DNA strand breaks or nicks produced by genotoxic agents in mammalian cells.¹ PARP-1 catalyzes the adenosine diphosphate (ADP) ribosylation of proteins using NAD(+) as the substrate,² leading to decreases in cellular NAD(+)³ and potentially adenosine triphosphate (ATP) depletion and cell death.⁴ Activation of PARP-1 and depletion of cellular energy under conditions of tissue ischemia results in cell necrosis,⁵ which can be irreversible under conditions of mitochondrial free radical generation and oxidant-induced cell injury, such as are found during ischemia-reperfusion (IR) of renal grafts.

The IR injury is a common process that triggers a pathophysiological cascade, including an inflammatory re-

sponse with release of cytokines and oxygen-derived free radicals. PARP-1 was recently shown to be involved in the pathogenesis of various forms of IR injury in animal models.⁶ In addition, the pharmacological inhibition of

From the Department of Pathology, San Cecilio University Hospital (F.O. V., M.C.B., M.G.-B., R.M.G.D.M., R.G.D.M.); Department of Nephrology Virgen de las Nieves University Hospital (J.B., A.O.); and Institute of Parasitology and Biomedicine, Centro Superior de Investigaciones Científicas, (D.M.-O., F.J.O.) Granada, Spain.

This work has been funded by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI021505).

Address reprint requests to Raimundo G. del Moral, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, 18012 Granada, Spain. E-mail: rgarcia@ugr.es

© 2004 by Elsevier Inc. All rights reserved.
380 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/04/\$-see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2004.03.029

Transplantation Proceedings, 36, 733-735 (2004)

733

PUBLICACIÓN B:



Role of Poly-(ADP-Ribose) Polymerase in Transplant Acute Tubular Necrosis and Its Relationship With Delayed Renal Function

F. O'Valle, M.C. Benítez, M. Gómez-Morales, J. Bravo, A. Osuna, R.M.G. Del Moral, D. Martín-Oliva, F.J. Oliver, and R.G. Del Moral

ABSTRACT

The enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) participates in the repair of DNA damaged by genotoxic agents such as oxygen-derived free radicals. If the allograft suffers pretransplant cold ischemia and subsequent ischemia-reperfusion injury (IR), overactivation of PARP-1 can be induced, which may lead to an increase in acute tubular necrosis (ATN) and a delay in total recovery of renal function (RRF) of the transplanted organ. We studied the nuclear expression of PARP-1 in tubular cells by immunohistochemistry with the monoclonal antibody PAR01 in 104 kidney transplant biopsies from allografts with ATN. In 50% of biopsies with ATN, >50% of tubular nuclei were PARP-1⁺; only 9.6% of biopsies were negative. The increase in the immunohistochemical expression of PARP-1 showed a statistically significant relationship with the duration of cold ischemia, with serum creatinine levels, and with the time required to achieve effective diuresis ($P < .0001$, Spearman test). Cold ischemia of >24 hours and serum creatinine levels >1.7 mg/dL showed a statistically significant relationship with the highest PARP-1 expression levels (2.83 ± 0.4 vs 1.36 ± 0.8 , $P < .0001$, Mann-Whitney U test). We conclude that PARP-1 plays an important role in ATN and RRF and is related to the extent and severity of ATN and to the renal allograft function.

PARP-1 is a nuclear zinc-finger DNA-binding protein with a molecular weight of 113 kd that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced by different genotoxic agents in mammalian cells.¹ PARP-1 catalyzes the ADP ribosylation of proteins using NAD(+) as the substrate.² The activation of PARP is a consequence of ischemic injury and results in a depletion of intracellular NAD(+),³ which can only be replenished via a reaction that consumes ATP. Ischemia-reperfusion (I/R) injury that results in substantial DNA degradation requires cells to consume large amounts of ATP to support poly ADP-riboseylation. For this reason, whereas moderate activity of PARP protects cellular genome integrity, its excessive activation can lead to cell death secondary to ATP depletion.⁴⁻⁶

Acute failure of the transplanted kidney is a major problem in the early posttransplant phase and is acknowledged as a cause of allograft loss. Early renal transplant dysfunction is mainly due to ischemic damage (acute tubular necrosis [ATN]), rejection, infection, and cyclosporine toxicity.⁷ Renal ischemia is a major cause of acute renal failure, whether or not caused during transplantation, ini-

tiating a complex and interrelated sequence of events resulting in injury and eventual death of renal cells.^{8,9} Salahudeen et al recently studied 6465 kidney transplant patients using UNOS data and concluded that prolonged cold ischemia is a significant predictor of long-term graft loss.¹⁰ The prognosis is complicated by the fact that reperfusion, although essential for the survival of ischemic renal tissue, causes additional damage (reperfusion injury)^{11,12} that contributes to the renal dysfunction and injury associated with I/R of the kidney.^{8,12} Within the kidney, the proximal tubule appears to be particularly susceptible to

From the Department of Pathology, San Cecilio University Hospital and School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain (F.O'V., M.C.B., M.G.-M., R.M.G.D.M., R.G.D.M.); Department of Nephrology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain (J.B., A.O.); and Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain (D.M.-O., F.J.O.).

Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI021505).

Address reprint requests to Dr Raimundo G. del Moral, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, 18012 Granada, Spain. E-mail: rgarcia@ugr.es

© 2005 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/05/\$-see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2005.02.040

Transplantation Proceedings, 37, 1421-1423 (2005)

1421

PUBLICACIÓN C:



Poly(ADP-Ribose) Polymerase Expression in Kidney Transplantation: From Alfa (α) to Omega (Ω)

F. O'Valle, M. Gómez-Morales, R.M.G. Del Moral, D. Serón, F. Moreso, A. Osuna, F.J. Oliver, and R.G. Del Moral

ABSTRACT

Introduction. Overactivation of the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) can be induced by ischemia-reperfusion and involved in the renal injury subsequent to kidney transplant. The poly(ADP-ribose)ylation mechanism alters free radical-induced DNA damage, which is repaired by PARP-1 polymer. However, PARP-1 overexpression induces cellular necrosis. Our aim was to study the immunohistochemical PARP-1 expression in kidney transplant biopsies associated with various events.

Materials and Methods. We studied the nuclear expression of PARP-1 in kidney tubule cells by immunohistochemistry using the monoclonal antibody PAR01 in donor biopsies without acute tubular necrosis (ATN) ($n = 60$; controls), allografts that suffer ATN ($n = 90$) or an episode of acute humoral rejection ($n = 12$) or acute tubulointerstitial rejection ($n = 25$), or chronic allograft nephropathy ($n = 25$). Furthermore, we also studied protocol biopsies with subclinical rejection ($n = 60$). Renal lesions in transplant biopsies were graded blindly using 1997 Banff criteria without any clinical information.

Results. Biopsies without morphological features of ATN, namely acute tubulointerstitial rejection, borderline or subclinical rejection, showed lesser PARP-1 expression compared with biopsies with ATN or with ischemic mechanism of acute humoral rejection or chronic allograft nephropathies. We observed an inverse relation between PARP-1 expression and renal function ($P < .001$). Overall, renal biopsies showing ATN revealed greater expression of PARP-1 ($r = 0.785$, Pearson test). A significant relationship with PARP-1 expression was demonstrated with renal function (effective diuresis, serum creatinine levels) and pretransplant cold ischemia time ($P < .001$).

Conclusion. Kidney transplant events including ischemia were associated with the highest PARP-1 expression and worse allograft renal function.

POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP-1) is a nuclear, zinc-finger, DNA-binding protein with a molecular weight of 116 kDa that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced in mammalian cells by genotoxic agents.¹ PARP-1 catalyzes the adenosine diphosphate ribosylation of proteins using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as the co-factor.² Activation of PARP is a consequence of ischemic injury, resulting in depletion of intracellular (NAD⁺),³ which can only be replenished via a reaction that consumes adenosine triphosphate (ATP). Ischemia-reperfusion injury that results in substantial DNA degradation requires cells to consume large amounts of ATP to support poly(ADP-ribose)ylation. For this reason, whereas a mod-

From the IBIMER and Department of Pathology (F.O., M.G.-M., R.M.G.D.M., R.G.D.M.), San Cecilio University Hospital and School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; Department of Nephrology (D.S., F.M.), Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain; Department of Nephrology (A.D.), Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain; and Institute of Parasitology and Biomedicine (F.J.O.), CSIC, Granada, Spain.

This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI051197).

Address reprint requests to Francisco O'Valle, Dpto de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Avda de Madrid, s/n 18012 Granada, Spain. E-mail: fovalle@ugr.es

© 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/07/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2007.07.075

Transplantation Proceedings, 39, 2099–2101 (2007)

2099

PUBLICACIÓN D

OPEN ACCESS Freely available online



Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 Expression Is Related To Cold Ischemia, Acute Tubular Necrosis, and Delayed Renal Function In Kidney Transplantation

Francisco O'Valle^{1*}, Raimundo G. M. Del Moral¹, María del Carmen Benítez¹, David Martín-Oliva², Mercedes Gómez-Morales¹, David Aguilar¹, José Aneiros-Fernández¹, Pedro Hernández-Cortés³, Antonio Osuna⁴, Francesc Moreso⁵, Daniel Serón⁶, Francisco J. Oliver⁶, Raimundo G. Del Moral¹

1 Department of Pathology and Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBRM), School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain, **2** Department of Cell Biology, University of Granada, Granada, Spain, **3** Department of Traumatology and Orthopaedic Surgery, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain, **4** Department of Nephrology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain, **5** Department of Nephrology, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain, **6** Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Armilla, Granada, Spain

Abstract

Cold ischemia time especially impacts on outcomes of expanded-criteria donor (ECD) transplantation. Ischemia-reperfusion (IR) injury produces excessive poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 (PARP-1) activation. The present study explored the hypothesis that increased tubular expression of PARP-1 contributes to delayed renal function in suboptimal ECD kidney allografts and in non-ECD allografts that develop posttransplant acute tubular necrosis (ATN).

Materials and Methods: Nuclear PARP-1 immunohistochemical expression was studied in 326 paraffin-embedded renal allograft biopsies (193 with different degrees of ATN and 133 controls) and in murine Parp-1 knockout model of IR injury.

Results: PARP-1 expression showed a significant relationship with cold ischemia time (*r* coefficient = 0.603), time to effective diuresis (*r* = 0.770), serum creatinine levels at biopsy (*r* = 0.649), and degree of ATN (*r* = 0.810) (*p* = 0.001, Pearson test). In the murine IR model, western blot showed an increase in PARP-1 that was blocked by Parp-1 inhibitor. Immunohistochemical study of PARP-1 in kidney allograft biopsies would allow early detection of possible delayed renal function, and the administration of PARP-1 inhibitors may offer a therapeutic option to reduce damage from IR in donor kidneys by preventing or minimizing ATN. In summary, these results suggest a pivotal role for PARP-1 in the ATN of renal transplantation. We propose the immunohistochemical assessment of PARP-1 in kidney allograft biopsies for early detection of a possible delayed renal function.

Citation: O'Valle F, Del Moral RGM, Benítez MdC, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, et al. (2009) Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 Expression Is Related To Cold Ischemia, Acute Tubular Necrosis, and Delayed Renal Function In Kidney Transplantation. *PLoS ONE* 4(9): e7138. doi:10.1371/journal.pone.007138

Editor: Carmine Zoccali, Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy

Received: January 12, 2009; **Accepted:** August 24, 2009; **Published:** September 28, 2009

Copyright: © 2009 O'Valle et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grants PI021505, and PI05197). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fovalle@ugr.es

Introduction

Renal ischemia produced during transplantation or otherwise is a major cause of acute kidney injury, initiating a complex and interrelated sequence of events that result in the injury and eventual death of renal cells [1,2]. Prolonged cold ischemia contributes to organ damage and increases patient morbidity and mortality. Salathudeen et al. recently studied 6,465 kidney transplant patients using United Network for Organ Sharing (UNOS) data and concluded that prolonged cold ischemia is a strong risk factor for delayed graft function and a significant predictor of short-term [3] and long-term [4] graft loss, as reported by other authors [5,6]. Nevertheless, the pathogenic mechanism has yet to be fully elucidated.

Johnston et al. concluded that cold ischemia time has a major impact on the outcome of transplants from aged and expanded-criteria donors (ECDs). In non-ECD kidneys, very prolonged cold ischemia time is associated with an increase in primary non-function. ECD kidneys from older donors show a greater increase in delayed

graft function with longer cold ischemia time. Thus, ECD grafts with cold ischemia time of >8 h have higher delayed graft function rates than do non-ECD grafts with cold ischemia time of >37 h [7].

Early renal transplant dysfunction is mainly caused by ischemic damage (acute tubular necrosis [ATN]), rejection, infection, or cyclosporin A toxicity [8]. The prognosis is complicated by the fact that reperfusion, although essential for the survival of ischemic renal tissue, causes additional damage (reperfusion injury) [9,10] that contributes to the renal dysfunction and injury associated with ischemia/reperfusion (IR) of the kidney [1,10].

Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 (PARP-1) (E.C. 2.4.2.30) is a nuclear zinc-finger DNA-binding protein with a molecular weight of 113 kDa that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced by different genotoxic agents in mammalian cells [11]. PARP-1 catalyzes the ADP-ribosylation of proteins using NAD(+) as substrate [12]. PARP activation is a consequence of ischemic injury and results in a depletion of intracellular NAD(+) [13], which can only be replenished via a reaction that consumes ATP.



Research Article

PARP Inhibition Attenuates Histopathological Lesion in Ischemia/Reperfusion Renal Mouse Model after Cold Prolonged Ischemia

Raimundo M. G. del Moral,¹ Mercedes Gómez-Morales,¹ Pedro Hernández-Cortés,² David Aguilar,³ Trinidad Caballero,³ Jose Aneiros-Fernández,¹ Mercedes Caba-Molina,¹ M Dolores Rodríguez-Martínez,³ Andreina Peralta,⁴ Pablo Galindo-Moreno,^{5,6} Antonio Osuna,⁷ F. Javier Oliver,⁴ Raimundo G. del Moral,¹ and Francisco O'Valle³

¹ Provincial UGC Intercentre, Department of ICU, Granada, Spain

² Department of Traumatology and Orthopedic Surgery, IBIMER, "San Cecilio" Clinical Hospital and University of Granada, Spain

³ Department of Pathology and IBIMER, School of Medicine, University of Granada, Spain

⁴ Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain

⁵ Oral Surgery and Implant Dentistry Department, School of Dentistry, University of Granada, Spain

⁶ Department of Periodontics and Oral Medicine School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

⁷ Department of Nephrology, "Virgen de las Nieves" University Hospital, Granada, Spain

Correspondence should be addressed to Francisco O'Valle; fovalle@ugr.es

Received 19 August 2013; Accepted 18 September 2013

Academic Editors: N. Futrakul and J. Luño

Copyright © 2013 Raimundo M. G. del Moral et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We test the hypothesis that PARP inhibition can decrease acute tubular necrosis (ATN) and other renal lesions related to prolonged cold ischemia/reperfusion (IR) in kidneys preserved at 4°C in University of Wisconsin (UW) solution. *Material and Methods.* We used 30 male *Parp1*^{+/+} wild-type and 15 male *Parp1*^{0/0} knockout C57BL/6 mice. Fifteen of these wild-type mice were pretreated with 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) at a concentration of 15 mg/kg body weight, used as PARP inhibitor. Subgroups of mice were established (A: IR 45 min/6 h; B: IR + 48 h in UW solution; and C: IR + 48 h in UW solution plus DPQ). We processed samples for morphological, immunohistochemical, ultrastructural, and western-blotting studies. *Results.* Prolonged cold ischemia time in UW solution increased PARP-1 expression and kidney injury. Preconditioning with PARP inhibitor DPQ plus DPQ supplementation in UW solution decreased PARP-1 nuclear expression in renal tubules and renal damage. *Parp1*^{0/0} knockout mice were more resistant to IR-induced renal lesion. In conclusion, PARP inhibition attenuates ATN and other IR-related renal lesions in mouse kidneys under prolonged cold storage in UW solution. If confirmed, these data suggest that pharmacological manipulation of PARP activity may have salutary effects in cold-stored organs at transplantation.

1. Introduction

Until now, renal ischemia-reperfusion (IR) injury has been inevitable in transplantation, resulting in the cell death of renal tubular epithelial cells. Human kidneys retrieved from cadaver donors for transplantation are perfused and preserved in order to attenuate ischemic injury between the harvesting of the organ and its transplantation. Currently, the most effective preservation strategy to reduce ischemic

injury during prolonged cold storage is to decrease renal oxygen demand by using both hypothermia and preservation solutions (University of Wisconsin (UW) solution) together. These solutions contain adenosine and impermeable saccharides to prevent ATP precursor depletion and cell swelling, respectively. However, this strategy is not sufficiently effective to prevent preservation injury of the tissue [1, 2].

2.3. RESUMEN

La lesión por isquemia-reperfusión conduce a la activación de la PARP1 para reparar las lesiones en el DNA inducidas por radicales libres. La sobreexpresión de PARP1 en este contexto produce un agotamiento de los depósitos de ATP y desencadena los procesos de muerte celular por necrosis y apoptosis. El nivel de actividad de la PARP1 puede condicionar la evolución del injerto renal en el período inmediato postrasplante. En nuestro modelo experimental que incluyó a ratones $Parp1^{+/+}$, $Parp1^{-/-}$ y con inhibición farmacológica de la actividad de la PARP1, la lesión renal inducida por isquemia-reperfusión tras un tiempo prolongado de isquemia fría fue inferior en los grupos con actividad de PARP reducida o inhibida.

Estos resultados han sido reproducidos in vivo. Las biopsias de receptores renales sin evidencia de necrosis tubular aguda muestran menor expresión de PARP1 comparadas con las biopsias con evidencia de necrosis tubular aguda. La expresión de PARP1 tiene relación con la función renal postrasplante definida como periodo de tiempo hasta la diuresis eficaz, valor de creatinina a los tres meses y porcentaje de pacientes que disminuyen la cifra de creatinina sérica por debajo de 1.7 mg/dL.

El tiempo de isquemia fría es un determinante fundamental de la evolución postrasplante renal. Nuestro grupo ha demostrado que la expresión de PARP1 en biopsias preimplante tiene una relación directamente proporcional con el tiempo de isquemia fría mediante conservación de riñones no trasplantados en solución de Wisconsin a 4°C durante 48 horas.

La expresión de PARP1 en la biopsia preimplante aparece como un marcador de riesgo de función retardada del injerto y NTA y los inhibidores de la actividad de la PARP1 puede ser una opción terapéutica para minimizar la incidencia de NTA y FRI en el periodo inmediato postrasplante.

2.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1. Describir la expresión inmunohistoquímica de la forma constitutiva y activada de PARP así como de su mRNA en riñones humanos procedentes de donantes, injertos renales sometidos a isquemia fría pretrasplante y en biopsias de trasplante renal con necrosis tubular aguda diferenciado la de otros procesos de lesión renal como el rechazo crónico IF/AT y el rechazo agudo. Establecer su relación con los fenómenos de necrosis de células tubulares y/o endoteliales y la apoptosis de las mismas.
2. Correlacionar los datos morfológicos, inmunohistoquímicos y moleculares obtenidos de las biopsias renales preimplante y durante el seguimiento con los consiguientes parámetros clínicos indicativos de la función renal del paciente.
3. Desarrollar un modelo experimental de isquemia-reperfusión sobre ratones *Parp1*^{+/+} y sus homólogos transgénicos *knockout Parp1*^{-/-}. Estudiar el efecto de la 4-aminonaftalimida (DPQ), el más potente bloqueante conocido de la actividad de PARP en los grupos *Parp1*^{+/+} y *Parp1*^{-/-}, y como esta acción influye en la génesis de las lesiones en los correspondientes grupos de animales. Analizar en todos los grupos de animales mediante PCR en tiempo real la expresión de la PARP1 así como mediante inmunohistoquímica.

4. Comparar las lesiones inducidas en los diversos modelos experimentales con las observadas en la patología del trasplante a nivel de biopsias renales con lesiones de isquemia-reperfusión y rechazo crónico (IF/AT).

5. Eventualmente y a partir de los resultados obtenidos mediante bloqueo farmacológico de la PARP, aportar posibles medidas terapéuticas complementarias para disminuir la incidencia de función retardada del injerto en el grupo de donantes ECD con expresión intensa de PARP1 en la biopsia preimplante.

2.5. APORTACIONES DEL DOCTORANDO

La contribución del doctorando en todos estos trabajos ha consistido en:

- Recogida de datos: búsqueda de los donantes en la base de datos de la Unidad de Gestión de Anatomía Patológica del Hospital Clínica San Cecilio localizando todos los donantes con biopsia preimplante. A través de la coordinación sectorial de trasplantes de Granada-Jaén se han accedido a los protocolos de donación previos a 2006 y a través del sistema de información de la coordinación autonómica de trasplantes de Andalucía (SICATA) se han relacionado los donantes con los receptores y se han obtenido los datos de la evolución intra-UCI de los donantes. Los datos de los receptores se han obtenido por revisión de las historias clínicas y a través del registro de seguimiento de la consulta de trasplante renal del Servicio de Nefrología del Hospital Virgen de las Nieves.
- Valoración de las lesiones histológicas observadas en los riñones de los donantes y recogida de sus parámetros fundamentales para

ulteriormente discutir, y en su caso contrastar, estos resultados con los Directores de la Tesis.

- Recuento de núcleos inmunoteñidos en las determinaciones inmunohistoquímicas de todos los casos.
- Aplicación de test estadísticos a los resultados.
- Puesta a punto y mantenimiento del modelo experimental en ratones transgénicos.
- Recuento de resultados y análisis de datos en el modelo experimental.

Además, el doctorando ha aportado la importante tarea de servir de nexo de unión entre los diferentes grupos implicados en este trabajo altamente multidisciplinar (grupos de nefrología clínica, de medicina intensiva, de anatomía patológica y de biología molecular básica). Fruto de esta tarea y el contacto directo con los grupos que las desarrollaron, el doctorando ha aportado una perspectiva interdisciplinar entre las diferentes áreas y una mejor comprensión de conceptos en los tres grupos, permitiendo el diseño óptimo y el seguimiento de los pacientes y los experimentos así como la interpretación y discusión de los resultados y su ulterior publicación.

2.6. METODOLOGÍA UTILIZADA

Hemos diseñado diferentes modelos experimentales para el desarrollo de los objetivos de esta primera parte de la tesis doctoral.

Las biopsias preimplante mediante procesamiento acelerado en horno de microondas fueron fijadas en Glyofix e incluidas en parafina en un tiempo inferior a

las 2 horas. Las biopsias de los receptores fueron fijadas con formalina tamponada a pH 7.4 e incluidas en parafina según la técnica convencional durante 16 horas.

La presencia de NTA en la biopsia se determinó como leve (<10%), moderada (10-49%) y severa (>50%) según los criterios Banff-97.³⁰

Para la determinación de la expresión de PARP1 se utilizó el anticuerpo monoclonal frente a PARP1 (clon A6.4.12 Labvision Fremont CA, USA) incubando a temperatura ambiente durante 60 minutos. El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo en un inmunoteñidor automático (Autostainer480, Labvision) utilizando como sistema de visualización el método de polímero-conjugado con peroxidasa (Master Diagnóstica, Granada, España). La expresión de la PARP1 se clasificó de 0 a 3 puntos mediante una escala semicuantitativa.

El seguimiento clínico de los receptores se realizó mediante revisión de las historias clínicas recogiendo datos demográficos, tiempo de isquemia fría y de funcionalidad renal como la creatinina sérica, aclaramiento de creatinina, tiempo hasta diuresis eficaz, regímenes de inmunosupresión, necesidad de hemodiálisis, etc.

A continuación se describen los diferentes modelos experimentales utilizados en las referidas publicaciones.

2.6.1 Hemos diseñado un modelo experimental de lesión por isquemia-reperfusión en 45 ratones: 15 ratones "wild-type", 15 ratones *Parp1*^{-/-} (*Parp1 knockout*) y 15 ratones salvajes con inhibición farmacológica de la PARP- mediante 3,4-dihidro-5-(4-(1-piperimidil)butoxil)-1(2H)isoquinolona (DPQ). De cada grupo 5 ratones fueron sometidos a isquemia renal mediante clampaje del pedículo vascular renal

izquierdo completo en hipotermia durante 45 minutos. Tras 6 horas los animales fueron sacrificados. Los riñones se mantuvieron en isquemia durante 48 horas en los grupos de inhibición farmacológica y genética de la PARP1. El riñón derecho actuó como control. Se determinó la actividad de la PARP1 y el grado de necrosis tubular según una escala semicuantitativa. La metodología se describe ampliamente en el apartado “*Materials and methods*” de la publicación E.

2.6.2. Para el análisis de la relación de la PARP1 con el desarrollo de NTA (PUBLICACIÓN D) diseñamos un estudio de casos y controles. En la publicación D la presencia de NTA se determina de forma histológica a doble ciego por patólogos expertos. Se identificaron 150 biopsias renales procedentes de donantes ECD (95 con algún grado de NTA aguda y 65 sin NTA) y 166 biopsias de receptores de donante SCD (98 biopsias en paciente oligúricos entre los días 5 y 11 postrasplante y 68 biopsias de protocolo de seguimiento de trasplante sin evidencia de NTA). De este obtuvimos cuatro grupos: 2 con NTA (ECD y SCD) y dos sin necrosis tubular aguda (ECD y SCD) que actuaron como controles.

2.6.3 La publicación B constituye una serie de casos de pacientes con función retardada del injerto. 94 biopsias con NTA fueron clasificadas según el nivel de expresión de PARP para identificar factores que podrían condicionar la expresión de PARP1 y determinar la influencia de la misma sobre la recuperación posterior de la función renal.

2.6.4 Para determinar la relación de la PARP1 (PUBLICACIÓN D) con el tiempo de isquemia fría diseñamos un modelo de isquemia fría en 20 riñones de donantes ECD que no se consideraron aptos para trasplante por criterios morfológicos. Los riñones se conservaron en solución de Wisconsin durante 48 horas a 4°C.

2.6.5 La relación entre la expresión de PARP1 en el donante y la función renal postrasplante se determinó en una cohorte de 48 injertos renales procedentes de donantes mayores de 40 años (PUBLICACIÓN A).

2.6.6 La relación de la expresión de PARP1 con el desarrollo de NTA, rechazo agudo intersticial o humoral, rechazo subclínico y nefropatía crónica del injerto (PUBLICACIÓN C) se estableció mediante un estudio de casos y controles, utilizando como controles las biopsias de donante y como casos las biopsias realizadas en receptores con datos clínicos de rechazo y en biopsias protocolarias de seguimiento.

Para el análisis estadístico utilizamos los test estadísticos habituales. La estadística se realizó con el programa SPSS Windows 15.0. Para el análisis de normalidad se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnof. El análisis descriptivo se realizó mediante chi cuadrado, t de Student, análisis de la varianza para una vía (ANOVA1) con el test post hoc de Bonferroni y coeficiente de correlación de Pearson. Se construyeron curvas ROC para la expresión de PARP1 y relación con el desarrollo de NTA, tiempo de isquemia fría, creatinina sérica y tiempo de diuresis eficaz.

2.7 RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS.



Correlation of Morphological Findings With Functional Reserve in the Aging Donor: Role of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase

F. O'Valle, M.C. Benitez, M. Gómez-Morales, J. Bravo, A. Osuna, R.M.G. del Moral, D. Martin-Oliva, F.J. Oliver, and R.G. del Moral

ABSTRACT

Introduction. The enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) participates in the first events of DNA repair in higher organisms. Under conditions of tissue ischemia, this action can lead to significant decreases in NAD(+), massive adenosine triphosphate (ATP) depletion, and cell death. In renal grafts with pretransplantation cold ischemia and subsequent ischemia-reperfusion injury, overactivation of PARP-1 may lead to a higher index of acute tubular necrosis, a delay in total recovery of the function of the transplanted organ, and an early progression to chronic graft nephropathy. The present study examined whether increased tubular expression of PARP-1 in kidneys from aged donors contributed to recipient renal function.

Material and Method. We studied the nuclear expression of PARP-1 using immunohistochemistry with monoclonal antibody PAR01 in 75 kidney biopsy specimens from 40 aged donors.

Results. Immunohistochemical expression of PARP-1 showed a statistically significant relationship with donor age ($r = .408$, $P = .006$, Spearman test), with time required to achieve effective diuresis ($r = .386$, $P = .01$, Spearman test) and with creatinine levels in the first 3 months. We also highlighted a greater intensity of PARP-1 expression in suboptimal donor kidneys that failed to reduce the serum creatinine levels to <1.7 mg/dL (creatinine <1.7 PARP: 1.29 ± 1.49 vs creatinine >1.7 PARP: 2.29 ± 1.33 , $P = .047$, Mann-Whitney U test).

Conclusion. We conclude that the determination of PARP-1 in biopsy specimens from aged donors may be a useful predictive factor for renal graft function.

POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP-1) a nuclear zinc-finger, DNA-binding protein of molecular weight 113 kDa, specifically detects DNA strand breaks or nicks produced by genotoxic agents in mammalian cells.¹ PARP-1 catalyzes the adenosine diphosphate (ADP) ribosylation of proteins using NAD(+) as the substrate,² leading to decreases in cellular NAD(+)³ and potentially adenosine triphosphate (ATP) depletion and cell death.⁴ Activation of PARP-1 and depletion of cellular energy under conditions of tissue ischemia results in cell necrosis,⁵ which can be irreversible under conditions of mitochondrial free radical generation and oxidant-induced cell injury, such as are found during ischemia-reperfusion (IR) of renal grafts.

The IR injury is a common process that triggers a pathophysiological cascade, including an inflammatory re-

sponse with release of cytokines and oxygen-derived free radicals. PARP-1 was recently shown to be involved in the pathogenesis of various forms of IR injury in animal models.⁶ In addition, the pharmacological inhibition of

From the Department of Pathology, San Cecilio University Hospital (F.O. V., M.C.B., M.G.-B., R.M.G.D.M., R.G.D.M.); Department of Nephrology Virgen de las Nieves University Hospital (J.B., A.O.); and Institute of Parasitology and Biomedicine, Centro Superior de Investigaciones Científicas, (D.M.-O., F.J.O.) Granada, Spain.

This work has been funded by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI021505).

Address reprint requests to Raimundo G. del Moral, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, 18012 Granada, Spain. E-mail: rgarcia@ugr.es

© 2004 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/04/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2004.03.029

Transplantation Proceedings, 36, 733–735 (2004)

733

Table 1: Morphological and immunohistochemical comparison between control and IR C57BL/6 kidney mice samples.

	DPQ treated Control group PARP-1 ^{sh}	DPQ treated IR (group 1)	P-values MW	Control group PARP-1 ^{+/+}	IR (group 2)	P-values MW	Control group PARP-1 ^{+/+}	IR (group 3) PARP-1 ^{+/+}	P-values MW
PARP-1 (mm ²)	548.64±303.19	320.42±475.34	0.026	784.57±353.95	1124.70±550.93	0.050	0.0±0.0	0.0±0.0	1
ATN	0.0±0.0	0.93±1.22	0.126	0.0±0.0	1.20±1.42	0.029	0.20±0.41	0.80±1.15	0.250
Sloughing tubular cells	0.60±0.51	0.73±0.458	0.539	0.0±0.0	0.87±0.35	0.000	0.07±0.26	0.80±0.68	0.004
Tubular vacuolization	0.40±0.51	0.64±0.16	0.740	0.27±0.59	1.13±0.52	0.000	0.27±0.46	0.53±0.52	0.217
Brush border loss	0.07±0.26	0.13±0.35	0.775	0.0±0.0	0.47±0.52	0.029	0.0±0.0	0.0±0.0	1
Tubular casts	0.20±0.41	0.27±0.46	0.775	0.0±0.0	0.73±0.60	0.001	0.13±0.35	0.40±0.51	0.217

MW: Mann-Whitney U-test, DPQ: 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone, IR: Ischemia/reperfusion

PARP-1 reduces reperfusion injury in rat kidney⁷ and other organs. The present study examined whether increased tubular expression of PARP-1 in kidneys from aged donors contributes to a subsequent delay in host renal function.

MATERIAL AND METHODS

Seventy-five kidney biopsy specimens from 40 aged donors were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin using a microwave-accelerated procedure to determine pretransplantation glomerular, vascular, and tubulointerstitial lesions, according to a protocol previously published by our group.⁸ The nuclear expression of PARP-1 was characterized using incubating sections for 60 minutes at room temperature with PARP-1 monoclonal antibody (clone PAR01) (LabVision Fremont, Calif, USA). The immunohistochemistry study was performed on an automated immunostainer (LabVision), using a streptavidin-biotin-peroxidase-based method followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnostica, Granada, Spain). The positivity and intensity of the immunostaining were calculated semiquantitatively using a 0 to 4 scale (0, absence; 1, <1% of tubular nuclei positive; 2, 1% to 9%; 3, 10% to 49%; 4, >50%).

Data were gathered on sequential renal function parameters: creatinine, creatinine clearance ($\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$), microalbuminuria ($\mu\text{g}/\text{dL}$), proteinuria (mg/dL), and cystatin A (mg/L). Data were also gathered: donor and recipient ages; cold ischemia, warm ischemia, and reanastomosis times; as well as effective diuresis, immunosuppressive regimen, and number of hemodialysis sessions.

The Kolmogorov-Smirnov model was used to test the normality of the variables. After the descriptive analysis, Spearman correlation and Mann-Whitney U test analyses were performed to determine their statistical significance. The confidence interval was 95% ($P < .05$). The statistical analysis was performed using the SPSS-Windows 11.0 program (SPSS Inc, Chicago, Ill, USA).

RESULTS

Among the 75 kidneys studied, 48 (64%) were transplanted. The remaining kidneys were discarded due to a score of > 8 points on the evaluation protocol scale.⁸ The mean score of the transplanted kidneys was 5.56 ± 1.80 . The mean age of the kidney donors was 58.9 ± 5.9 years, and practically all of them had normal serum creatinine levels (1.05 ± 0.75 mg/dL). The recipient mean age was 53.5 ± 11 yrs with a mean time on hemodialysis of 2.82 ± 3.21 years. The mean cold ischemia and reanastomosis times were 18.9 ± 3.8 hours and 46.19 ± 12.5 minutes, respectively. Neither immunosuppressive regimen (cyclosporine or tacrolimus) plus mycophenolate mofetil and prednisone exerted a statistically significant influence on renal function parameters. Only 2 patients experienced an acute rejection episode. The mean time to establish effective diuresis was 8.58 ± 11 days (range, 1–68 days). After a mean follow-up of 665.9 ± 335 days, there were 4 graft losses (8.3%), and 2 patients had died with functioning kidneys.

The frequency distribution of the renal biopsy specimens according to their immunohistochemical expression of PARP-1 was as follows: 0, 38.4%; 1, 5.5%; 2, 17.8%; 3, 17.8%; and 4, 20.5%. PARP-1 expression showed a statistically significant relationship to donor age ($r = .408$, $P = .006$, Spearman test), time to effective diuresis ($r = .386$, $P =$

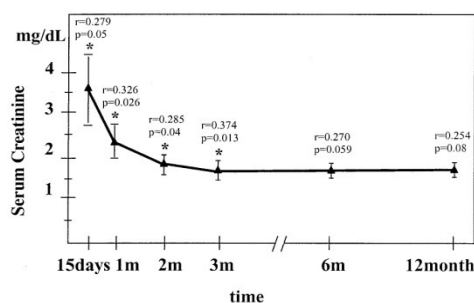


Fig 1. Relationship between immunohistochemical PARP-1 expression and serum creatinine level in following of kidney allograft. *Statistically significant correlation (Spearman test) between PARP-1 expression and serum creatinine level.

$= .01$, Spearman test), and creatinine levels in first 3 months (Fig 1), but not creatinine clearance or cystatin A levels. Kidneys from suboptimal donors that failed to reduce serum creatinine levels to <1.7 mg/dL after transplantation showed a higher intensity of PARP-1 expression (creatinine <1.7 PARP: 1.29 ± 1.49 vs creatinine >1.7 PARP: 2.29 ± 1.33 , $P = .047$, Mann-Whitney U test). The intensity of PARP expression showed no significant difference between right and left kidneys (1.81 ± 1.63 vs 1.47 ± 1.33 , respectively), although patients with a left kidney transplant needed more posttransplantation dialysis sessions (4.41 ± 6.5 vs 0.8 ± 1.9 , $P = .042$, Mann-Whitney U test), and their recovery of effective diuresis was later (12.3 ± 16 vs 5.5 ± 5.5 , $P = .015$, Mann-Whitney U test). There was a tendency for PARP-1 expression to be more intense in kidneys deemed unsuitable for transplantation although the difference did not reach statistical significance (2.16 ± 1.70 vs 1.56 ± 1.53 , $P = .126$, Mann-Whitney U test).

DISCUSSION

The present work revealed a greater intensity of immunohistochemical expression of PARP-1 in tubular cells of kidneys from suboptimal donors, suggesting that a lower tubular expression of PARP-1 was related to earlier recovery of renal function. In addition, transplanted kidneys in patients with serum creatinine levels that did not fall below 1.7 mg/dL showed almost double the intensity of PARP-1 expression. These findings indicate a possible relationship between the degree of PARP-1 activation and the extent of renal parenchymal injury.

Activation of the PARP-1 pathway, a recently discovered cell injury mechanism,^{9–11} is currently regarded as the final common effector in the pathogenesis of various types of tissue injury, including systemic inflammation, circulatory shock, and IR. A major contributor to the development and progression of IR induced renal failure is the loss of functioning tubular epithelial cells through cell deletion or cell death processes (necrosis or apoptosis). Donor kidneys

inevitably undergo a period of ischemia. In our series, the periods of cold ischemia and reanastomosis ranged from 9 to 39 hours from 30 to 90 minutes, respectively. The heterogeneous renal cell populations are well known to show variable resistance to ischemia. The proximal straight tubule and to some extent the thick ascending limb of the loop of Henle are more sensitive to ischemia. It can be hypothesized that these cells tend to undergo more necrosis compared with the less sensitive cells,¹² and that PARP-1 activation may be one of the pathogenic mechanisms.

Recovery of renal function depends not only on the replacement or regeneration of deleted cells, the theme of many recent studies, but also on the protection of cells from death. In vitro, necrotic cell death was induced by exposure of LLC-PK-1 tubular cells to H₂O₂, whereas 3-aminobenzamide, a PARP inhibitor, completely prevented this H₂O₂-induced necrosis.¹³ Moreover, in a heterotopic rat heart transplant model of early IR injury, the administration of PARP-1 inhibitors reduced the release of cardiospecific damage markers.^{14,15} These results suggest a role for PARP-1, with subsequent NAD(+) and ATP depletion, in acute tubular necrosis in renal transplantation. The administration of PARP-1 inhibitors may represent a therapeutic option to reduce damage from IR in suboptimal donor kidneys with an intense expression of PARP-1.

REFERENCES

1. de Murcia G, Menissier de Murcia J. *Trends Biochem Sci* 19:172, 1994
2. Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4908, 1986
3. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, et al. *Trends Biochem Sci* 20:405, 1995
4. Skaper SD. *Ann N Y Acad Sci* 993:217, 2003
5. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1753, 1996
6. Yelamos J, Oliver FJ. *Inmunologia* 21:219, 2002
7. Chatterjee PK, Zacharowski K, Cuzzocrea S, et al. *FASEB J* 14:641, 2000
8. O'Valle F, Gomez-Morales M, Reguero ME, et al: SEDYT 23:47-52. 2002 Available at: <http://www.seap.es/congresos/2003/cursotrasplantes/ovalle.htm>
9. Sims JL, Berger SJ, Berger NA. *Biochemistry* 22:5188, 1983
10. Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, et al. *J Clin Invest* 77:1312, 1986
11. Szabo C (ed): *Cell Death: The Role of PARP*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2002, p 1
12. Gobé G, Willgoss D, Hogg N, et al. *Kidney Int* 5:1299, 1999
13. Filipovic DM, Meng X, Reeves WB. *Am J Physiol* 277:F428, 1999
14. Fiorillo C, Ponziani V, Giannini L, et al. *Free Radic Res* 37:331, 2003
15. Szabo G, Bahrle S, Stumpf N, et al. *Circ Res* 90:100, 2002



Poly(ADP-Ribose) Polymerase Expression in Kidney Transplantation: From Alfa (α) to Omega (Ω)

F. O'Valle, M. Gómez-Morales, R.M.G. Del Moral, D. Serón, F. Moreso, A. Osuna, F.J. Oliver, and R.G. Del Moral

ABSTRACT

Introduction. Overactivation of the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) can be induced by ischemia-reperfusion and involved in the renal injury subsequent to kidney transplant. The poly(ADP-ribose)lation mechanism alters free radical-induced DNA damage, which is repaired by PARP-1 polymer. However, PARP-1 overexpression induces cellular necrosis. Our aim was to study the immunohistochemical PARP-1 expression in kidney transplant biopsies associated with various events.

Materials and Methods. We studied the nuclear expression of PARP-1 in kidney tubule cells by immunohistochemistry using the monoclonal antibody PAR01 in donor biopsies without acute tubular necrosis (ATN) ($n = 60$; controls), allografts that suffer ATN ($n = 90$) or an episode of acute humoral rejection ($n = 12$) or acute tubulointerstitial rejection ($n = 25$), or chronic allograft nephropathy ($n = 25$). Furthermore, we also studied protocol biopsies with subclinical rejection ($n = 60$). Renal lesions in transplant biopsies were graded blindly using 1997 Banff criteria without any clinical information.

Results. Biopsies without morphological features of ATN, namely acute tubulointerstitial rejection, borderline or subclinical rejection, showed lesser PARP-1 expression compared with biopsies with ATN or with ischemic mechanism of acute humoral rejection or chronic allograft nephropathys. We observed an inverse relation between PARP-1 expression and renal function ($P < .001$). Overall, renal biopsies showing ATN revealed greater expression of PARP-1 ($r = 0.785$, Pearson test). A significant relationship with PARP-1 expression was demonstrated with renal function (effective diuresis, serum creatinine levels) and pretransplant cold ischemia time ($P < .001$).

Conclusion. Kidney transplant events including ischemia were associated with the highest PARP-1 expression and worse allograft renal function.

POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE (PARP-1) is a nuclear, zinc-finger, DNA-binding protein with a molecular weight of 116 kDa that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced in mammalian cells by genotoxic agents.¹ PARP-1 catalyzes the adenosine diphosphate ribosylation of proteins using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) as the co-factor.² Activation of PARP is a consequence of ischemic injury, resulting in depletion of intracellular (NAD^+),³ which can only be replenished via a reaction that consumes adenosine triphosphate (ATP). Ischemia-reperfusion injury that results in substantial DNA degradation requires cells to consume large amounts of ATP to support poly(ADP-ribose)lation. For this reason, whereas a mod-

From the IBIMER and Department of Pathology (F.O., M.G.-M., R.M.G.D.M., R.G.D.M.), San Cecilio University Hospital and School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain; Department of Nephrology (D.S., F.M.), Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain; Department of Nephrology (A.D.), Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain; and Institute of Parasitology and Biomedicine (F.J.O.), CSIC, Granada, Spain.

This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI051197).

Address reprint requests to Francisco O'Valle, Dpto de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Avda de Madrid, s/n 18012 Granada, Spain. E-mail: fovalle@ugr.es

© 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/07/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2007.07.075

Transplantation Proceedings, 39, 2099–2101 (2007)

2099

Table 1. Demographic Characteristics of Patients and Evolution After Transplantation According to Diagnosis Group

Variable	D (n = 60)	SCR (n = 60)	ATN (n = 90)	AHR (n = 12)	ATR (n = 25)	CAN (n = 25)
Donor age (y)	58 ± 12	39 ± 16	46 ± 14	48 ± 14	52 ± 11	50 ± 8
Donor gender (M/F)	42/18	50/10	57/33	7/5	17/8	15/10
Patient age (y)	50 ± 13	50 ± 12	45 ± 12	52 ± 10	54 ± 8	55 ± 14
Patient gender (M/F)	36/24	46/14	55/37	6/6	16/9	15/10
First transplant/retransplant	—	53/7	78/12	4/8	19/6	21/4
Panel-reactive antibodies > 10%	—	5	4	10	1	2
Cold ischemia time (h)	18 ± 4	22 ± 5	18 ± 3	16 ± 8	19 ± 5	—
Delayed graft function (no/yes)	45/15	51/9	38/52	8/4	19/6	17/8
Acute rejection (no/yes)	60/0	53/7	82/8	0/12	0/25	6/19
Acute tubular necrosis	0/60	0/60	90/0	0/12	3/22	3/22
PARP-1 expression*	0.83 ± 1	0.34 ± 0.5	2.34 ± 0.8	2.5 ± 0.7	1.50 ± 1.2	2.05 ± 0.7
Serum creatinine (mg/dL)*	1.02 ± 0.2	1.50 ± 1.1	2.05 ± 0.3	2.2 ± 0.9	1.98 ± 1.3	2.8 ± 1.5
Time of biopsy (mon)	0	5.2	0.5	2.5	6	13

Values are expressed as mean ± standard deviation. D, donors; SCR, subclinical rejection; ATR, acute tubulointerstitial rejection; AHR, acute humoral rejection; ATN, acute tubular necrosis; CAN, chronic allograft nephropathy.

* $P < .001$, one-way ANOVA.

erate activity of PARP protects cellular genome integrity, its excessive activation can lead to cell death secondary to ATP depletion.⁴⁻⁶

To date only human renal transplant biopsies showing acute tubular necrosis (ATN) expression have been studied for PARP-1. In these cases more than 50% of biopsies had >50% positive, tubular nuclei for PARP-1. The increased immunohistochemical expression of PARP-1 showed a significant relationship to the duration of cold ischemia, to serum creatinine levels, and to the time to achieve effective diuresis.⁷ Nevertheless, no studies describe this enzyme during allograft dysfunction due to acute or chronic rejection episodes. The present immunohistochemical study examined PARP-1 expression in kidney transplant biopsies from various events.

MATERIALS AND METHODS

We studied 60 kidney biopsies from donors controls, as well as 212 kidney biopsies from allografts that suffered ATN ($n = 90$), or an episode of acute humoral rejection (AHR, $n = 12$), or acute tubulointerstitial rejection (ATR, $n = 25$), or chronic allograft nephropathy (CAN, $n = 25$). Furthermore, 60 protocol biopsies with subclinical rejection (SCR) were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin to determine glomerular, vascular, and tubulointerstitial lesions according to the Banff scheme.⁸ The nuclear expression of PARP-1 was examined by incubating sections for 1 hour at room temperature with PARP-1 monoclonal antibody (clone PAR01; LabVision Fremont, Calif, USA). Subsequently, the immunohistochemical reaction was performed on an automated immunostainer (LabVision), using the MasVision method (polymer with mouse and rabbit secondary antibodies peroxidase-conjugated) followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnóstica, Granada, Spain). The positivity and intensity of the immunostaining was calculated semiquantitatively using a 0 to 3 scale: 0, absence of positive tubular nuclei; 1, 1% to 9% of tubular nuclei positive; 2, 10% to 49% positive; and 3, >50% positive. All biopsies were analyzed in blinded fashion.

Data were gathered on renal function parameters (serum creatinine levels at time of biopsy and end of follow-up), age, cold ischemia, effective diuresis, and immunosuppressive regimen.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normal distribution of the variables. After the descriptive analysis, one-way analysis of variance (ANOVA) with post hoc Bonferroni test, Pearson correlation, and multivariate analyses were performed to assess statistical significance using the SPSS-Windows 14.0 programme (SPSS Inc. Chicago, Ill, USA). The confidence interval was 95% ($P < .05$).

RESULTS

Table 1 shows the mean values of age, genders of donors and recipients, and other demographic characteristics. Except donors, all patients had abnormal serum creatinine levels namely, at time of biopsy: 2.01 mg/dL (range = 1.45 to 5.27 mg/dL). The mean duration of cold ischemia was 18.6 hours. No immunosuppressive regimen exerted a statistically significant influence on the studied renal function parameters.

According to the Banff scheme, 25 subjects showed ATR (15 grade IA, eight grade IB, and two grade IIB), and 25 biopsies CAN (11 grade I, 10 grade II, and four grade III). ATN was present in 142 (52.2%) of the 272 cases.

The frequency distribution of the renal biopsies according to their immunohistochemical expression of PARP-1 was as follows: zero, 35.5%; one, 18.6%; two, 20.9%; and three, 24.9%. There were significant statistical differences in PARP-1 expression between groups ($P < .001$, one-way ANOVA; Table 1). There was a lower PARP-1 expression in biopsies without morphological features of ATN (kidney donors, ATR, borderline and subclinical rejection compared with those with ATN or implicated ischemic mechanisms: ATN, AHR, or CAN ($P < .001$, Bonferroni test; Fig 1). PARP-1 expression showed a statistically significant relationship to the duration of cold ischemia (r coefficient = 0.532, $P = .0001$, Pearson test), time to effective diuresis (r coefficient = 0.622, $P =$

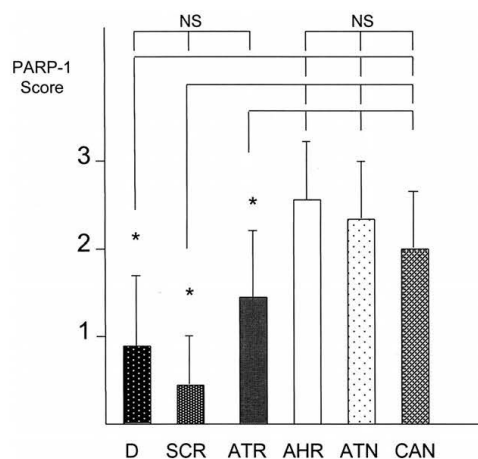


Fig 1. Immunohistochemical tubular PARP-1 expression in donors (D), subclinical rejection (SCR), acute tubulointerstitial rejection (ATR), acute humoral rejection (AHR), acute tubular necrosis (ATN), and chronic allograft nephropathy (CAN). *Lines indicate the statistical significant relationship ($P < .001$ Bonferroni test) between groups. NS, nonsignificant.

.0001, Pearson test), and serum creatinine levels at biopsy (r coefficient = 0.496, $P = .0001$, Pearson test).

In the multivariate model, only PARP-1 expression (r square: 0.513), and serum creatinine at time of biopsy (r square: 0.582, $P = .0001$) showed independent influences on the occurrence of ATN.

DISCUSSION

The present study revealed differential PARP-1 nuclear overexpression depending on the etiology of kidney allograft dysfunction. We detected great immunohistochemical expression of PARP-1 in ATN, CAN, and AHR versus less expression in ATR, SCR, and donor biopsies. In a previous study we reported a severe immunohistochemical expression of PARP-1 among tubular cells from human transplant kidneys with ATN, demonstrating a relationship between the greatest tubular expression of PARP-1 and delayed renal function.⁷ Our current data confirmed these results.

CAN remains the most important cause of late renal graft loss. However, the mechanism for graft dysfunction and the process of development of CAN are not well understood.⁹ CAN is characterized by progressive injury to the renal microvasculature and the development of renal scarring. In particular, injury, angioregression, and progres-

sive loss of the peritubular capillary network strongly contribute to the development of interstitial fibrosis and graft dysfunction in CAN and may play a crucial role in the development of CAN.¹⁰ In AHR, the pathologic mechanism is not precisely known. It has been proposed that complement-fixing cytotoxic alloantibodies directed toward class I and class II HLA antigens, as well as alloantibody-mediated apoptosis, cause lysis of peritubular capillaries.¹¹ We speculated that the capillary injury in both kidney transplant events is responsible for cortical ischemia and subsequent overexpression of PARP-1 in tubular cells. In contrast, ATR, SCR, and donors biopsies did not show capillary injury. Cases without ATN showed lesser immunohistochemical PARP-1 expression.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to acknowledge very specially to the technician of Department of Pathology María Dolores Rodríguez.

REFERENCES

1. de Murcia G, Menissier de Murcia J: Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19:172, 1994
2. Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, et al: Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4908, 1986
3. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, et al: Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20:405, 1995
4. Skaper SD: Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation: a strategy for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 993:217, 2003
5. Thiemeermann C, Bowes J, Myint FP, et al: Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:679, 1997
6. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, et al: Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687, 1994
7. O'Valle F, Benitez MC, Gomez-Morales M, et al: Role of poly(ADP-ribose) polymerase in kidney transplant and its relationship with delayed renal function: multivariate analysis. *Transplant Proc* 37:3684, 2005
8. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713, 1999
9. Nankivell BJ, Chapman JR: Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 81:643, 2006
10. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, et al: Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 67:321, 2005
11. Liptak P, Kemeny E, Morvay Z, et al: Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts. *Am J Transplant* 5:2870, 2005



Role of Poly-(ADP-Ribose) Polymerase in Transplant Acute Tubular Necrosis and Its Relationship With Delayed Renal Function

F. O'Valle, M.C. Benítez, M. Gómez-Morales, J. Bravo, A. Osuna, R.M.G. Del Moral, D. Martín-Oliva, F.J. Oliver, and R.G. Del Moral

ABSTRACT

The enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) participates in the repair of DNA damaged by genotoxic agents such as oxygen-derived free radicals. If the allograft suffers pretransplant cold ischemia and subsequent ischemia-reperfusion injury (IR), overactivation of PARP-1 can be induced, which may lead to an increase in acute tubular necrosis (ATN) and a delay in total recovery of renal function (RRF) of the transplanted organ. We studied the nuclear expression of PARP-1 in tubular cells by immunohistochemistry with the monoclonal antibody PAR01 in 104 kidney transplant biopsies from allografts with ATN. In 50% of biopsies with ATN, >50% of tubular nuclei were PARP-1⁺; only 9.6% of biopsies were negative. The increase in the immunohistochemical expression of PARP-1 showed a statistically significant relationship with the duration of cold ischemia, with serum creatinine levels, and with the time required to achieve effective diuresis ($P < .0001$, Spearman test). Cold ischemia of >24 hours and serum creatinine levels >1.7 mg/dL showed a statistically significant relationship with the highest PARP-1 expression levels (2.83 ± 0.4 vs 1.36 ± 0.8 , $P < .0001$, Mann-Whitney U test). We conclude that PARP-1 plays an important role in ATN and RRF and is related to the extent and severity of ATN and to the renal allograft function.

PARP-1 is a nuclear zinc-finger DNA-binding protein with a molecular weight of 113 kd that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced by different genotoxic agents in mammalian cells.¹ PARP-1 catalyzes the ADP-ribosylation of proteins using NAD(+) as the substrate.² The activation of PARP is a consequence of ischemic injury and results in a depletion of intracellular NAD(+),³ which can only be replenished via a reaction that consumes ATP. Ischemia-reperfusion (I/R) injury that results in substantial DNA degradation requires cells to consume large amounts of ATP to support poly ADP-ribosylation. For this reason, whereas moderate activity of PARP protects cellular genome integrity, its excessive activation can lead to cell death secondary to ATP depletion.⁴⁻⁶

Acute failure of the transplanted kidney is a major problem in the early posttransplant phase and is acknowledged as a cause of allograft loss. Early renal transplant dysfunction is mainly due to ischemic damage (acute tubular necrosis [ATN]), rejection, infection, and cyclosporine toxicity.⁷ Renal ischemia is a major cause of acute renal failure, whether or not caused during transplantation, ini-

tiating a complex and interrelated sequence of events resulting in injury and eventual death of renal cells.^{8,9} Salahudeen et al recently studied 6465 kidney transplant patients using UNOS data and concluded that prolonged cold ischemia is a significant predictor of long-term graft loss.¹⁰ The prognosis is complicated by the fact that reperfusion, although essential for the survival of ischemic renal tissue, causes additional damage (reperfusion injury)^{11,12} that contributes to the renal dysfunction and injury associated with I/R of the kidney.^{8,12} Within the kidney, the proximal tubule appears to be particularly susceptible to

From the Department of Pathology, San Cecilio University Hospital and School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain (F.O'V., M.C.B., M.G.-M., R.M.G.D.M., R.G.D.M.); Department of Nephrology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain (J.B., A.O.); and Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain (D.M.-O., F.J.O.).

Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant PI021505).

Address reprint requests to Dr Raimundo G. del Moral, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, 18012 Granada, Spain. E-mail: rgarcia@ugr.es

© 2005 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/05/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2005.02.040

Transplantation Proceedings, 37, 1421-1423 (2005)

1421

I/R injury, leading to ATN, which plays a pivotal role in the pathogenesis of early transplanted kidney dysfunction.^{7,9,12}

Ischemia-reperfusion injury is a common process that triggers a pathophysiologic cascade, including an inflammatory response with the release of cytokines and oxygen-derived free radicals. PARP-1 was recently shown to be involved in the pathogenesis of various forms of I/R injury in animal models.¹³ In addition, the pharmacologic inhibition of PARP-1 reduces reperfusion injury in the kidney and other organs of the rat.¹⁴ The present study examined whether increased tubular expression of PARP-1 in human allograft kidneys with ATN contributes to a subsequent delayed renal function.

MATERIALS AND METHODS

One hundred four kidney biopsies from 104 transplant patients at Hermanos Almeyras Hospital, La Habana, were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin to determine glomerular, vascular, and tubulointerstitial lesions, according to the Banff scheme.¹⁵ Biopsies were taken between day 5 and day 11 of the transplant (mean 7.3 days) for oliguria in 101 patients (97.1%) and/or increased renal volume in 20 patients (19.2%). The nuclear expression of PARP-1 was characterized by incubating sections for 16 hours at 4°C with PARP-1 monoclonal antibody (Clone PAR01) (LabVision, Fremont, Calif). Subsequently, the immunohistochemistry study was done on an automated immunostainer (LabVision), using the streptavidin-biotin-peroxidase method followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnóstica, Granada, Spain). The positivity and intensity of the immunostaining was calculated semiquantitatively using a 0 to 3 scale (0, absence of positive tubular nuclei; 1, 1% to 9% tubular nuclei positive; 2, 10% to 49% positive; and 3, >50% positive). Data were gathered on renal function parameters (serum creatinine levels at time of biopsy and end of follow-up), age, cold ischemia, effective diuresis, and immunosuppression regimens. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normal distribution of the variables. After the descriptive analysis, Spearman correlation and Mann-Whitney *U* test analyses were performed to determine statistical significance. The confidence interval was 95% ($P < .05$). The statistical analysis was performed using SPSS v11.0 (SPSS, Inc, Chicago, Ill).

RESULTS

Of the 104 biopsies studied, 99 (95.1%) corresponded to cadaveric donors and 5 (4.8%) to living donors. The mean age of the patients was 46.5 ± 11.4 years, all of whom had altered serum creatinine levels (at time of biopsy: 1.73 mg/dL, range 1.45 to 1.90 mg/dL; at end of follow-up: 2.01 mg/dL, range 1.55 to 2.90 mg/dL). The mean duration of cold ischemia was 22 hours (range 1 to 31 hours). No immunosuppressive regimen exerted a statistically significant influence on renal function parameters studied. Ten patients developed an acute rejection episode, 3 with concomitant ATN and 7 without ATN, and 12 patients (all with ATN) showed borderline changes. The mean time to effective diuresis was 13.7 days [range 0 to 24 days].

According to the Banff scheme, 12 biopsies were diagnosed with borderline changes (11.5%) and 10 with acute rejection (9.6%; 5 grade I and 5 grade II). ATN was present

in 94 (90.3%) of the 104 cases, and changes suggestive of cyclosporine nephrotoxicity were present in 2 (1.9%). Only the kidneys with ATN ($n = 94$) were selected for the statistical study.

The frequency distribution of the renal biopsies according to their immunohistochemical expression of PARP-1 was as follows: zero, 9.6%; one, 11.5%; two, 28.8%; and three, 50%. PARP-1 expression showed a statistically significant relationship with the duration of cold ischemia (rho coefficient = 0.806, $P = .0001$, Spearman test), time to effective diuresis (rho coefficient = 0.774, $P = .0001$, Spearman test), and serum creatinine levels (rho coefficient = 0.649, $P = .0001$, Spearman test). Kidneys from ATN patients who failed to reduce serum creatinine levels to <1.7 mg/dL after transplantation showed a different intensity of PARP-1 expression (creatinine <1.7 , PARP 1.71 ± 0.58 vs creatinine >1.7 , PARP 2.40 ± 1.05 , $P < .0001$, Mann-Whitney *U* test).

DISCUSSION

A prolonged cold ischemia time is a strong risk factor for delayed graft function (DGF) and graft loss.^{10,16} This present study revealed a severe intensity of immunohistochemical expression of PARP-1 in the tubular cells of human transplant kidneys with ATN and demonstrated a relationship between the highest tubular expression of PARP-1 and delayed renal function. In addition, transplanted kidneys in patients with serum creatinine levels that did not fall to <1.7 mg/dL presented almost double the intensity of PARP-1 expression. To our knowledge, this is the first time that the degree of PARP-1 activation has been related to the extent of human renal tubular injury and to renal function.

Activation of the PARP-1 pathway, a recently discovered cell injury mechanism,¹⁷⁻¹⁹ is currently regarded as the final common effector in the pathogenesis of various types of tissue injury, including systemic inflammation, circulatory shock, and I/R. A major contributor to the development and progression of I/R-induced renal failure is the loss of functioning tubular epithelial cells through cell deletion or cell death processes (necrosis or apoptosis). Donor kidneys inevitably undergo a period of ischemia. In our series, the periods of cold ischemia ranged from 1 to 31 hours. The variable resistance to ischemia of the heterogeneous renal cell population is well known. The proximal straight tubule and, to some extent, the thick ascending limb of the loop of Henle are more sensitive to ischemia. It can be hypothesized that these cells tend to suffer more necrosis in comparison with less sensitive cells,²⁰ and that PARP-1 activation may be one of the pathogenic mechanisms. Thus, in our 94 patients with ATN, the kidneys that tolerated a long period of cold ischemia had the highest levels of PARP-1 (<24 hours: 1.71 ± 0.62 ; ≥ 24 hours: PARP-1: 2.86 ± 0.350). In fact, the lowest PARP-1 expression (1% to 9% of tubular nuclei positive) was only observed in kidneys with

<20 hours of cold ischemia (mean 16.36 hours, range 12 to 20).

Delayed renal function after kidney transplantation may be due to various factors, such as the condition of the transplanted kidney and the compliance of the vascular system in the renal graft or recipient. The functional capacity of renal tubular cells contributes significantly to adequate renal function. Hence, measures taken to ameliorate the condition of these cells may also improve the outcome of kidney transplantation.²¹ We found a statistically significant relationship between the highest expression of PARP-1 and delayed renal function, with a moderate or severe PARP-1 expression (mean 2.64 ± 0.68) in all kidneys suffering >10 hours of cold ischemia and a mild expression (1.26 ± 0.86) in those with ≤ 10 hours of cold ischemia.

Although long-term inhibition of PARP activity is likely to be harmful to the cell, it has been proposed that its transient inhibition after I/R injury may prevent cell death.⁵ Recovery from renal function depends not only on the replacement or regeneration of deleted cells, the theme of many recent studies, but also on the protection of cells from death. In vitro, necrotic cell death was induced by the exposure of LLC-PK-1 tubular cells to H₂O₂, whereas 3-aminobenzamide, a PARP inhibitor, completely prevented this H₂O₂-induced necrosis.²² Moreover, in a heterotopic rat heart transplant model of early I/R injury, the administration of PARP-1 inhibitors reduced the release of cardiospecific damage markers.^{23,24} These results suggest a role for PARP-1, with subsequent NAD(+) and ATP depletion, in acute tubular necrosis in renal transplantation. The administration of PARP-1 inhibitors may represent a therapeutic option to reduce damage from I/R in donor kidneys with intense PARP-1 expression by preventing or minimizing ATN.

REFERENCES

- de Murcia G, Menissier de Murcia J: Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19:172, 1994
- Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, et al: Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4908, 1986
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, et al: Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20:405, 1995
- Skaper SD: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation: a strategy for neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 993:217, 2003
- Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, et al: Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:679-683, 1997
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, et al: Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687, 1994
- Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, et al: Acute failure of the transplanted kidney—pathophysiology, diagnosis and prevention. *Ann Transplant* 1:5, 1996
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *N Engl J Med* 334:1448, 1996
- Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271:F477, 1996
- Salahudeen AK, Haider N, May W: Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int* 65:713, 2004
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML: Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 83:162, 1996
- Paller MS: The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Invest Med* 42:632, 1994
- Yelamos J, Oliver FJ: Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the inflammatory response. *Immunologia* 21:219, 2002
- Chatterjee PK, Zacharowski K, Cuzzocrea S, et al: Inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase reduce renal ischemia-reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo. *FASEB J* 14:641, 2000
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713, 1999
- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al: Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63:968, 1997
- Sims JL, Berger SJ, Berger NA: Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry* 22:5188, 1983
- Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, et al: Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks-activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 77:1312, 1986
- Szabó C (ed): Cell death: the role of PARP. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2000
- Gobé G, Willgoss D, Hogg N, et al: Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 5:1299, 1999
- Webb SJ: Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol* 41:1, 1997
- Filipovic DM, Meng X, Reeves WB: Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 277:F428, 1999
- Fiorillo C, Ponziani V, Giannini L, et al: Beneficial effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition against the reperfusion injury in heart transplantation. *Free Radic Res* 37:331, 2003
- Szabo G, Bahrle S, Stumpf N, et al: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation. *Circ Res* 90:100, 2002

Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 Expression Is Related To Cold Ischemia, Acute Tubular Necrosis, and Delayed Renal Function In Kidney Transplantation

Francisco O'Valle^{1*}, Raimundo G. M. Del Moral¹, María del Carmen Benítez¹, David Martín-Oliva², Mercedes Gómez-Morales¹, David Aguilar¹, José Aneiros-Fernández¹, Pedro Hernández-Cortés³, Antonio Osuna⁴, Francesc Moreso⁵, Daniel Serón⁵, Francisco J. Oliver⁶, Raimundo G. Del Moral¹

1 Department of Pathology and Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain, **2** Department of Cell Biology, University of Granada, Granada, Spain, **3** Department of Traumatology and Orthopaedic Surgery, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain, **4** Department of Nephrology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain, **5** Department of Nephrology, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain, **6** Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Armilla, Granada, Spain

Abstract

Cold ischemia time especially impacts on outcomes of expanded-criteria donor (ECD) transplantation. Ischemia-reperfusion (IR) injury produces excessive poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 (PARP-1) activation. The present study explored the hypothesis that increased tubular expression of PARP-1 contributes to delayed renal function in suboptimal ECD kidney allografts and in non-ECD allografts that develop posttransplant acute tubular necrosis (ATN).

Materials and Methods: Nuclear PARP-1 immunohistochemical expression was studied in 326 paraffin-embedded renal allograft biopsies (193 with different degrees of ATN and 133 controls) and in murine Parp-1 knockout model of IR injury.

Results: PARP-1 expression showed a significant relationship with cold ischemia time (r coefficient = 0.603), time to effective diuresis ($r = 0.770$), serum creatinine levels at biopsy ($r = 0.649$), and degree of ATN ($r = 0.810$) ($p = 0.001$, Pearson test). In the murine IR model, western blot showed an increase in PARP-1 that was blocked by Parp-1 inhibitor. Immunohistochemical study of PARP-1 in kidney allograft biopsies would allow early detection of possible delayed renal function, and the administration of PARP-1 inhibitors may offer a therapeutic option to reduce damage from IR in donor kidneys by preventing or minimizing ATN. In summary, these results suggest a pivotal role for PARP-1 in the ATN of renal transplantation. We propose the immunohistochemical assessment of PARP-1 in kidney allograft biopsies for early detection of a possible delayed renal function.

Citation: O'Valle F, Del Moral RGM, Benítez MDC, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, et al. (2009) Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 Expression Is Related To Cold Ischemia, Acute Tubular Necrosis, and Delayed Renal Function In Kidney Transplantation. PLoS ONE 4(9): e7138. doi:10.1371/journal.pone.0007138

Editor: Carmine Zoccali, L' Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy

Received: January 12, 2009; **Accepted:** August 24, 2009; **Published:** September 28, 2009

Copyright: © 2009 O'Valle et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grants PI021505, and PI051197). The funders had no role in study design, data collection and analysis, publication, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fovalle@ugr.es

Introduction

Renal ischemia produced during transplantation or otherwise is a major cause of acute kidney injury, initiating a complex and interrelated sequence of events that result in the injury and eventual death of renal cells [1,2]. Prolonged cold ischemia contributes to organ damage and increases patient morbidity and mortality. Salahudeen et al. recently studied 6,465 kidney transplant patients using United Network for Organ Sharing (UNOS) data and concluded that prolonged cold ischemia is a strong risk factor for delayed graft function and a significant predictor of short-term [3] and long-term [4] graft loss, as reported by other authors [5,6]. Nevertheless, the pathogenic mechanism has yet to be fully elucidated.

Johnston et al. concluded that cold ischemia time has a major impact on the outcome of transplants from aged and expanded-criteria donors (ECDs). In non-ECD kidneys, very prolonged cold ischemia time is associated with an increase in primary non-function. ECD kidneys from older donors show a greater increase in delayed

graft function with longer cold ischemia time. Thus, ECD grafts with cold ischemia time of >8 h have higher delayed graft function rates than do non-ECD grafts with cold ischemia time of >37 h [7].

Early renal transplant dysfunction is mainly caused by ischemic damage (acute tubular necrosis [ATN]), rejection, infection, or cyclosporin A toxicity [8]. The prognosis is complicated by the fact that reperfusion, although essential for the survival of ischemic renal tissue, causes additional damage (reperfusion injury) [9,10] that contributes to the renal dysfunction and injury associated with ischemia/reperfusion (IR) of the kidney [1,10].

Poly[ADP-Ribose] Polymerase-1 (PARP-1) (E.C. 2.4.2.30) is a nuclear zinc-finger DNA-binding protein with a molecular weight of 113 kDa that specifically detects DNA-strand breaks or nicks produced by different genotoxic agents in mammalian cells [11]. PARP-1 catalyzes the ADP ribosylation of proteins using NAD(+) as substrate [12]. PARP activation is a consequence of ischemic injury and results in a depletion of intracellular NAD(+) [13], which can only be replenished *via* a reaction that consumes ATP.

DNA damage produced by IR injury requires cells to consume large amounts of ATP to support poly(ADP-ribosylation). For this reason, whereas moderate PARP activity protects cellular genome integrity, excessive PARP activation can lead to cell death from ATP depletion [14–16]. Our group previously demonstrated that PARP1 expression in tubules of aged donors correlates with functional reserve parameters (serum creatinine and time required to achieve effective diuresis) [17].

The present study was designed to produce clinicopathological evidence to test the hypothesis that increased tubular expression of PARP-1 in human allograft kidneys that are suboptimal or develop ATN posttransplant might be one of the predictive factors for a subsequent delay in renal function.

Materials and Methods

We studied 326 paraffin-embedded renal allograft biopsies distributed in four groups: two ECD groups, one with and one without the presence of ATN; and two non-ECD groups, one with and one without the presence of ATN. ECDs were selected as specified in UNOS policies and procedures as either ≥ 60 yrs of age or between 50 and 59 yrs of age with at least two of the following three risk factors: a history of hypertension, a history of cerebrovascular disease, and serum creatinine at any time ≥ 1.5 mg/dL [7].

For the ECDs, 220 kidney wedge biopsies were fixed in Glyofix (Pacisa-Giralt, Barcelona, Spain) and embedded in paraffin by microwave-accelerated technique to determine renal lesions at 0-h pre-transplant. Out of these 220 ECD kidneys, 95 biopsies with some degree of ATN and 65 without ATN (serving as control group) were selected for the study. The remaining 60 kidneys were not transplanted due to severe vascular or glomerulo-interstitial renal lesions, and 20 of these were maintained as whole perfused kidneys at 4°C for 48 h in Wisconsin preservation solution. For the non-ECDs, 98 kidney cylinder biopsies were taken between days 5 and 11 post-transplant from oligoanuric recipients, fixed in 10% buffered formalin, and embedded in paraffin by standard procedure to identify ATN and classify its degree as: mild (1) [$<10\%$ of tubules with necrotic cells], moderate (2) [10 to 49%], or severe (3) [$\geq 50\%$]. A further 68 kidney sections (transplant protocol biopsies) from non-ECDs with stable renal function and without morphological evidence of ATN served as a control group. The study was conducted according to the Helsinki declaration and approved by the Ethics Committee of the hospital. All biopsies were taken after written informed consent was obtained and subjects were included in this investigation after agreeing to participate and signing the appropriate consent form.

Nuclear expression of PARP-1 was characterized by incubating sections for 60 min at room temperature with PARP-1 monoclonal antibody (clone A6.4.12) (LabVision Fremont, CA, USA). The immunohistochemistry study was done on an automatic immunostainer (model autostainer480, LabVision) using the polymer peroxidase-based method followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnóstica, Granada, Spain). The positivity of immunostaining was calculated semiquantitatively on a 4-point scale (0, absence; 1 [1–9% of tubular nuclei positive]; 2 [10–49%]; 3 [$\geq 50\%$]). Renal sections incubated with isotype antibody and tonsil sections were used as negative and positive controls, respectively.

Data were gathered on renal function parameters (serum creatinine [mg/dL], creatinine clearance [mL/min/1.73 m²]), donor and recipient age and sex, cold-ischemia time, reanastomosis time, time to effective diuresis (defining effective diuresis in terms of Cockcroft-Gault calculated creatinine clearance rather than need for posttransplantation dialysis), immunosuppression regimens, and number of hemodialysis sessions.

Ischemia-reperfusion (IR) mouse model

We used 20 male Parp1^{+/+} wild-type and 20 male Parp1^{-/-} knockout C57BL/6 mice (24 wks old and 20–30 g). Knockout mice were obtained according to a previously reported procedure [18]. The mice were kept under stable conditions at the Institute of Parasitology and Biomedicine in Granada with *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed according to European Union and Spanish Government guidelines for the ethical care of animals (EU Directive 86/609, RD 223/1988).

Mice were anesthetized by intraperitoneal inoculation of equitensin (2 IU/20 g) and maintained at 37°C on a thermal plate. The left kidney was accessed by anterolateral abdominal horizontal incision of 1.5 cm, and the vascular pedicle was clamped with a model 2A S&T metallic clip (S&T Microlab AG, Rheinfahl, Switzerland), maintaining the kidneys within the abdominal cavity under University of Wisconsin solution flow at 4°C. After 45 min of clamping, the clip was removed and the peritoneum and skin were sutured. After 6 and 48 h of reperfusion, the animals were killed with an overdose of sodium pentothal. There were no deaths during postoperative or reperfusion periods.

Administration of PARP inhibitor to mice

PARP-1 inhibitor 3-aminobenzamide (3-ABA) was purchased from Sigma Chemicals (St Louis, MO) and dissolved in saline at a concentration of 5 mg/mL 3-ABA (10 mg/kg) was administered intraperitoneally at 1 h before ischemic injury. Vehicle-treated mice received the saline injection without 3-ABA. In preliminary control experiments, it was determined that administration of 3-ABA to sham-operated mice had no morphological effect.

Renal samples and processing

Two groups of kidneys from C57BL/6 Parp1^{+/+} mice and two groups from C57BL/6 Parp1^{-/-} mice were formed, divided between kidneys with 6 h or 48 h of reperfusion ($n = 10$ for each time and mouse type) and kidneys with 6 h of reperfusion plus PARP-1 inhibitor 3-ABA ($n = 10$ for each group); two groups of control kidneys for each reperfusion time were also studied ($n = 20$ for each group). In all animals, the left kidney was subjected to ischemia-reperfusion by clamping the complete renal vascular pedicle, using the right kidney as control. After extraction, each kidney sample was divided longitudinally into two halves. One half, with separated cortex and medulla, was rapidly frozen in isopentane at -50°C and submerged in liquid nitrogen for 10 s to develop western-blotting. The other half was immediately fixed in 10% buffered formalin for 24 h and then paraffin-embedded for morphological study using hematoxylin-eosin and PAS staining.

Western blot analysis

Tissues extracted from the human and mouse kidney cortex samples were washed with PBS and resuspended in 100 μL lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β -mercaptoethanol) for 30 min on ice. Pellet was eliminated and sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 6% β -mercaptoethanol, 3% SDS, 0.003% bromophenol blue) was added to the supernatant. Proteins were resolved on SDS-12% polyacrylamide gels and transferred onto Immobilon-PVDF Membrane (Bio-Rad, Laboratories Irvine, CA, USA). The blot was blocked with 5% milk powder in PBS with 0.1% Tween-20 for 30 min, washed with PBS/Tween, and incubated overnight with anti-poly[ADP-ribose] (PAR) (TREVIGEN, Gaithersburg, MD), anti-PARP1 (clone C2-10) (Alexis, San Diego, CA, USA), and anti- α -tubulin (Sigma, St Louis MO, USA)

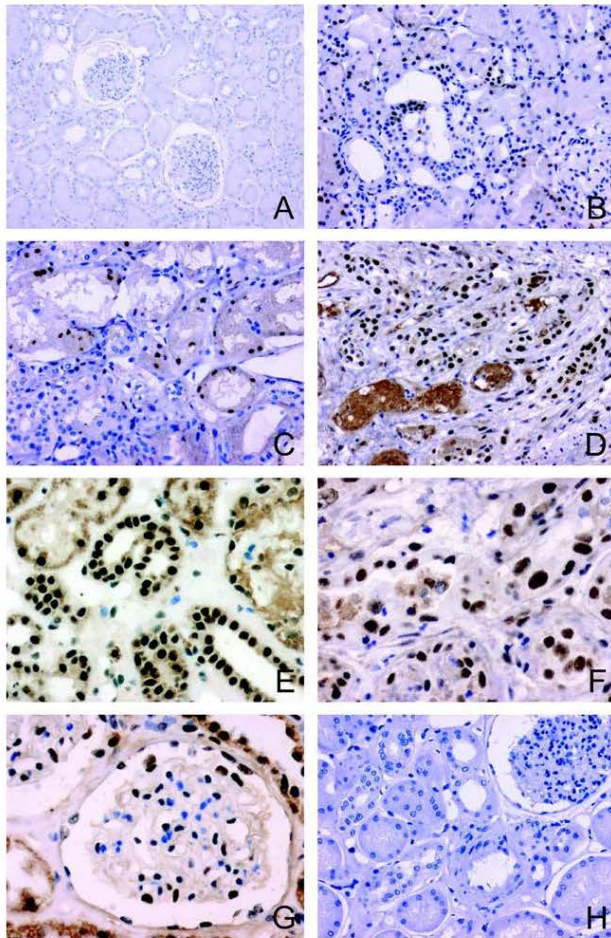


Figure 1. PARP-1 expression in human kidneys using polymer peroxidase-based method. A) Absence of PARP-1 expression in tubular cell nuclei in transplant protocol biopsy of kidney with stable renal function and without ATN ($\times 100$). B) Moderate PARP-1 expression in tubular cells of ECD kidney biopsy with ATN ($\times 200$). C) Moderate PARP-1 expression in necrotic tubuli of posttransplant kidney biopsy with ATN ($\times 200$). D, E, F): Intense PARP-1 expression in various biopsies with severe ATN (D $\times 200$, and E, F $\times 400$). G) Glomerular immunostaining in a case of severe ATN. Note nuclear immunostaining in capillary and Bowman's capsule ($\times 400$). H) Negative isotype control ($\times 200$). doi:10.1371/journal.pone.0007138.g001

antibodies and for 2 h with appropriate secondary antibodies. Bands were visualized by ECL-PLUS (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), and photographs were taken using the ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad). Positive control: Poly-ADP-ribosylated-PARP protein control for Western Blot (TREVIGEN, Gaithersburg, MD).

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the variables. A descriptive analysis was performed, and the Student's *t*-test, one way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, chi

square test, and Pearson's correlation were applied to determine statistical significances. We constructed ROC curves for PARP-1 and calculated the area under the curve. The statistical analysis was performed using the SPSS-Windows 15.0 program (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The confidence interval was 95% ($p < 0.05$).

Results

Overall PARP-1 expression in the 326 paraffin-embedded renal allograft biopsies studied was scored as follows: 0 (38.9%); 1 (19.2%); 2 (18.9%); and 3 (23.0%). A score of 0 was only detected in renal

Table 1. Comparative data among control kidneys (from expanded-criteria donors [ECD] and patients with stable renal function), preimplant kidneys from ECDs, and transplanted kidneys from patients with ATN.

Variable	ECD without ATN (n = 65)	ECD with ATN (n = 95)	P values Bonferroni test	Non-ECD without ATN (n = 68) [†]	Non-ECD with ATN (n = 98)	P values Bonferroni test
Age of donor (years)*	58.4±11.9	63.63±7.01	NS	38.70±15.5	38.20±6.33	NS
PARP-1 Score [0–3]*	1.05±0.54	1.66±0.32	P = 0.0001	0.34±0.59	2.33±0.85	P = 0.0001
Age receptor (years)*	50.8±13.2	54.32±11.02	NS	48.4±12.8	40.57±10.47	NS
Cold ischemia time (hours)*	18.39±4.31	19.32±4.48	P = 0.307	19.7±5.09	23.24±5.31	P = 0.112
Anastomosis time (min)	44.4±11.4	44.28±9.54	NS	43.6±12.4	42.06±8.21	NS
Time to efficient diuresis (days)*	2.06±3.33	7.94±5.42	P = 0.0001	0.69±2.67	14.10±4.60	P = 0.0001
N° of hemodialysis*	1.82±2.87	2.63±4.63	P = 0.0001	0.4±0.25	2.06±3.36	P = 0.0001
Creatinine at biopsy (mg/dL)*	1.02±0.10	1.09±0.15	NS	1.32±0.07	1.72±0.09	P = 0.001
Creatinine at one month (mg/dL)*	1.88±0.65	2.35±1.11	P = 0.003	1.51±0.23	3.25±1.37	P = 0.0001
Creatinine at six months (mg/dL)*	1.97±1.05	1.86±0.49	P = 0.55	1.38±0.42	2.94±0.85	P = 0.0001
Creatinine at twelve months (mg/dL)*	1.45±0.50	1.85±0.55	P = 0.001	1.15±0.43	2.90±0.96	P = 0.0001
Creatinine <1.7 (mg/dL) (days)*	22.15±13.8	34.30±27.4	P = 0.001	15.45±9.38	32.3±29.3	P = 0.0001
Cr Clearance at one month*	44.70±19.04	40.52±18.43	NS	55.38±18.5	46.75±12.12	P = 0.001
Cr Clearance at six months*	46.89±18.20	46.05±19.78	NS	59.16±17.8	52.01±19.21	P = 0.01
Cr Clearance at one year*	47.62±13.25	46.75±14.22	NS	59.34±18.7	44.77±19.04	P = 0.005

ECD: Expanded-criteria donor with ATN; ATN: Acute tubular necrosis. Values are expressed as mean ± standard deviation.

*P = 0.0001 one-way ANOVA test and *post hoc* with Bonferroni test.

[†]Transplant protocol biopsies with stable renal function; NS: Non-significant.

doi:10.1371/journal.pone.0007138.t001

biopsies without ATN. The mean age of non-ECDs with ATN was 40.7±10.47. The cold ischemia time was 23.24±5.31 h [range 1–31 h]. The group formed by 98 allograft kidneys with ATN of degree 1 (30.6%), 2 (44.9%), or 3 (24.5%) showed more intense PARP-1 expression (score 2 [45%], score 3 [25%]) at 5–11 days post-transplant versus transplant protocol biopsies with stable renal function (Figure 1). The mean age of ECDs with ATN was 63.63±7.01 yrs and the cold ischemia time was 19.32±4.48 h [range, 8–36 h]. The group formed by 95 pre-transplantation kidney biopsies with ATN of degree 1 (86%), 2 (14%), or 3 (0%) showed a mild nuclear tubular expression of PARP-1.

Table 1 compares the mean values of the four groups of renal biopsies studied and shows the statistical significance of differences found. At time of biopsy, transplanted kidneys with ATN from younger kidney donors (non-ECDs) had higher creatinine serum levels compared with kidneys from ECDs (1.72±0.09 vs. 1.09±0.15, p = 0.0001 Bonferroni test), which had a lower degree

of ATN. The group of non-ECD transplanted kidneys with clinical evidence of ATN had longer cold ischemia time and time-to-effective diuresis versus the other groups, including the preimplant ECD kidneys with ATN (one-way ANOVA test, p = 0.0001 for both variables). Degree of ATN was significantly correlated with PARP-1 expression (r coefficient = 0.810, p = 0.0001, Pearson test), with a mean expression of 2.83±0.48 in severe ATN versus 1.53±0.96 in mild cases and 0.33±0.56 in absence of ATN (p = 0.0001, one-way ANOVA test). A significant difference in kidney PARP-1 expression was found between recipients of non-ECD kidneys, which largely showed moderate or intense ATN, and ECD biopsy specimens, which showed only mild or moderate ATN (2.33±0.85 vs. 1.69±0.91, p = 0.0001 Bonferroni test). Degree of ATN was also related to time to recovery of effective diuresis (p = 0.0001, one-way ANOVA test). Cold ischemia time (≤ or >20 h) had a major effect on time to recovery of effective diuresis (4.39±5.3 days vs. 12.41±7.4 days, p = 0.0001, Student's

Table 2. Clinical variables according to nuclear immunohistochemical expression of PARP-1 in human kidney biopsies.

Variables	PARP-1 negative	PARP-1 positive	P Values*
Age of donor (years)	49.06±17.1	45.95±14.6	NS
Cold ischemia time (hours)	18.34±5.37	22.12±4.74	P = 0.0001
Time to efficient diuresis (days)	1.65±1.97	10.35±6.75	P = 0.0001
Creatinine at one month (mg/dL)	1.93±2.71	2.71±1.31	P = 0.0001
Creatinine at six months (mg/dL)	1.70±0.76	2.43±1.07	P = 0.0001
Creatinine at twelve months (mg/dL)	1.49±0.78	2.18±1.04	P = 0.0001
Creatinine <1.7 (mg/dL) (days)	5.10±13.55	13.15±18.11	P = 0.0024

Values are expressed as mean ± standard deviation; NS: Non-significant.

*Student's *t* test.

doi:10.1371/journal.pone.0007138.t002

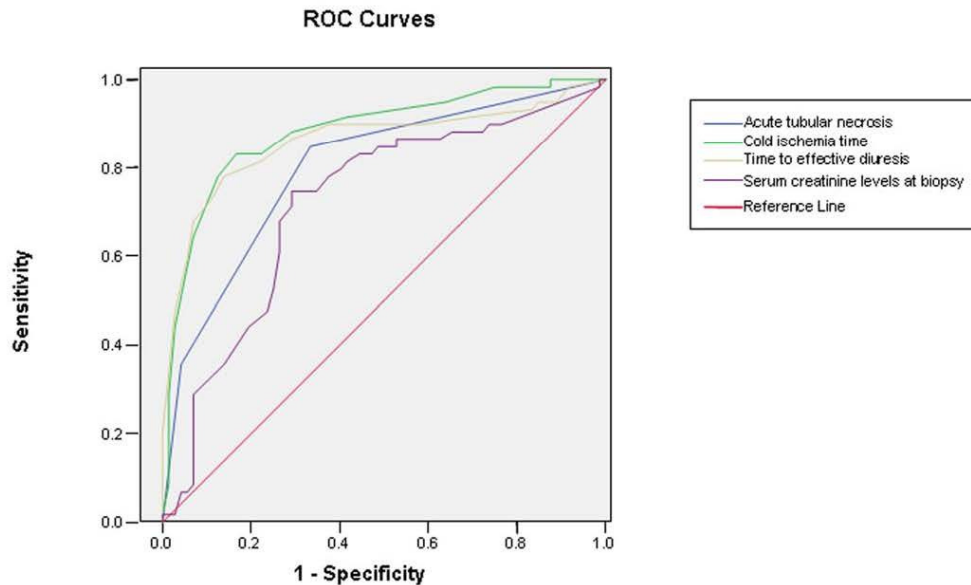


Figure 2. Representation of ROC curves using PARP-1 expression as state variable.
doi:10.1371/journal.pone.0007138.g002

t-test), and a duration of >20 h was associated with more than two-fold higher tubular expression of PARP-1 (0.86 ± 0.94 vs. 2.10 ± 1.23 , $p = 0.0001$, Student's *t*-test). Among the 178 kidneys with ≤ 20 h of cold ischemia, 105 did not have ATN, twenty-three had moderate ATN, and only three had severe ATN ($p = 0.0001$, chi-square test).

PARP-1 appears to have played an important role in early kidney allograft function (Table 2), with a statistically significant relationship between its expression and cold ischemia time (r coefficient = 0.603, $p = 0.0001$, Pearson test), time to effective diuresis ($r = 0.770$, $p = 0.0001$, Pearson test), and serum creatinine levels at time of biopsy ($r = 0.649$) and at three months ($r = 0.403$, $p = 0.0001$, Pearson test) but not at six months or one year. Likewise, the degree of ATN showed a significant correlation with the same parameters (cold ischemia time $r = 0.456$; time to effective diuresis $r = 0.696$; and creatinine levels at time of biopsy $r = 0.520$, one month $r = 0.455$, and six months $r = 0.508$, $p = 0.0001$, Pearson test). There was an even greater difference

in PARP-1 expression intensity between kidneys from ATN patients who did not reduce serum creatinine levels to below 1.7 mg/dL after transplantation and those from ATN patients who did (creatinine <1.7, PARP-1 1.79 ± 0.62 vs. creatinine >1.7, PARP-1 2.33 ± 1.04 , $p = 0.0001$, Student's *t*-test). Figure 2 and Table 3 represent and summarize the statistical results of the ROC curve analyses, showing the high values of the area under curve for the variables ATN, cold ischemia time, time to effective diuresis, and serum creatinine level at biopsy.

In all 20 kidneys ruled out for transplantation but preserved as whole perfused kidneys, immunohistochemistry study revealed a marked increase in PARP-1 expression between the biopsy at 0 h and the renal cortex after 48 h of cold ischemia in Wisconsin preserved solution (Figure 3A), and western blot study showed a mild activation of PARP-1 after the 48 h of cold ischemia (Figure 3B).

In a *Pap1* knockout mouse IR model, we used western-blot to demonstrate induction of PARP-1 expression in kidney cortex of

Table 3. Area under the ROC curve, statistical significance and p-values using dichotomous PARP-1 expression in human kidney biopsies as state variable.

Variables	Area	Typ. error	P-values	Superior limit ^{95%}	Lower limit ^{95%}
Acute tubular necrosis	0.799	0.039	0.0001	0.721	0.876
Cold ischemia time (hours)	0.882	0.031	0.0001	0.821	0.942
Time to effective diuresis (days)	0.860	0.036	0.0001	0.789	0.930
Serum creatinine levels at biopsy	0.719	0.046	0.0001	0.629	0.809

^{95%} Confidence Interval.
doi:10.1371/journal.pone.0007138.t003

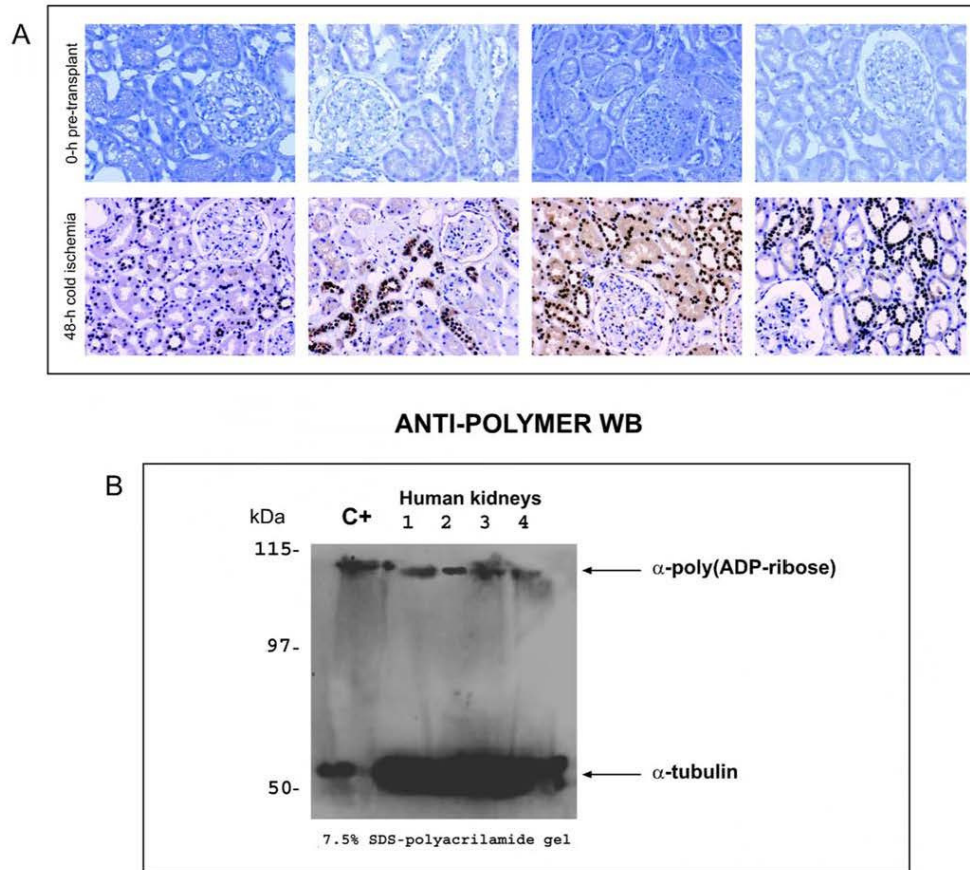


Figure 3. Immunohistochemistry and Western-blot PARP-1 expression in kidneys ruled out for transplantation. **A)** Representative kidneys ruled out for transplantation but preserved as whole perfused kidneys, immunohistochemistry method revealed a marked increase in PARP-1 nuclear expression between the biopsy at 0 h and the renal cortex after 48 h of cold ischemia in Wisconsin preserved solution. **B)** Western-blot analysis to detect PARP-1 activation in human kidneys after 48 h cold ischemia (lines 1 to 4). C+ is a pool of Poly-ADP-ribosylated-PARP proteins used as positive control for Western-blot.
doi:10.1371/journal.pone.0007138.g003

C57BL/6 *Parp1*^{+/+}, which was more evident at 48 h (Figure 4A). After 6 h of reperfusion, 3-ABA-treated *Parp1*^{+/+} mice showed decreased PARP-1 expression and reduced polymer activity (Figure 4B), and no PARP-1 protein was detected by western-blot in *Parp1*^{-/-} knockout mice (Figure 4A); renal injury appeared to be reduced in these two groups (data not shown).

Discussion

Increased PARP-1 expression was observed in nuclei of human renal tubular cells after a variable period of cold ischemia and in the same nuclei of patients who developed ATN. PARP-1 expression was inversely correlated with the time to recovery of renal function. PARP-1 induction in tubular cells was previously

found in different experimental models of ischemic renal injury [19–22], and our group recently demonstrated PARP-1 expression in tubules of aged donors [17]. However, the present study of a large series of kidney transplant patients supports a close relationship between delayed renal function and tubular nuclear PARP-1 expression. According to our results, PARP-1 protein up-regulation may be a possible and previously unconsidered pathway for delayed graft function (DGF) [23,24].

A prolonged cold ischemia time is a strong risk factor for DGF, graft loss [4,6], and long-term changes after kidney transplantation [25]. Donor kidneys inevitably undergo a period of cold ischemia. In our series, the periods of cold ischemia ranged from one to thirty-six hours, with significantly longer times for non-ECDs biopsied for suspicion of ATN (see Table 1). A gradual increase in

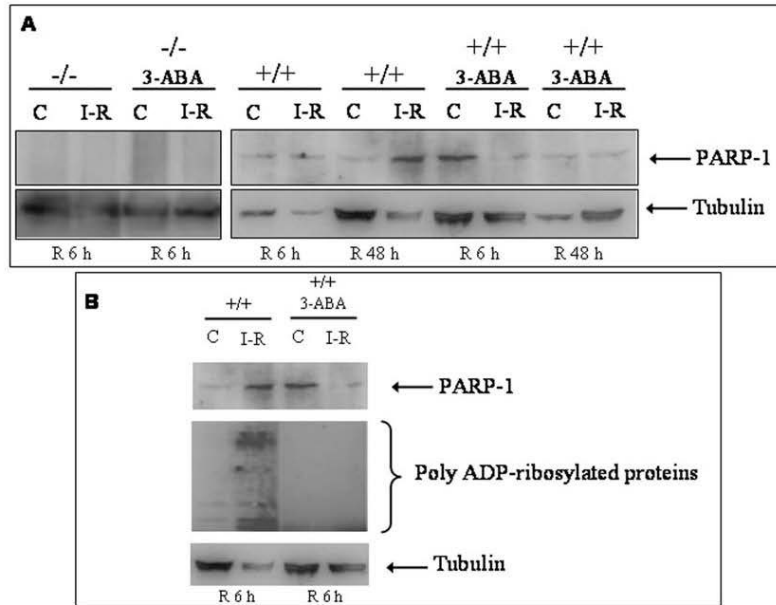


Figure 4. Western-blot analysis of PARP-1 expression in kidney of C57BL/6 mice. **A)** Presence of PARP-1 expression in kidney of C57BL/6 *Parp1*^{+/+} mice absence of PARP-1 in knockout mice; and evident increase in PARP-1 expression at 48 h of reperfusion. Note partial inhibition of PARP-1 after inoculation with 3-ABA at 6 h of reperfusion. **B)** Induction of protein poly(ADP-ribosylation) after renal IR and its total inhibition by PARP-1 with 3-ABA. *+/+*: C57BL/6 wild-type mouse; *-/-*: C57BL/6 *Parp1* knockout mouse; 3-ABA: 3-aminobenzamide; C: Control; IR: Ischemia-Reperfusion; R: Reperfusion. doi:10.1371/journal.pone.0007138.g004

DGF was significantly correlated with longer cold ischemia time (r coefficient: 0.666, $p = 0.01$, Pearson test). DGF varied according to cold ischemia time and donor age. It has been reported that ECD transplant performed with a short cold ischemia time (0–8 h) has a DGF rate equivalent to a non-ECD transplant performed with a 20-h cold ischemia time [7].

The present study revealed a significant difference in the intensity of PARP-1 immunohistochemical expression in renal tubular cells between kidneys from transplant protocol biopsies with stable renal function or ECDs without ATN and those from non-ECD transplant patients with ATN or from ECDs with ATN (see Table 1). Results also suggested that a decreased tubular expression of PARP-1 was related to an earlier recovery of renal function. In addition, transplanted kidneys in patients with serum creatinine levels that did not fall below 1.7 mg/dL showed double the intensity of PARP-1 expression. DGF after kidney transplantation may be due to various factors [25], such as the condition of the transplanted kidney and the compliance of the vascular system in the renal graft or recipient. Nevertheless, these findings indicate that the degree of PARP-1 activation may be related to the extent of human renal tubular injury and to renal function, suggesting a role for this enzyme in the pathogenic mechanism of ATN due to IR. In a previous study of patients with ATN, our group found that the kidneys tolerating a long period of cold ischemia had the highest levels of PARP-1 (cold ischemia <24 h, PARP-1 = $1.71 + 0.62$ vs. cold ischemia ≥ 24 h, PARP-1 = $2.86 + 0.35$). In fact, the lowest PARP-1 expression level (1–9% of tubular nuclei positive) was only

observed in kidneys with less than 20 h of cold ischemia (mean, 16.36 h; range, 12–20 h) [26].

The functional capacity of renal tubular cells significantly contributes to an adequate renal function. Hence, measures taken to ameliorate the condition of these cells may also improve the outcome of kidney transplantation [27]. Although the chronic inhibition of PARP activity is likely to be harmful to the cell, it has been proposed that its transient inhibition after IR injury may prevent cell death [15].

Identification of a specific histological biomarker for the early diagnosis of tubular injury in renal biopsies is a current research challenge. Zhang et al. [28] recently used immunohistochemistry to characterize the expression of kidney injury molecule-1 (KIM-1) in renal transplant biopsies, finding a significant correlation between renal functional indices and KIM-1 staining intensity. They suggested that evaluation of KIM-1 staining may serve to optimize the diagnosis of tubular injury in allograft biopsies, similar to our proposal for PARP-1.

In summary, these results suggest a pivotal role for PARP-1 in the ATN of renal transplantation. We propose the immunohistochemical assessment of PARP-1 in kidney allograft biopsies as a risk marker for early detection of a possible delayed renal function.

Acknowledgments

We would especially like to acknowledge the contribution of Maria Dolores Rodriguez, Francisca Sáez and Jorge A. Payá technicians at the Department of Pathology and IBIMER.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FJO PHC FJO RGDM. Performed the experiments: DMO. Analyzed the data: FJO RGDM MdCB MGM DA JAF AO FJO. Contributed reagents/materials/analysis

tools: FJO RGDM MdCB MGM DA JAF AO FM DS FJO RGDM. Wrote the paper: FJO. Made the murine Parp-1 knockout model of IR injury: PHC. Critical revision of manuscript for important intellectual content, and obtained funding: RGDM.

References

- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV (1996) Acute renal failure. *N Engl J Med* 334: 1448–1460.
- Lieberthal W, Levine JS (1996) Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477–F488.
- Salahudeen AK (2004) Consequences of cold ischemic injury of kidneys in clinical transplantation. *J Invest Med* 52: 296–298.
- Salahudeen AK, Haider N, May W (2004) Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney Int* 65: 713–718.
- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL (1997) Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63: 968–974.
- Shoskes DA, Cecka JM (1988) Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 66: 1697–1701.
- Johnston TD, Thacker LR, Jeon H, Lucas BA, Ranjan D (2004) Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. *Clin Transplant* 18(Suppl 12): 28–32.
- Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E (1996) Acute failure of the transplanted kidney pathophysiology, diagnosis and prevention. *Ann Transplant* 1: 5–9.
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML (1996) Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 83: 162–170.
- Paller MS (1994) The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Invest Med* 42: 632–639.
- de Murcia G, Menissier de Murcia J (1994) Poly[ADP-ribose] polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19: 172–176.
- Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, et al. (1986) Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly[ADP-ribose] polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4908–4912.
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Khungland A (1995) Post-translational modification of poly[ADP-ribose] polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20: 405–411.
- Skaper SD (2003) Poly[ADP-Ribose] polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation: a strategy for neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 993: 217–28.
- Thiemermann C, Bowers J, Myint FF, Vane JR (1997) Inhibition of the activity of poly[ADP-ribose] synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 679–683.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of poly[ADP-ribose] synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687–689.
- O'Valle F, Benitez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, et al. (2004) Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly[ADP-ribose] polymerase (PARP-1). *Transplant Proc* 36: 733–735.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, et al. (1997) Requirement of poly[ADP-ribose] polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7303–7307.
- Chatterjee PK, Zacharowski K, Cuzzocrea S, Otto M, Thiernemann G (2000) Inhibitors of poly[ADP-ribose] synthetase reduce renal ischemia-reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo. *FASEB J* 14: 641–651.
- Martin DR, Lewington AJ, Hammerman MR, Padanilam BJ (2000) Inhibition of poly[ADP-ribose] polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1834–R1840.
- Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ (2005) Poly[ADP-ribose] polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F387–F398.
- Mangino JM, Ametani M, Szabó C, Southard LH (2004) Poly[ADP-ribose] polymerase and renal hypothermic preservation injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F838–F847.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G (2004) Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364(9447): 1814–1827.
- Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, et al. (2006) Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med* 354: 343–352.
- Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H (2004) Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 66: 523–527.
- O'Valle F, Benitez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, et al. (2005) Role of Poly[ADP-Ribose] Polymerase in Transplant Acute Tubular Necrosis and Its Relationship With Delayed Renal Function. *Transplant Proc* 37: 1421–1423.
- Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG (1986) Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 77: 1312–1320.
- Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, Blasick TM, Potdar S, et al. (2008) Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int* 73: 608–614.



Research Article

PARP Inhibition Attenuates Histopathological Lesion in Ischemia/Reperfusion Renal Mouse Model after Cold Prolonged Ischemia

Raimundo M. G. del Moral,¹ Mercedes Gómez-Morales,¹ Pedro Hernández-Cortés,² David Aguilar,³ Trinidad Caballero,³ Jose Aneiros-Fernández,¹ Mercedes Caba-Molina,¹ M Dolores Rodríguez-Martínez,³ Andreina Peralta,⁴ Pablo Galindo-Moreno,^{5,6} Antonio Osuna,⁷ F. Javier Oliver,⁴ Raimundo G. del Moral,¹ and Francisco O'Valle³

¹ Provincial UGC Intercentre, Department of ICU, Granada, Spain

² Department of Traumatology and Orthopedic Surgery, IBIMER, "San Cecilio" Clinical Hospital and University of Granada, Spain

³ Department of Pathology and IBIMER, School of Medicine, University of Granada, Spain

⁴ Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain

⁵ Oral Surgery and Implant Dentistry Department, School of Dentistry, University of Granada, Spain

⁶ Department of Periodontics and Oral Medicine School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

⁷ Department of Nephrology, "Virgen de las Nieves" University Hospital, Granada, Spain

Correspondence should be addressed to Francisco O'Valle; fovalle@ugr.es

Received 19 August 2013; Accepted 18 September 2013

Academic Editors: N. Futrakul and J. Luño

Copyright © 2013 Raimundo M. G. del Moral et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We test the hypothesis that PARP inhibition can decrease acute tubular necrosis (ATN) and other renal lesions related to prolonged cold ischemia/reperfusion (IR) in kidneys preserved at 4°C in University of Wisconsin (UW) solution. *Material and Methods.* We used 30 male Parp1^{+/+} wild-type and 15 male Parp1^{0/0} knockout C57BL/6 mice. Fifteen of these wild-type mice were pretreated with 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) at a concentration of 15 mg/kg body weight, used as PARP inhibitor. Subgroups of mice were established (A: IR 45 min/6 h; B: IR + 48 h in UW solution; and C: IR + 48 h in UW solution plus DPQ). We processed samples for morphological, immunohistochemical, ultrastructural, and western-blotting studies. *Results.* Prolonged cold ischemia time in UW solution increased PARP-1 expression and kidney injury. Preconditioning with PARP inhibitor DPQ plus DPQ supplementation in UW solution decreased PARP-1 nuclear expression in renal tubules and renal damage. Parp1^{0/0} knockout mice were more resistant to IR-induced renal lesion. In conclusion, PARP inhibition attenuates ATN and other IR-related renal lesions in mouse kidneys under prolonged cold storage in UW solution. If confirmed, these data suggest that pharmacological manipulation of PARP activity may have salutary effects in cold-stored organs at transplantation.

1. Introduction

Until now, renal ischemia-reperfusion (IR) injury has been inevitable in transplantation, resulting in the cell death of renal tubular epithelial cells. Human kidneys retrieved from cadaver donors for transplantation are perfused and preserved in order to attenuate ischemic injury between the harvesting of the organ and its transplantation. Currently, the most effective preservation strategy to reduce ischemic

injury during prolonged cold storage is to decrease renal oxygen demand by using both hypothermia and preservation solutions (University of Wisconsin (UW) solution) together. These solutions contain adenosine and impermeable saccharides to prevent ATP precursor depletion and cell swelling, respectively. However, this strategy is not sufficiently effective to prevent preservation injury of the tissue [1, 2].

Acute tubular necrosis (ATN) induced by IR injury contributes to the development of delayed graft function (DGF), which remains an important complication of kidney transplantation and, despite advances in cold storage, is a major risk factor for acute rejection and long-term kidney allograft dysfunction [3]. Organ preservation solutions play an important role in the prevention of DGF, especially in organs from expanded criteria donors or exposed to prolonged cold ischemia. [4].

The nuclear protein poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a 116 kDa protein member of PARP enzyme family comprised of three functional domains. The amino-terminal DNA-binding domain contains two zinc fingers that are important for the binding of PARP-1 to single-strand breaks and double-strand breaks [5, 6] and, especially, for the detection of DNA breaks by genotoxic and oxygen-derived free radicals. A third zinc finger is important for coupling damage-induced changes in the DNA-binding domain to alterations in PARP-1 catalytic activity [7–9]. PARP-1, known to play a role as DNA damage sensor and in different DNA repair pathways, was recently implicated in a wide variety of cellular functions, including the regulation of transcription [10]. IR injury produces excessive PARP-1 activation (see review of Virág and Szabó, 2002) [11], leading to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and ATP depletion, which produce various types of DNA damage [12, 13] that potentially contribute to a type of metabolic cell death designated parthanatos [14]. In a previous study of human biopsies, we demonstrated that PARP-1 expression was significantly related to cold ischemia time, time to effective diuresis, serum creatinine levels, and degree of ATN [15].

The objective of the present study in mice was to test the hypothesis that PARP inhibition can reduce ATN and other renal lesions associated with prolonged cold IR in kidneys preserved in UW solution, thereby improving the structural preservation of renal grafts.

2. Material and Methods

2.1. IR Mouse Model. We used 30 male Parp1^{+/+} wild-type (groups 1 and 2) and 15 male Parp1^{0/0} knockout (group 3) C57BL/6 mice (24 wks old and 20–30 g). Knockout mice were obtained according to a previously reported procedure [16].

We kept the mice under stable conditions with *ad libitum* access to food and water. All experiments were performed in a homologated laboratory according to the European Union and Spanish Government guidelines for the ethical care of animals (EU Directive 86/609, RD 223/1988).

Mice were anesthetized by intraperitoneal inoculation of equitensin (2 IU/20 g) and maintained at 37°C on a thermal plate. The left kidney was accessed by anterolateral abdominal horizontal incision of 1.5 cm, and the vascular pedicle was clamped under surgical stereo microscope with a model 2A S&T metallic clip (S&T Microlab AG, Rheinfal, Switzerland), maintaining the kidneys within the abdominal cavity under UW solution flow at 4°C. After 45 min of clamping, the clip was removed and the peritoneum and skin were sutured. After 6 h of reperfusion, the animals were killed with an

overdose of sodium pentothal and perfused with cold UW solution by intracardiac injection. Three animals died during postoperative or reperfusion periods and were replaced.

2.2. Administration of PARP Inhibitor to Mice. The PARP inhibitor 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl) butoxy]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) was purchased from Alexis Biochemicals Corporation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 15 mg/kg body weight. DPQ was administered intraperitoneally at 24 h before ischemic injury (as preconditioning) in group 1. Preliminary control experiments had shown that administration of DPQ to sham-operated mice had no morphological effects (data not shown).

2.3. Renal Samples and Processing. Three subgroups ($n = 5$ each) of left kidneys from C57BL/6 Parp1^{+/+} and C57BL/6 Parp1^{0/0} mice were established (A: IR 45 min/6 h immediately followed by euthanasia; B: IR 45 min/6 h then followed by 48 h immersion at 4°C in UW solution; and C: IR 45 min/6 h then followed by 48 h immersion at 4°C in UW solution plus DPQ (15 mg/mL)). The right kidneys served as controls (Parp1^{+/+} $n = 30$; Parp1^{0/0} $n = 15$). Postextraction, each kidney sample was divided transversally into two halves. One half, with cortex and medulla, was rapidly frozen in isopentane at -50°C and immersed in liquid nitrogen for 10 s to develop western blotting. The other half was immediately fixed in 10% buffered formalin for 24 h and then paraffin-embedded for morphological study using hematoxylin-eosin and PAS staining, which was done in blinded fashion on 4-micrometer sections with light microscopy. The presence of acute necrosis, sloughing, and vacuolization of tubular cells was calculated semiquantitatively on a 4-point scale (0, absence; 1, mild (<10% of tubules involved); 2, moderate (10 to 25%); 3, severe (>25%)). The other variables (vascular lesion, glomerular lesion, altered/lost brush border, and tubular cast) were dichotomous (presence/absence).

2.4. Immunohistochemical Analysis. Nuclear expression of PARP-1 was characterized by incubating sections for 30 min at room temperature with PARP-1 monoclonal antibody (clone A6.4.12; Thermo Fisher, Fremont, CA, USA). The immunocytochemistry study used an automatic immunostainer (model autostainer480, Thermo Fisher) according to the polymer peroxidase-based method, followed by development with diaminobenzidine (Master Diagnóstica, Granada, Spain). The positivity of immunostaining was calculated semiquantitatively on a 4-point scale (0, absence; 1 (1–9% of tubular nuclei positive); 2 (10–49%); 3 (≥50%)). In addition, a millimeter scale in the eyepiece of a BH2 microscope (Olympus Optical Company Ltd, Tokyo, Japan) with ×40 objective was used to count positive nuclei of cortical tubular cells/mm². Results were expressed as positive cells/mm². Renal sections incubated with isotype antibody were used as negative controls.

TABLE 1: Morphological and immunohistochemical comparison between control and IR C57BL/6 kidney mice samples.

	DPQ treated control group PARP-1 ^{+/+}	DPQ treated IR (group 1)	P values MW	Control group PARP-1 ^{+/+}	IR (group 2)	P values MW	Control group PARP-1 ^{0/0}	IR (group 3)	P values MW
PARP-1 (mm ²)	548.64 ± 303.19	320.42 ± 475.34	0.026	784.57 ± 353.95	1124.70 ± 550.93	0.050	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1
ATN	0.0 ± 0.0	0.93 ± 1.22	0.126	0.0 ± 0.0	1.20 ± 1.42	0.029	0.20 ± 0.41	0.80 ± 1.15	0.250
Sloughing tubular cells	0.60 ± 0.51	0.73 ± 0.458	0.539	0.0 ± 0.0	0.87 ± 0.35	0.000	0.07 ± 0.26	0.80 ± 0.68	0.004
Tubular vacuolization	0.40 ± 0.51	0.64 ± 0.16	0.740	0.27 ± 0.59	1.13 ± 0.52	0.000	0.27 ± 0.46	0.53 ± 0.52	0.217
Brush border loss	0.07 ± 0.26	0.13 ± 0.35	0.775	0.0 ± 0.0	0.47 ± 0.52	0.029	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1
Tubular casts	0.20 ± 0.41	0.27 ± 0.46	0.775	0.0 ± 0.0	0.73 ± 0.60	0.001	0.13 ± 0.35	0.40 ± 0.51	0.217

MW: Mann-Whitney U-test, DPQ: 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1-(2H)-isoquinolinone, IR: ischemia/reperfusion.

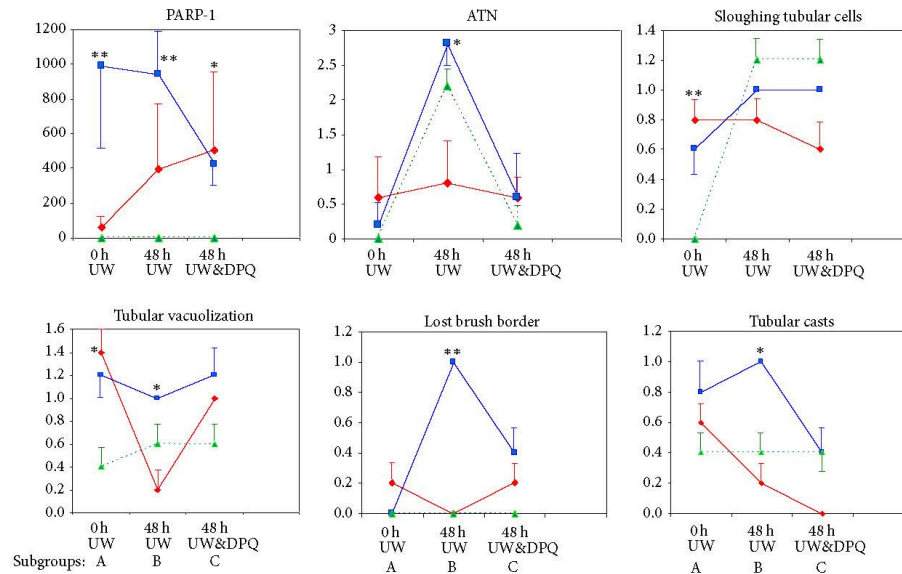


FIGURE 1: Comparison of PARP-1 expression and kidney lesions between C57BL/6 mouse subgroups (A, B, and C). Red line: Parp1^{+/-} and DPQ (i.p.), group 1. Blue line: Parp1^{+/+} wild-type, group 2. Green line: Parp1^{0/0}, group 3. ATN: acute tubular necrosis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Kruskal Wallis test.

2.5. Western Blotting. Western blotting was performed according to previously published methods [17]. Tissues extracted from the mice kidneys were washed with PBS and resuspended in 100 μ L lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β -mercaptoethanol) for 30 min on ice. Pellet was eliminated and sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 6% β -mercaptoethanol, 3% SDS, 0.003% bromophenol blue) was added to the supernatant. Proteins were resolved on SDS-12% polyacrylamide gels and transferred onto Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad, Laboratories Irvine, CA). The blot was blocked with 5% milk powder in PBS with 0.1% Tween-20 for 30 min, washed with PBS/Tween, and incubated overnight with anti-poly (ADPribose) (PAR) (TREVIGEN, Gaithersburg, MD), anti-PARP-1 (clone C2-10) (Alexis, San Diego, CA, USA), and anti- α -tubulin (Sigma, St Louis MO, USA) antibodies for 2 h with appropriate secondary antibodies. Bands were visualized by ECL-PLUS (Amersham Biosciences, Piscataways, NJ), and photographs were taken with the ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad).

2.6. Electron Microscopy. Several 1 mm² fragments of kidney cortex from each animal were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution and then postfixed in 1% OsO₄ at 4°C for 2 h, washed in distilled water, dehydrated in increasing concentrations of acetone, and embedded in Epon following a conventional protocol. Semithin sections were stained with toluidine blue

solution. Ten blocks of LC cluster areas were sampled. Ultrathin (~70 nm-thick) sections were obtained in a Reichert Jung ULTRACUT ultramicrotome (Leica, Westlar, Germany) and stained with lead citrate and uranyl acetate. Ultrathin sections were examined under a Zeiss EM 902 transmission electron microscope and processed using analysis software for Windows (Soft Imaging System, Münstes, Germany).

2.7. Statistical Analysis. A descriptive analysis was performed, and the Mann-Whitney *U*-test and Kruskal Wallis test were applied to determine statistical significances. SPSS- Windows 20.0 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used for data analyses. The confidence interval was 95% ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Histopathological Kidney Lesions. Control kidney tissue sections had a normal morphology, with no evident structural changes in tubules, vessels, or glomeruli (Table 1). IR-exposed kidneys showed distinctive patterns of ischemia renal injury that varied in severity among the groups (Figure 1), including widespread degeneration of tubular architecture, alteration/loss of brush border, sloughing of tubular epithelial cells from basement membrane, scant tubular vacuolization, tubular cell necrosis, and intratubular cast formation in the outer medulla (including proximal tubule S3 segment and thick ascending limb). Ultrastructurally, we observed moderate vacuolization of proximal convoluted

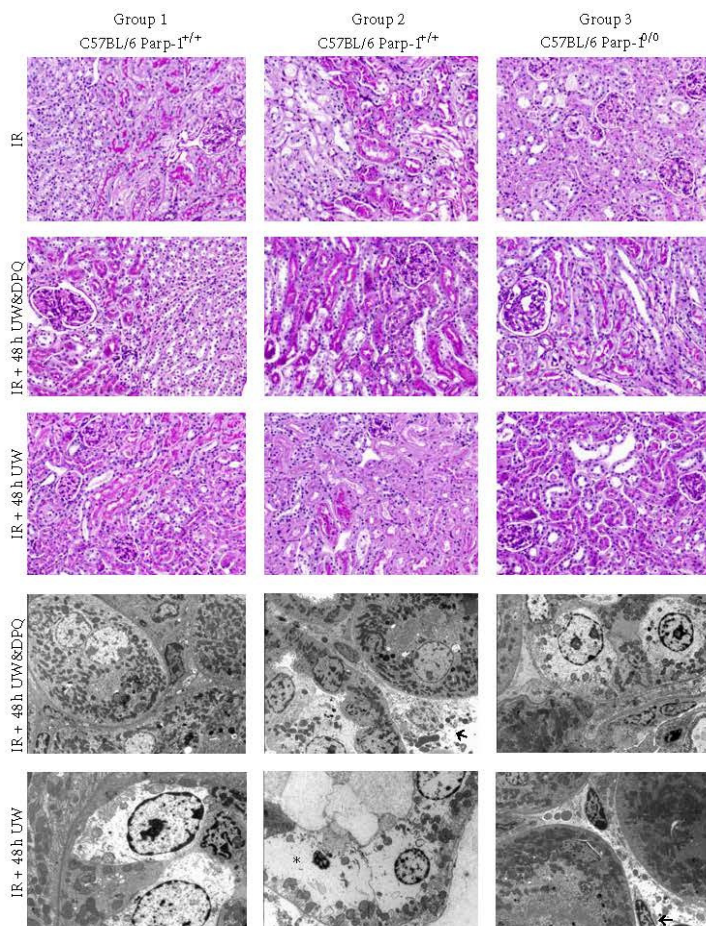


FIGURE 2: Morphological kidney injury after ischemia/reperfusion (IR) in different groups and subgroups of C56BL/6 mice. (PAS, original magnification 20x). Note loss of brush border and increased acute tubular necrosis in Parp1^{+/+} mouse kidney (IR + 48 h UW subgroup) but only tubular vacuolization in Parp1^{+/+} mouse kidney (IR + 48 h UW&DPQ subgroup). Kidney structure was preserved in all subgroups of Parp1^{0/0} and in Parp1^{+/+} wild-type mice pretreated with ip DPQ. Ultrastructural study confirms higher tubular injury in kidneys immersed for 48 h at 4°C in University of Wisconsin (UW) solution (asterisk). Arrows indicate endothelial cell injury in peritubular capillaries (original magnification ×4600).

tubular cells with cytoplasmic edema and intense injury to endothelial cells in renal peritubular capillaries (Figure 2). Table 1 summarizes the results of comparing histopathological variables among the groups (3 groups of IR kidneys and controls).

3.2. Prolonged Cold Ischemia Time in UW Solution Increases PARP-1 Expression and Kidney Injury. ATN, sloughing of tubular cells, alteration/loss of brush border, and tubular casts

were significantly more evident in kidneys immersed for 48 h in WU (Figures 1 and 2). These lesions were related to higher PARP-1 expression by immunohistochemistry (Figure 3) and to higher PARP expression and greater kidney protein ribosylation by western blotting (Figure 4).

3.3. Preconditioning with PARP Inhibitor DPQ Plus DPQ Supplementation in UW Solution Reduces PARP-1 Nuclear Expression in Renal Tubules. Treatment with i.p. DPQ at 24 h

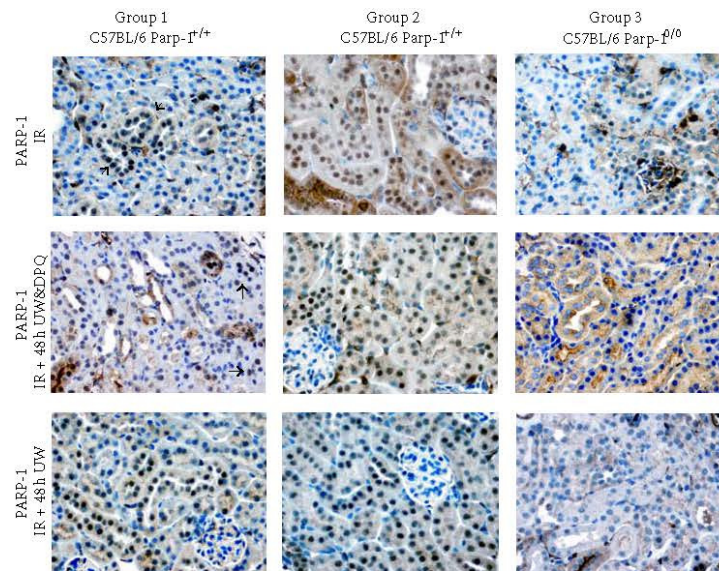


FIGURE 3: Modification in mouse kidney tubular PARP-1 expression. Kidneys immersed for 48 h at 4°C in UW induces nuclear PARP-1 tubular overexpression, while the DPQ-treated subgroup shows decreased PARP-1 expression (polymer peroxidase-based method, original magnification 20x).

before IR significantly reduced tubular PARP-1 expression, tubular injury (ATN and vacuolization), and the number of animals affected. Kidneys from DPQ-treated animals preserved in UW solution plus DPQ evidenced a greater reduction in PARP-1 expression and tubular injury, finding no significant differences with their respective controls (Table 1 and Figure 1). A reduction in protein ribosylation was also detected by western blotting (Figure 4). The presence of DPQ in UW solution alone (without DPQ pretreatment) also produced a significant decrease in PARP-1 expression and tubular lesions (Figure 3).

3.4. *Parp1*^{0/0} Knockout Mice are More Resistant to IR-Induced Renal Lesion. The absence of PARP-1 significantly reduced IR-induced tubular lesions, finding scant histopathological alterations and no significant differences with the changes observed in control kidneys (Table 1).

4. Discussion

The main finding of this study was that the administration of PARP inhibitor DPQ to kidneys and its addition to the UW solution in which they are cold-stored attenuated ATN and other IR-related lesions. These results, if confirmed, would indicate that the pharmacological manipulation of PARP activity may exert salutary effects in clinical settings in which reperfusion injury is problematic, as in cold-stored organs at transplantation.

After cellular exposure to genotoxic agents in IR injury, the genome integrity of PARP is maintained, but extensive DNA damage may lead to excessive PARP activation, which consumes large quantities of cellular NAD, producing ATP depletion and cell death [18]. Therefore, although chronic inhibition of PARP activity is likely to be harmful to cells, it has been proposed that its transient inhibition after IR injury may prevent cell death [19].

Tissue ischemia and reperfusion result in activation of the nuclear enzyme PARP. This enzyme is activated 500-fold by single-strand DNA breaks and cleaves NAD⁺ to attach ADP-ribose polymers to proteins associated with the damaged DNA [20, 21]. Hypoxia due to decreased blood flow leads to a breakdown in cellular energy metabolism and can generate reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species [18, 19, 22]. However, our finding of increased PARP-1 expression and activation of protein poly(ADP-ribose)ation during cold storage without reperfusion implies that PARP is also activated by other agents besides ROS during the time interval between organ harvesting and transplantation. In a previous immunohistochemistry study by our group, all 20 kidneys were ruled out for transplantation but preserved as whole perfused kidneys that showed a marked increase in PARP-1 expression between the biopsy at 0 h and the renal cortex after 48 h of cold ischemia in UW solution, when a mild activation of PARP-1 was evidenced by western blotting results [15].

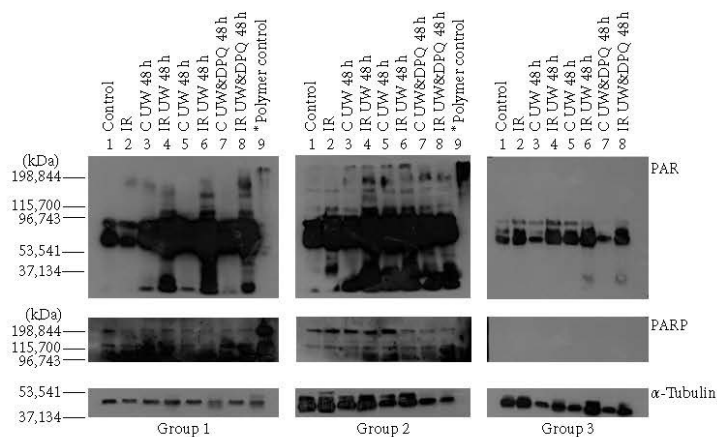


FIGURE 4: Protein ribosylation was increased in IR kidneys immersed for 48 h at 4°C in UW without DPQ PARP-1 inhibitor; this increase was smaller in subgroups without pretreatment (line 8, group 2) and smallest in IR kidneys immersed for 48 h at 4°C in UW with DPQ supplementation (line 8, group 1).

Numerous studies have demonstrated a significant role for PARP in reperfusion injury in a variety of tissues, organs, and models. Early investigations demonstrated that chemically distinct inhibitors of PARP activity such as benzamides and isoquinolinones can reduce the degree of injury associated with IR of different organs [22–28], providing the basis for potential clinical applications of PARP inhibitors [29]. Furthermore, the degree of tissue injury caused by IR is attenuated in Parp knockout mice [30].

Isoquinolinones such as DPQ, 1,5-DHIQ [1,5-dihydroxyisoquinoline (5-hydroxyisoquinolin-1(2H)-one)], PJ-34 (phenanthridinone-based PARP inhibitor), INO-1001 (indeno isoquinolinone), and FR247304 are potent PARP inhibitors [30] but are only soluble in solvents such as dimethylsulfoxide (DMSO), which is itself a potent scavenger of hydroxyl radicals and inhibits PARP activity [31]. This explains why DMSO *per se* can reduce IR-related kidney injury [32, 33] without, at the low concentration used, inducing morphological changes.

The lesions observed in this murine IR model correspond to incipient ATN alterations. Their relationship with Parp overactivation is evidenced by the few renal parenchymatous lesions in PARP-1^{0/0} mice and by the reduction in lesions and increase in protein poly(ADP-ribosylation) after DPQ administration in *parp1*^{+/+} wild-type mice. Chatterjee previously reported that PARP activation contributes in part to postreperfusion renal dysfunction and damage to renal tissue with previous ischemia, based on the following experimental evidence: (1) an increased immunohistochemical expression of PARP after renal IR, (2) a significant improvement in renal alterations (reduced urea and creatinine levels and increased glomerular filtrate) with the use of benzamide analogs, selective PARP inhibitors, (3) the lack of effect on IR-induced renal dysfunction of aminobenzoic and nicotinic

acids, which do not inhibit PARP [34], and (4) protection by PARP inhibitors of primary cultures of rat proximal kidney tubules against lesion and oxidative stress-mediated cell death [35]. Further research is warranted to confirm our finding of a reduction in renal lesions when DPG is used for preconditioning and also added to the UW solution, which may represent a new strategy to avoid damage during the cold storage of renal grafts.

Acknowledgment

Funding: This research was supported by CTS no.138 Research Group and from the Carlos III Health Institute of the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs (Red de Investigación Renal, REDinREN 012/0021/0025). “FEDER una manera de hacer Europa”. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] M. J. Mangino, M. Ametani, C. Szabó, and J. H. Southard, “Poly(ADP-ribose) polymerase and renal hypothermic preservation injury,” *American Journal of Physiology—Renal Physiology*, vol. 286, no. 5, pp. F838–F847, 2004.
- [2] C. Y. Lee and M. J. Mangino, “Preservation methods for kidney and liver,” *Organogenesis*, vol. 5, no. 3, pp. 105–112, 2009.
- [3] H. Boom, M. J. K. Mallat, J. W. de Fijter, A. H. Zwinderman, and L. C. Paul, “Delayed graft function influences renal function, but not survival,” *Kidney International*, vol. 58, no. 2, pp. 859–866, 2000.
- [4] K. R. Regner, V. Nilakantan, R. P. Ryan et al., “Protective effect of lifor solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury,” *Journal of Surgical Research*, vol. 164, no. 2, pp. e291–e297, 2010.

- [5] G. Gradwohl, J. Menissier de Murcia, M. Molinete et al., "The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 8, pp. 2990–2994, 1990.
- [6] P. O. Hassa and M. O. Hottiger, "The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases," *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 8, pp. 3046–3082, 2008.
- [7] M.-F. Langelier, K. M. Servent, E. E. Rogers, and J. M. Pascal, "A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 7, pp. 4105–4114, 2008.
- [8] Z. Tao, P. Gao, D. W. Hoffman, and H.-W. Liu, "Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif," *Biochemistry*, vol. 47, no. 21, pp. 5804–5813, 2008.
- [9] M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, and G. G. Poirier, "PARP inhibition: PARP1 and beyond," *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, no. 4, pp. 293–301, 2010.
- [10] V. Schreiber, F. Dantzer, J.-C. Amé, and G. de Murcia, "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 7, pp. 517–528, 2006.
- [11] L. Virág and C. Szabó, "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors," *Pharmacological Reviews*, vol. 54, no. 3, pp. 375–429, 2002.
- [12] S. J. Berger, D. C. Sudar, and N. A. Berger, "Metabolic consequences of DNA damage: DNA damage induces alterations in glucose metabolism by activation of poly(ADP-ribose) polymerase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 134, no. 1, pp. 227–232, 1986.
- [13] D. A. Carson, C. J. Carrera, D. B. Wasson, and H. Yamanaka, "Programmed cell death and adenine deoxynucleotide metabolism in human lymphocytes," *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 27, pp. 395–404, 1988.
- [14] K. K. David, S. A. Andrabi, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, "Parthanatos, a messenger of death," *Frontiers in Bioscience*, vol. 14, no. 3, pp. 1116–1128, 2009.
- [15] F. O'Valle, R. G. M. del Moral, M. del Carmén Benítez et al., "Poly[ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, Article ID e7138, 2009.
- [16] J. Ménessier de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco et al., "Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 14, pp. 7303–7307, 1997.
- [17] R. Quiles-Perez, J. A. Muñoz-Gámez, A. Ruiz-Extremera et al., "Inhibition of poly adenosine diphosphate-ribose polymerase decreases hepatocellular carcinoma growth by modulation of tumor-related gene expression," *Hepatology*, vol. 51, no. 1, pp. 255–266, 2010.
- [18] K. Devalaraja-Narashimha and B. J. Padanilam, "PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, no. 1, pp. 95–103, 2009.
- [19] N. Ueda, G. P. Kaushal, and S. V. Shah, "Recent advances in understanding mechanisms of renal tubular injury," *Advances in Renal Replacement Therapy*, vol. 4, no. 2, pp. 17–24, 1997.
- [20] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier, "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions," *Biochemical Journal*, vol. 342, no. 2, pp. 249–268, 1999.
- [21] C. Thiernemann, J. Bowes, F. P. Myint, and J. R. Vane, "Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 2, pp. 679–683, 1997.
- [22] L. M. Walker, J. L. York, S. Z. Imam, S. F. Ali, K. L. Muldrew, and P. R. Mayeux, "Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia," *Toxicological Sciences*, vol. 63, no. 1, pp. 143–148, 2001.
- [23] K. Plaschke, J. Kopitz, M. A. Weigand, E. Martin, and H. J. Bardenheuer, "The neuroprotective effect of cerebral poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in a rat model of global ischemia," *Neuroscience Letters*, vol. 284, no. 1-2, pp. 109–112, 2000.
- [24] L. Liaudet, A. Szabó, F. G. Soriano, B. Zingarelli, C. Szabó, and A. L. Salzman, "Poly(ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia," *Shock*, vol. 14, no. 2, pp. 134–141, 2000.
- [25] M. J. L. Eliasson, K. Sampei, A. S. Mandir et al., "Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia," *Nature Medicine*, vol. 3, no. 10, pp. 1089–1095, 1997.
- [26] B. Zingarelli, A. L. Salzman, and C. Szabó, "Genetic disruption of poly(ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury," *Circulation Research*, vol. 83, no. 1, pp. 85–94, 1998.
- [27] S. Shall and G. de Murcia, "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?" *Mutation Research*, vol. 460, no. 1, pp. 1–15, 2000.
- [28] I. L. Grupp, T. M. Jackson, P. Hake, G. Grupp, and C. Szabó, "Protection against hypoxia-reoxygenation in the absence of poly(ADP-ribose) synthetase in isolated working hearts," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 31, no. 1, pp. 297–303, 1999.
- [29] L. Tentori, I. Portarena, and G. Graziani, "Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors," *Pharmacological Research*, vol. 45, no. 2, pp. 73–85, 2002.
- [30] P. K. Chatterjee, B. E. Chatterjee, H. Pedersen et al., "5-Aminoquinolinone reduces renal injury and dysfunction caused by experimental ischemia/reperfusion," *Kidney International*, vol. 65, no. 2, pp. 499–509, 2004.
- [31] M. Banasik and K. Ueda, "Dual inhibitory effects of dimethyl sulfoxide on poly(ADP-ribose) synthetase," *Journal of Enzyme Inhibition*, vol. 14, no. 3, pp. 239–250, 1999.
- [32] G. M. Wray, C. J. Hinds, and C. Thiernemann, "Effects of inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase activity on hypotension and multiple organ dysfunction caused by endotoxin," *Shock*, vol. 10, no. 1, pp. 13–19, 1998.
- [33] M. C. McDonald, H. M. Filipe, and C. Thiernemann, "Effects of inhibitors of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock," *British Journal of Pharmacology*, vol. 128, no. 6, pp. 1339–1345, 1999.
- [34] P. K. Chatterjee, K. Zacharowski, S. Cuzzocrea, M. Otto, and C. Thiernemann, "Inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase reduce renal ischemia-reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo," *FASEB Journal*, vol. 14, no. 5, pp. 641–651, 2000.

- [35] P. K. Chatterje, S. Cuzzocrea, and C. Thiernemann, "Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress," *Kidney International*, vol. 56, no. 3, pp. 973-984, 1999.

2.8. PRINCIPALES RESULTADOS Y ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS MISMOS

En el presente trabajo de tesis Doctoral hemos relacionado la expresión de PARP con el desarrollo de NTA en biopsias renales de donante y lesión por isquemia-reperfusión en diversos modelos experimentales.

En nuestro modelo experimental la lesión renal por isquemia produce cambios evidentes a nivel histológico incluyendo degeneración generalizada de la arquitectura tubular, alteración y pérdida del borde en cepillo, descamación de células epiteliales tubulares de la membrana basal, vacuolización, necrosis de las células tubulares, y la formación cilindros intratubulares. Ultraestructuralmente, se observó vacuolización moderada de las células tubulares del túbulo contorneado proximal con edema citoplasmático y lesión intensa en las células endoteliales de los capilares peritubulares. Estos cambios son más acusados en los riñones sometidos a isquemia fría prolongada en los que la expresión de PARP1 a nivel inmunohistoquímico y de Western-Blotting fue mayor. La administración de DPQ mostró lesiones tubulares y expresión de PARP similar a sus controles. Los animales *Parp1 knockout* presentaron menores lesiones comparadas con el grupo control.

La expresión de PARP1 se relaciona de forma directamente proporcional con la aparición y el grado de NTA determinado por biopsia. En la escala semicuantitativa de valoración de la expresión de PARP1, una puntuación de 0, sólo pudo encontrarse en las biopsias sin evidencia de NTA. Tanto las biopsias preimplante en donantes ECD, como las biopsias en receptores de donantes SCD mostraron un mayor nivel de expresión de PARP1 en las biopsias con evidencia de NTA (PUBLICACIÓN D, figura 2.1).

Figura 2.1. Análisis comparativo de la expresión de PARP1 en controles y pacientes con NTA en pacientes ECD y donantes SCD.

Table 1. Comparative data among control kidneys (from expanded-criteria donors [ECD] and patients with stable renal function), preimplant kidneys from ECDs, and transplanted kidneys from patients with ATN.

Variable	ECD without ATN (n=65)	ECD with ATN (n=95)	P values Bonferroni test	Non-ECD without ATN (n=68) [†]	Non-ECD with ATN (n=98)	P values Bonferroni test
Age of donor (years)*	58.4±11.9	63.63±7.01	NS	38.70±15.5	38.20±6.33	NS
PARP-1 Score [0–3]*	1.05±0.54	1.66±0.32	P=0.0001	0.34±0.59	2.33±0.85	P=0.0001

El grado de NTA se relacionó con la expresión de PARP1 (coeficiente de correlación de Pearson 0.810, $p=0.0001$). Existe una diferencia significativa ($p=0.0001$ mediante el test de ANOVA) en la expresión de PARP1 entre los grupos de biopsia con ausencia de NTA (0.33 ± 0.56), NTA leve (1.53 ± 0.96) y NTA intensa (2.83 ± 0.48).

Las biopsias de donante ECD que presentan NTA leve presentan menor expresión de PARP1 (1.69 ± 0.91), frente al grupo de biopsia de receptores SCD con evidencia de NTA intensa (2.33 ± 0.85). Este grupo de pacientes presentan una suma de las lesiones por isquemia-reperfusión del donante, del tiempo de isquemia fría y tras la perfusión. Este resultado se apoya en nuestro modelo de lesión renal por isquemia-reperfusión en el que los animales de experimentación con inhibición genética o farmacológica de la expresión de PARP1 presentaron menor expresión de PARP1 determinada por Western-Blotting. Otros tipos de lesión renal como la nefropatía crónica del injerto, el rechazo subclínico y el rechazo agudo humoral y tubulointerstitial no se relacionan con la expresión de PARP en el modelo multivariado (PUBLICACIÓN C).

En nuestra experiencia la expresión de PARP1 se relaciona con otros factores como el tiempo de isquemia fría y condiciona la evolución posterior del injerto renal.

El tiempo de isquemia fría se relaciona fuertemente con la expresión de PARP1 (coeficiente de correlación de Spearman 0.806; $p=0.0001$). Para determinar la relación entre el tiempo de isquemia fría y la expresión de PARP1 conservamos los injertos de desechados durante 48 horas. Los injertos presentaron una activación leve de PARP1 tras 48 horas, lo que evidencia que la preservación a 4°C no inhibe totalmente la actividad de la PARP1 en las células renales durante el periodo de isquemia fría (PUBLICACIÓN D).

Los injertos con mayores niveles de expresión de PARP1 presentaron retraso en la función primaria, es decir, mayor tiempo hasta la instauración de diuresis eficaz y mayores cifras de creatinina al mes, a los 6 meses y al año (PUBLICACION D, figura 2.2).

Figura 2.2. Análisis de las variables clínicas de evolución del receptor según ausencia o expresión de PARP1.

Table 2. Clinical variables according to nuclear immunohistochemical expression of PARP-1 in human kidney biopsies.

Variables	PARP-1 negative	PARP-1 positive	P Values*
Age of donor (years)	49.06±17.1	45.95±14.6	NS
Cold ischemia time (hours)	18.34±5.37	22.12±4.74	P = 0.0001
Time to efficient diuresis (days)	1.65±1.97	10.35±6.75	P = 0.0001
Creatinine at one month (mg/dL)	1.93±2.71	2.71±1.31	P = 0.0001
Creatinine at six months (mg/dL)	1.70±0.76	2.43±1.07	P = 0.0001
Creatinine at twelve months (mg/dL)	1.49±0.78	2.18±1.04	P = 0.0001
Creatinine <1.7 (mg/dL) (days)	5.10±13.55	13.15±18.11	P = 0.0024

Values are expressed as mean ± standard deviation; NS: Non-significant.
*Student's t- test.

doi:10.1371/journal.pone.0007138.t002

La relación entre la PARP1 y la evolución del injerto renal ya había sido puesta de manifiesto por nuestro grupo (PUBLICACIONES A Y B). En nuestra cohorte de 48 injertos renales (PUBLICACIÓN A) la expresión de PARP1 se distribuyó de la siguiente forma (tabla 2.1):

Tabla 2.1. Distribución de la expresión de PARP1 en la cohorte de pacientes mayores de 40 años.

Ausencia de expresión (0)	38.4%
Leve (1 puntos)	5.5%
Moderada (2 puntos)	17.8%
Intensa (3 puntos)	17.8%
Muy intensa (4 puntos)	20.5%

La expresión de PARP1 se relacionó con el tiempo hasta la diuresis eficaz ($r=0.38$, $p=0.01$ mediante test de Spearman) y con la creatinina postrasplante (Fig 1

2.3, PUBLICACIÓN A).

Figura 2.3. Relación entre la creatina sérica tras el trasplante y la expresión de PARP1.

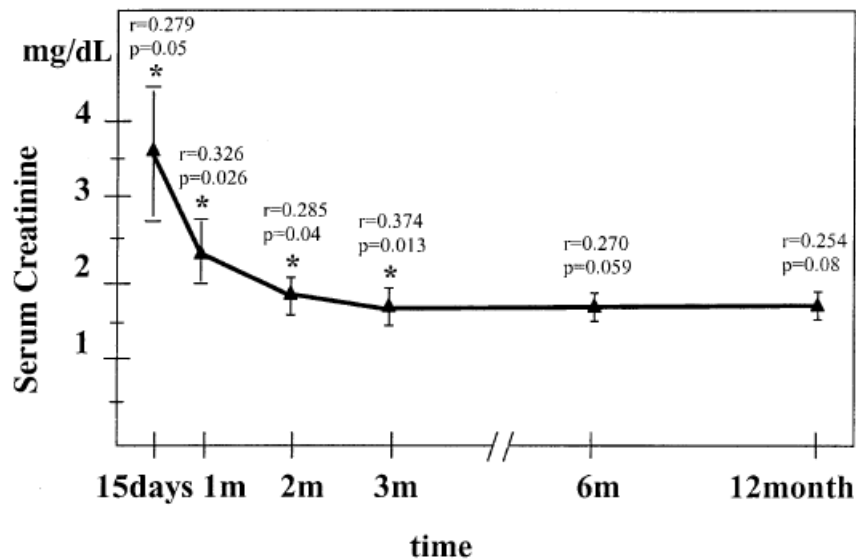


Fig 1. Relationship between immunohistochemical PARP-1 expression and serum creatinine level in following of kidney allograft. *Statistically significant correlation (Spearman test) between PARP-1 expression and serum creatinine level.

Los pacientes con ausencia de expresión de PARP1 presentan una recuperación de la funcionalidad renal más precoz definida como tiempo hasta lavado de creatinina por debajo de 1.7 mg/dL en biopsias obtenidas de receptores con criterios de función retardada del injerto (creatinina<1.7, PARP1 1.7 ± 0.58 vs creatinina>1.7, PARP1 2.40 ± 1.05 ; $p<0.001$ Test U Mann-Whitney). (PUBLICACIÓN B)

Estos resultados muestran a la PARP1 como un mediador de la lesión renal por isquemia reperfusión y tiene un papel determinante tanto en el desarrollo de NTA y FRI La expresión intensa de PARP1 en la biopsia preimplante puede identificar al grupo con mayor riesgo de desarrollo de FRI.

2.9. CONCLUSIONES DEL COMPENDIO DE TRABAJOS.

La PARP1 está implicada en la lesión renal por isquemia-reperfusión y tiene un papel determinante en el desarrollo de NTA y FRI, así como en la como en la eventual recuperación de la función en el período inmediato postrasplante.

La determinación de PARP1 en las biopsias renales puede identificar a los pacientes de alto riesgo de desarrollo de función retardada del injerto.

La administración de inhibidores de la expresión de PARP1 aparece como una opción terapéutica para reducir la lesión por isquemia-reperfusión y mejorar la función renal postrasplante.

2.10 ENUMERACIÓN DE LOS PROBLEMAS NO RESUELTOS EN ESTOS TRABAJOS

En nuestra labor experimental previa hemos puesto de manifiesto la relación de la PARP1 con el tiempo de isquemia fría. También hemos vinculado a la PARP1 con la evolución posterior del receptor, con el desarrollo de NTA, mayor incidencia de función retardada del injerto, demora del tiempo de diuresis eficaz y mayores niveles de creatinina plasmática al alta y a los tres meses. Otras características del donante como la creatinina a la extracción pueden tener un papel determinante en el desarrollo de NTA en el receptor. También hemos desarrollado un modelo de isquemia renal mediante clampaje del pedículo renal izquierdo durante 45 minutos.

Estos resultados nos presentan a la PARP1 como un marcador de lesión renal por isquemia-reperfusión y su posible papel en la evolución posterior del injerto renal. En nuestras publicaciones hemos utilizado estudios de casos y controles con una población heterogénea y una cohorte de 48 donantes renales con biopsia.

Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en la valoración de la biopsia renal preimplante y ha colaborado en conferencias de consenso y grupos de trabajo en este sentido. La experiencia clínica a nivel nacional e internacional acumulada en donantes con criterios expandidos es importante. Hasta este momento en el que consideramos que tenemos un grupo representativo de pacientes con un periodo de seguimiento adecuado, no hemos analizado nuestros resultados de supervivencia y evolución renal postrasplante. Así mismo pretendemos diseñar un modelo de validez renal con criterios clínicos que nos permita optimizar la selección de donantes en la cohorte de donantes ECD.

Con estos dos objetivos se diseña la segunda parte de esta Tesis Doctoral. Planteamos un estudio de cohortes a partir de todos los donantes ECD con biopsia preimplante en los que hemos medido la expresión de PARP1 para detectar características del donante y de su estancia en UCI que puedan influir sobre la expresión de la misma, así como su influencia de la expresión de PARP1 en la evolución de los receptores.

2.11. ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL TEMA

1. Yamazaki K, Tanaka S, Sakata R, Miwa S, Oriyanhan W, Takaba K, Minakata K, Marui A, Ikeda T, Toyokuni S, Komeda M, Ueda K. Protective effect of cardioplegia with poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vitro study of isolated rat heart model. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013 Feb;28(1):143-7. doi: 10.3109/14756366.2011.642373.

Sinopsis: Modelo experimental murino en el que la conservación del corazón durante un periodo de 90 minutos de cardioplejia mejoró la recuperación funcional con menor pico enzimático.

2. Kim J, Long KE, Tang K, Padanilam BJ. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2012 Jul;82(2):193-203. doi: 10.1038/ki.2012.64. Epub 2012 Mar 21.

Sinopsis: Modelo experimental con células tubulares proximales obtenidas de ratones con y sin posibilidad de expresión de PARP1 genética o farmacológica. La toxicidad por cisplatino fue inferior en la células con expresión disminuida de PARP.

3. Van der Vliet JA, Warié MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18: 174-8.

Sinopsis: Excelente revisión de las consecuencias, fisiopatología y influencia de los métodos de preservación de la isquemia fría en trasplante renal.

4. Barba J, Zudaire JJ, Robles JE, Rossel D, Berlan JM, Pascual I.

Complications of kidney transplantation with grafts from expanded criteria donors. *World J Urol.* Jan 31 (epub ahead of print). DOI 10.1007/s00345-012-0831-3.

Sinopsis: Reciente estudio retrospectivo que pone de manifiesto el aumento de complicaciones en los receptores de injertos procedentes de donantes con criterios expandidos.

5. Rosado MM, Bennici E, Novelli F, Pioli C. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP1 and its siblings. *Immunology.* 2013 Aug;139(4):428-37. doi: 10.1111/imm.12099.

Sinopsis: La ADP-ribosilación proteica mediada por la familia de la PARP está implicada en múltiples procesos biológicos. Los inhibidores de la PARP se presentan como nuevos fármacos para el tratamiento de procesos inflamatorios y cáncer. En este artículo se revisan las funciones biológicas de la PARP1.

2.12. APÉNDICE 1: Factor de impacto, citas acumuladas y áreas temáticas de las revistas

1. O'Valle F, Benitez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, del Moral RM, Martín-Oliva D, Oliver FJ, del Moral RG. Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly (ADP-ribose) polymerase. *Transplant Proc.* 2004 Apr;36(3):733-5. PubMed PMID: 15110646.

Área temática: Trasplante de órganos

Factor de Impacto: 0,952

Citas acumuladas: 4

2. O'Valle F, Benítez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, Del Moral RM, Martín-Oliva D, Oliver FJ, Del Moral RG. Role of poly-(ADP-ribose) polymerase in transplant acute tubular necrosis and its relationship with delayed renal function. *Transplant Proc.* 2005 Apr;37(3):1421-3. PubMed PMID: 15866623.

Área temática: Trasplante de órganos

Factor de Impacto: 0,952

Citas acumuladas: 5

3. O'Valle F, Gómez-Morales M, Del Moral RM, Serón D, Moreso F, Osuna A, Oliver FJ, Del Moral RG. Poly(ADP-ribose) polymerase expression in kidney transplantation: from alfa (alpha) to Omega (Omega). *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2099-101. PubMed PMID: 17889105.

Área temática: Trasplante de órganos

Factor de Impacto: 0,952

Citas acumuladas: 3

4. O'Valle F, Del Moral RG, Benítez Mdel C, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, Aguilar D, Aneiros-Fernández J, Hernández-Cortés P, Osuna A, Moreso F, Serón D, Oliver FJ, Del Moral RG. Poly[ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation.

PLoS One. 2009 Sep 28;4(9):e7138. doi: 10.1371/journal.pone.0007138. PubMed PMID: 19784367; PubMed Central PMCID:PMC2745752.

Área temática: Ciencias Multidisciplinarias

Factor de Impacto: 3,730

Citas acumuladas: 4

5. Raimundo M. G. del Moral, Mercedes Gómez Morales, Pedro Hernández-Cortés, José Aneiros-Fernández, Mercedes Caba-Molina, M^a Dolores Rodríguez-Martínez, Andreina Peralta, Pablo Galindo, Antonio Osuna, F. Javier Oliver, Raimundo G. del Moral, Francisco O'Valle. PARP inhibition attenuates histopathological lesion in ischemia/reperfusion renal mouse model after cold prolonged ischemia. En prensa en The Scientific World Journal.

Área temática: Ciencias Multidisciplinarias

Factor de Impacto: 1,730

Citas acumuladas: 0

3. TESIS DOCTORAL-SEGUNDA PARTE:

ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS
VARIABLES QUE CONDICIONAN LA SUPERVIVENCIA DEL RIÑÓN
DE DONANTE EN EL TRASPLANTE RENAL: PAPEL DE LA POLI
[ADP-RIBOSA] POLIMERASA 1 (PARP1)

3.1 INTRODUCCIÓN

Desde el primer injerto renal en 1954,³¹ el trasplante renal ha pasado de ser una intervención limitada y experimental a ser una técnica rutinaria en más de 80 países permitiendo que los pacientes con insuficiencia renal terminal aumenten sus posibilidades de supervivencia y mejoren su calidad de vida.^{32,33,34,35} Los avances en terapia inmunosupresora, preservación de los órganos y selección de los receptores han optimizado la supervivencia del injerto que se sitúa entre el 80 y 90% el primer año, y entre el 50 y 70% a los 5 años.

Además del beneficio en términos de morbimortalidad, el trasplante renal es la forma más coste-eficiente de tratar la insuficiencia renal terminal³⁶ con un ahorro estimado de 300 millones de dólares anuales.³⁷

Durante los últimos 5 años la lista de espera de trasplante renal ha ido ascendiendo ligeramente. A día 1 de enero de 2011, 4434 personas se encontraban en lista de espera para recibir un trasplante renal. Durante el año 2010 se han realizado 2225 trasplantes, existiendo un importante desequilibrio entre los órganos disponibles y los pacientes en lista de espera. Si bien, el número total de donantes ha aumentado en los últimos 10 años, la tasa de donación se ha mantenido estable entre 30 y 35 donantes por millón de población debido al aumento simultáneo de la población en España.³⁸

En este contexto la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) trabaja en un plan estratégico (Plan 40)³⁹ cuya finalidad es aumentar la tasa de donación con iniciativas como la donación en asistolia, trasplante renal de vivo y utilización de órganos procedentes de donantes con criterios expandidos.

El 89% de los trasplantes realizados en España son de donante cadáver, con un importante crecimiento del trasplante de vivo en los últimos años y en menor

proporción de donantes a corazón parado (donación en asistolia). El descenso en la mortalidad por accidente de tráfico ha producido un cambio en el perfil del donante de órganos en muerte encefálica. El accidente cerebrovascular (ACV) hemorrágico o isquémico se ha convertido en la causa de muerte más frecuente entre los donantes (65.1%) y solamente el 5.7% de los donantes fallecieron por traumatismo craneoencefálico en el año 2010. Este cambio en la etiología del fallecimiento ha producido un aumento en la edad media de los donantes de órganos que ha pasado de 34.5 años en 1992 a 57.5 años en 2010. El 79% de los donantes tiene más de 45 años y el 46.6% tiene más de 60 años.

Los criterios UNOS (United Network for organ sharing) 2001⁴⁰ consideran al donante renal con criterios expandidos como aquel que presenta edad superior a 60 años o edad comprendida entre 50 y 59 años con al menos 2 de los 3 factores de riesgo: HTA, muerte por enfermedad cerebrovascular o creatinina >1.5 mg/dL. Según estos criterios más del 50% de los donantes que se generan anualmente en España se consideran donantes con criterios expandidos requiriendo realización de biopsia preimplante para valoración de la viabilidad del injerto.

Paralelamente a estos cambios en el proceso de donación, el progresivo envejecimiento de la población y los avances científico-técnicos han facilitado el acceso a la diálisis de pacientes mayores y se han incluido en lista de espera de trasplante renal pacientes mayores de 65 años de edad,⁴¹ que han pasado del 9.6% del total en 1999 al 16.7% en el año 2008.⁴² El trasplante en pacientes mayores de 65 años se asocia con retraso en la función del injerto, mayor porcentaje de rechazo agudo y menor supervivencia a los 1, 5 y 10 años con

respecto a los pacientes jóvenes. No obstante, los resultados son satisfactorios con supervivencias a los dos años del 65% y superior al 50% a los cinco años.⁴³

3.1.1 EVOLUCIÓN DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS CON RIÑONES PROCEDENTES DE DONANTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS

Los riñones extraídos de donantes con criterios expandidos presentan menor masa nefronal debido a la pérdida nefronal ligada a la edad,⁴⁴ por lo que históricamente se han desestimado para trasplante. La presencia de un desequilibrio entre la capacidad nefronal y las necesidades del receptor se asocian con mal pronóstico a medio plazo, aumento del rechazo agudo y de la toxicidad farmacológica. Estos riñones tiene un RR de pérdida del injerto de 1.7 frente a los riñones procedentes de donantes entre 10 y 39 años.⁴⁵ Datos que se ha confirmado con las experiencias en donación de vivo, en las que la edad es el principal determinante de la supervivencia a largo plazo del injerto.⁴⁶

Este riesgo puede ser parcialmente evitado con la realización de biopsia preimplante para descartar los riñones de mala calidad. En el año 2006 Remuzzi compara la supervivencia del injerto en receptores de donantes mayores de 60 años con y sin biopsia preimplante, con receptores de riñones óptimos. La supervivencia del injerto a los 3 años es equiparable para los grupos de riñón óptimo y riñón subóptimo con biopsia, sin embargo en el grupo de riñón subóptimo sin biopsia existe una diferencia de supervivencia del 21% que es estadísticamente significativa.⁴⁷ Los dos factores relacionados con la supervivencia del injerto son la realización de la biopsia y la edad del donante.

Experiencias recientes han confirmado estos resultados, en los que una exquisita selección de donantes mayores de 75 años (criterios de Essen)

proporciona supervivencia del injerto a 1, 3, y 5 años del 73%, 63%, y 53%, con una supervivencia media del injerto de 32 meses.⁴⁸

La principal causa de pérdida del injerto en receptores añosos es la muerte con injerto funcionando que puede estar cercana al 50% frente al 15% en pacientes jóvenes.⁴⁹

Sin embargo, existen limitaciones con respecto al uso de riñones procedentes de donantes con criterios expandidos, que no deben utilizarse en trasplantes donde no ha demostrado un aumento de supervivencia frente al tratamiento conservador.⁵⁰

Estas experiencias son mejores para receptores mayores de 60 años en los que existe un claro beneficio de supervivencia frente a continuar en lista de espera y diálisis.^{51,52,53,54}

Criterios de Essen para donantes renales mayores de 75 años
<p>Criterios absolutos</p> <ol style="list-style-type: none">1. Creatinina < 1.5 mg/dL2. Proteinuria < 30 mg/dL3. Tamaño y aparición macroscópica normales4. No estenosis en la arteria renal
<p>Criterios relativos</p> <ol style="list-style-type: none">1. Glomeruloesclerosis < 25% en biopsia2. Concordancia HLA

3.1.2 BIOPSIA PREIMPLANTE

En la actualidad existe evidencia suficiente para afirmar que la presencia de lesiones renales en la biopsia del donante se relacionan con la aparición de rechazo agudo y peor funcionalidad y supervivencia del injerto.^{55,56,57,58,59}

La toma de biopsia para evaluar la idoneidad de los riñones de donantes con criterios expandidos es una práctica rutinaria en Andalucía. La valoración de la biopsia se dirige a identificar lesiones glomerulares, vasculares y tubulointersticiales que pueden condicionar una peor funcionalidad del injerto. No hay acuerdo sobre la valoración que debe realizarse de la biopsia del donante, aunque la glomeruloesclerosis mayor del 20% se ha relacionado con función retardada del injerto y la pérdida del injerto a largo plazo.^{60,61,62,63}

También la presencia de daño tubulointersticial heredado del donante, como la fibrosis intersticial, la atrofia tubular o la necrosis tubular aguda, tiene un papel destacado y se correlaciona con el desarrollo posterior en el receptor de glomeruloesclerosis y daño crónico intersticial. Estos fenómenos condicionan la funcionalidad y supervivencia del órgano trasplantado, y se han hecho más importantes con el aumento de donantes con criterios expandidos como se ha discutido previamente, de forma que la biopsia preimplante se ha convertido en un elemento irremplazable en el proceso de donación y trasplante renal, junto a los datos clínicos y de laboratorio.

En 2008 se publica en la revista nefrología la Guía para la indicación, obtención, procesamiento y evaluación de biopsias en el trasplante renal⁶⁴ que homogeneiza el proceso de obtención y valoración de la biopsia preimplante en España.

3.1.3 RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE BIOPSIA EN EL DONANTE.

Según las recomendaciones del citado documento se establece una **indicación clara de biopsia** a todos los injertos procedentes de donantes expandidos según los criterios UNOS con el objetivo de evaluar la viabilidad de los órganos y decidir a qué receptores deben ser implantados. Del mismo modo permite establecer una situación de partida para poder valorar posteriormente las lesiones en el injerto.

Se considera una **indicación recomendable** en el donante estándar para poder monitorizar la progresión de las lesiones en el injerto tras el trasplante. Debiendo valorar en cada caso la relación riesgo-beneficio.

3.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA BIOPSIA

La biopsia se puede realizar indistintamente con aguja o cuña y debe realizarse a ambos riñones. La cuña debe ser de un tamaño no inferior a 5x5x5 mm, sin pasar de 1 cm de profundidad para no aumentar el riesgo de hemorragia. Es sumamente importante que las biopsias contengan al menos 25 glomérulos en cada riñón para poder calcular el porcentaje de glomeruloesclerosis. El tamaño mínimo debe ser de 50 glomérulos entre ambos riñones y la muestra con menos glomérulos no debe contener menos de 15. Por otra parte se recomienda que la biopsia incluya al menos dos secciones con lámina elástica interna para poder valorar el daño vascular crónico en el donante.

3.1.5 PROPUESTA ANDALUZA PARA LA VALORACIÓN DE LA BIOPSIA RENAL PREIMPLANTE

No existe un protocolo común de valoración de la biopsia renal preimplante, aunque existe consenso en utilizar los criterios de Banff'97. Tanto en el trabajo de Remuzzi⁶⁵ como en la valoración de la escala de Maryland⁶⁶ la valoración de la biopsias preimplante analiza los cuatro compartimentos renales (vascular, tubular, glomerular y tejido conectivo) y se mostró como una herramienta válida para predecir la supervivencia del órgano trasplantado y calificar a los riñones como válidos o no válidos.

El protocolo andaluz de valoración de la biopsia renal⁶⁷ se realiza sobre biopsias procesadas en parafina con técnica de horno microondas y tinciones de hematoxilina-eosina y PAS, con la valoración de esclerosis glomerular, atrofia tubular, engrosamiento miointimal y fibrosis intersticial. Se considera una muestra adecuada cuando contiene al menos 25 glomérulos y dos arteriolas de pequeño tamaño. Una puntuación ≤ 7 condiciona una histología favorable para trasplante. El protocolo de valoración se detalla en la figura 2.

		VALORACIÓN	PUNTUACIÓN
ADECUACIÓN DE LA MUESTRA	25 o más glomérulos y dos arterias de pequeño calibre	ADECUADA	
	10-24 glomérulos y una arteria de pequeño calibre	MARGINAL	
	Menos de 10 glomérulos y/o ausencia de arterias	INADECUADA	
GLOMÉRULOS ESCLEROSADOS	0-4'99%	Ausencia de lesiones	0
	5-14'99%	Leve glomeruloesclerosis	1
	15-24'99%	Moderada glomeruloesclerosis	2
	>25%	Intensa glomeruloesclerosis	3
HIPERPLASIA MIOINTIMAL	Ausencia de lesiones	Ausencia de lesiones	0
	Oclusión de la luz <25%	Leve Hiperplasia	1
	Oclusión de la luz 25-50%	Moderada Hiperplasia	2
ARTERIOPATÍA HIALINA	Oclusión de la luz >50%	Intensa Hiperplasia	3
	Ausencia de lesiones	Ausencia de lesiones	0
	Presencia de sustancia hialina no afectando a toda la circunferencia en al menos una arteriola	Leve Arteriopatía	1
	Sustancia hialina afectando a toda la circunferencia luminal de al menos una arteriola sin compromiso grave de la luz	Moderada Arteriopatía	2
FIBROSIS INTERSTICIAL	Sustancia hialina afectando a toda la circunferencia luminal de al menos una arteriola con compromiso grave de la luz	Intensa arteriopatía	3
	Menos del 10% de la superficie de la muestra fibrosis intersticial	Ausencia de lesiones	0
	10-25% de la muestra afectada	Leve Fibrosis Intersticial	1
	26-50% de la muestra afectada	Moderada Fibrosis Intersticial	2
ATROFIA TUBULAR	>50% de la muestra afectada	Intensa Fibrosis Intersticial	3
	<5% de túbulos con engrosamiento/desdoblamiento de la Membrana Basal y/o cilindros lumbinales	Ausencia de lesiones	0
	De 5-25% de túbulos	Leve Atrofia Tubular	1
	De 26-50% de túbulos	Moderada Atrofia Tubular	2
PUNTUACIÓN TOTAL	Más del 50% de túbulos	Intensa Atrofia Tubular	3
	HASTA 7 PUNTOS	RINÓN CON HISTOLOGÍA FAVORABLE	
> 7 PUNTOS	RINÓN CON HISTOLOGÍA DESFAVORABLE		

Tabla 3.1. Protocolo Andaluz de Valoración de la biopsia renal preimplante.

3.1.6 MUERTE ENCEFÁLICA Y DAÑO RENAL

Los criterios diagnósticos de muerte encefálica en nuestro país vienen recogidos en el RD 2070 de 30 de diciembre de 1999.⁶⁸ Se define la muerte encefálica como *“el cese irreversible de las funciones encefálicas, esto es, la constatación de coma arreactivo de etiología estructural conocida y carácter irreversible, se reconocerá mediante un examen clínico adecuado tras un período apropiado de observación. Los criterios diagnósticos clínicos, los períodos de observación, así como las pruebas confirmatorias que se requieran según las circunstancias médicas, se ajustarán a los protocolos incluidos en el anexo I del presente Real Decreto”*.

El proceso de muerte encefálica se produce generalmente por hemorragia, isquemia o lesión traumática directa. Estas tres lesiones producen edema y muerte celular,⁶⁹ activación de macrófagos y producción de citocinas⁷⁰ que a nivel macroscópico se evidencian como edema cerebral y vasodilatación arterial. La muerte celular ocurre cuando la presión intracraneal supera a la presión arterial media y la perfusión cerebral se detiene. En esta situación la hipófisis cesa en su función, se suprime su producción hormonal con la aparición de diabetes insípida⁷¹ y se produce activación del sistema nervioso simpático con liberación de catecolaminas, conocida como tormenta catecolaminérgica. Esta respuesta inicial se sigue de una fase hipotensora con aparición de hipoperfusión y elevación de los niveles de lactato,⁷² precisando fluidoterapia y tratamiento con drogas vasoactivas. Esta tormenta catecolaminérgica, junto a la hipoperfusión posterior producen daño endotelial, aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con liberación de citocinas, moléculas de adhesión, complemento y otros péptidos mediadores que pasan a la circulación sistémica a través de una barrera hematoencefálica disfuncional.⁷³ Los niveles de

interleuquina 6 en líquido cefalorraquídeo se ha constatado elevados en hasta 300 veces en lesiones cerebrales severas.⁷⁴ Los niveles de mediadores inflamatorios (TNF, IL-6, IL-10) medidos en una cohorte de donantes en el proceso de enclavamiento y cada 6 horas tras la muerte encefálica se mostraron significativamente elevados y los niveles de IL-6 se relacionaron con la supervivencia de los receptores a los seis meses.⁷⁵ La liberación de mediadores a la circulación sistémica produce un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con lesión pulmonar,⁷⁶ disfunción miocárdica reversible⁷⁷ y lesión renal.⁷⁸ La muerte encefálica debe considerarse pues, como un proceso dinámico que de modo directo afecta a la calidad de los órganos donados a través de múltiples mecanismos.⁷⁹

Todos estos cambios hormonales, en sustancias inmunomoduladores y mediadores químicos inducen una respuesta inflamatoria con aumento de los niveles de citocinas a nivel renal⁸⁰ y aparición de lesión por isquemia-reperfusión.⁸¹ Numerosos estudios en humanos y animales han demostrado activación de genes de respuesta inflamatoria,⁸² activación de proteín-kinasas,⁸³ activación del sistema ligando-receptor de la angiopoetina,⁸⁴ moléculas de adhesión y proteína de shock térmico.⁸⁵

A nivel microscópico todos estos cambios producen vasoconstricción e hipoperfusión renal, cambios inflamatorios como glomerulitis, periglomerulitis, vacuolización, atrofia y necrosis de los túbulos proximal y distal, así como proliferación de la íntima arterial y del endotelio glomerular.

Estos resultados se han hecho patentes en el ámbito clínico con trabajos que demuestran mejor evolución de los trasplantes de vivo frente a los órganos extraídos en muerte encefálica⁸⁶, con un aumento del riesgo de muerte (OR 2.4),

pérdida del injerto (OR 2), peor funcionalidad renal definida como creatinina >1.5 mg/dL⁸⁷, aumento de la supervivencia del injerto renal y niveles superiores de citocinas⁸⁸. Estas diferencias se asociaron inicialmente al mejor nivel de compatibilidad HLA de los donantes de vivo emparentados, pero se mantienen cuando comparamos riñones extraídos de cadáver con trasplante renal de vivo en donantes no emparentados⁸⁹.

Llegados a este punto, tratar la lesión multiorgánica inducida por la muerte encefálica es una propuesta muy atractiva y que va más allá del término clásico de *“mantenimiento del donante”* que se ha sustituido por *“tratamiento del donante”*. Los protocolos iniciales de manejo del donante en muerte encefálica se dirigían inicialmente a combatir la hipotensión, mantenimiento de los electrolitos y agua interna en límites normales. Posteriormente se incorporó el tratamiento hormonal con desmopresina, hormonas tiroideas⁹⁰ y cortisol^{91,92}. En actualidad la investigación se dirige al desarrollo de estrategias inmunomoduladoras en las que los inhibidores de la PARP1 podrían tener un papel destacado para evitar la lesión por isquemia reperusión.

3.1.7 SOPORTE VASOACTIVO (USO DE CATECOLAMINAS) EN EL PACIENTE POTENCIALMENTE DONANTE DE ÓRGANOS

Como hemos comentado en el apartado anterior, la muerte encefálica genera una cascada de mediadores que conduce al desarrollo de un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) que produce vasoplejía y podría inducir lesión en los órganos que pretendemos trasplantar. Para combatir este fenómeno tienen un papel fundamental las drogas vasoactivas (catecolaminas), ya que la resucitación agresiva con fluidos debe hacerse de forma juiciosa y adecuada, evitando el

aumento de mortalidad que puede suponer este tratamiento cuando se realiza sin una optimización previa del volumen intravascular⁹³ y la repercusión que la sobrecarga hídrica puede tener sobre determinados órganos como el pulmón, corazón y riñón.^{94,95} Hasta el 80% de los donantes renales precisan soporte vasoactivo con dopamina y noradrenalina durante el mantenimiento y la cirugía de extracción de los órganos.⁹⁶ Históricamente se han asociado a estos fármacos con disminución del flujo renal por vasoconstricción renal, empeorando o produciendo insuficiencia renal aguda. La circulación regional a nivel renal, esplácnico, cerebral y coronario tiene una dependencia parcial de la presión arterial media debido al mecanismo de autorregulación. Sin embargo cuando la presión arterial media cae por debajo del umbral de autorregulación el flujo orgánico desciende de manera lineal, pudiendo llegar a producir hipoperfusión. Este umbral de hipoperfusión es diferente dependiendo del órgano implicado, a nivel renal la pendiente es especialmente lineal y por ello las consecuencias más ostensibles⁹⁷. Por ello el mantenimiento de la presión arterial es una meta terapéutica en el tratamiento del potencial donante de órganos.

3.1.8 FACTORES UTILIZADOS PARA LA VALORACIÓN DEL DONANTE RENAL CRITERIOS EXPANDIDOS

La valoración de los riñones procedentes de donante en muerte encefálica incluye una detallada historia clínica que permita identificar factores de riesgo para enfermedad renal y una batería analítica que incluye medición de urea y creatinina, estimación del aclaramiento de creatinina y determinación de proteinuria en orina.

a) FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES DEL DONANTE QUE AFECTAN A LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO RENAL

La práctica clínica habitual para seleccionar a un potencial donante incluye la valoración de factores presentes en el donante que pueden predecir la validez de los órganos extraídos. Pero el resultado del trasplante renal depende de la interacción de factores del donante, del injerto, factores del receptor, tiempo quirúrgico y aparición de complicaciones durante la misma, tratamiento inmunosupresor y la aparición de lesión por reperfusión. Con la finalidad de seleccionar a los injertos idóneos dentro del pool de donantes con criterios expandidos se han desarrollado scores predictivos.

A continuación revisaremos la influencia de estos factores y los scores predictivos disponibles en la actualidad.

b) EDAD

Con la edad hay una disminución fisiológica del filtrado glomerular que se estima aproximadamente en 1 mL/Kg/año a partir de los 45 años y que se debe a la glomerulosclerosis y a la disminución del coeficiente de ultrafiltración glomerular.⁹⁸ La edad ha sido un factor determinante para descartar a potenciales donantes en muerte encefálica. Los criterios UNOS definen como donante con criterios expandidos por la edad, a aquellos con edad superior a 60 años. En la actualidad existe evidencia suficiente de la influencia de la edad sobre la funcionalidad del injerto renal en los receptores de todas las edades.^{99,100}

Cuando comparamos la evolución de los receptores de injertos con criterios expandidos, la supervivencia a los 1.3 y 5 años, así como la función retardada del

injerto es peor en el grupo de donantes mayores de 60 años, frente a los de edad comprendida entre 50 y 60 años.¹⁰¹

A pesar de estos resultados la escasez de órganos, la posibilidad de realizar injertos renales en doble y la mejor selección de los donantes con criterios expandidos ha hecho que se practiquen trasplantes con injertos procedentes de donantes de edades avanzadas. En una reciente revisión de la base de datos americana se compararon los riñones procedentes de ECD de edad mayor de 70 años con el grupo de edad inferior.¹⁰² Los donantes del grupo de edad mayor de 70 años presentaban menor incidencia de hipertensión, diabetes y creatinina mayor de 1.5 mg/dL. La supervivencia a las 3 y 5 años es de 62 y 44%. Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia del injerto frente al grupo de edad de 50 a 69 años, aunque esta significación desaparecía al ajustar por la variable muerte con injerto funcionante. La edad mayor de 70 años se asoció de forma estadísticamente significativa con la probabilidad de perder el injerto (HR 1.37 IC 1.19-1.59) y muerte del receptor (HR 1.37 IC 1.15-1.64). Este riesgo es mayor para los receptores menores de 40 años.

c) HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La presencia de HTA en el donante es una de los factores asociados a la supervivencia del injerto renal,¹⁰³ con disminución de la supervivencia del injerto a los 5 años y aumento del riesgo de muerte del receptor con injerto funcionante. El efecto de la HTA se suma a la presencia de cardiopatía isquémica y edad del receptor de mayor de 60 años, de forma que ningún injerto con estas características alcanzó una supervivencia de 5 años.

Además la duración de la HTA tiene influencia sobre la supervivencia del injerto, de forma que los injertos procedentes de donantes con HTA de más de 10 años de evolución tuvieron una supervivencia el 36% inferior a los 3 años.¹⁰⁴

d) PATOLOGÍA ATEROESCLERÓTICA: CARDIOPATÍA ISQUÉMICA Y ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Tanto la cardiopatía isquémica como el fallecimiento por enfermedad cerebrovascular se han asociado a supervivencia inferiores del injerto. El fallecimiento por ictus aumenta en un 120% el riesgo de fallo del trasplante y su efecto es sumatorio a la edad presencia de otros factores de riesgo como la HTA y DM.¹⁰⁵ La presencia de cardiopatía isquémica condiciona una supervivencia del injerto a los 5 años inferior al 50%.¹⁰⁶

e) DIABETES MELLITUS

Aunque la DM es la primera causa de insuficiencia renal terminal, la presencia de diabetes en los donantes renales no se ha asociado de forma significativa con la supervivencia del injerto renal en numerosos estudios.^{107,108,109} No obstante, ha sido una causa frecuente de descarte renal (OR 1.89 $p < 0.001$).¹¹⁰ En el momento actual presencia de diabetes es una contraindicación relativa para la donación renal y los donantes renales con DM pueden aceptados dependiendo de la edad y de la creatina plasmática. La prevalencia de diabetes en los donantes se sitúa en torno al 20% para ECD y el 2% para SCD.¹¹¹ En un reciente análisis de registro americano¹¹² la diabetes del donante aparece como un factor de riesgo discreto para fallo del injerto (HR 1.11 IC al 95% 1.01-1.21) ajustado por edad y otras

características del receptor y donante. Según estos datos 1 de cada 30 trasplantes tiene fallo del injerto debido a la diabetes.

f) ¿QUÉ OCURRE CUANDO SE ASOCIAN VARIOS FACTORES DE RIESGO DEL DONANTE?

La asociación de factores de riesgo en el donante mayor de 60 años condiciona un aumento del riesgo de pérdida del injerto, con un riesgo relativo de 1.8 para un factor de riesgo y 2.7 con la presencia de dos factores de riesgo.¹¹³

g) CONCENTRACIÓN SÉRICA DE CREATININA

La concentración sérica de creatinina es la medida habitualmente utilizada para evaluar la función renal, sin embargo está afectada por distintas fuentes de variabilidad biológica en función de la edad, sexo, etnia, masa muscular y tipo de dieta. Además la relación de la concentración sérica de creatinina y el FG no es lineal, sino hiperbólica, por lo que tiene baja sensibilidad en la detección de enfermedad renal crónica. Se precisan descensos del FG de al menos el 50% para que la creatinina sérica se eleve por encima de los valores de referencia,¹¹⁴ especialmente en ancianos y mujeres debido a su baja masa muscular, por lo que la creatinina sérica es poco adecuada para valorar a donantes con criterios expandidos. Clasificando a 854 pacientes mayores de 65 años como insuficiencia renal crónica no atribuible a la edad en un aclaramiento por Cockcroft-Gault menor de 50 ml/min, el 87% de estos pacientes presentaban un creatinina inferior a 1.7 mg/dL y el 54.5% de los pacientes con aclaramiento inferior a 30 mL/min.¹¹⁵ Si utilizamos como punto de corte una creatinina sérica de 1.4 mg/dL el 47.3% de los pacientes con aclaramiento menor de 50 mL/min presentaban creatinina normal.¹¹⁶

Estos datos evidencian la baja especificidad de la creatinina como estimador de la función renal del injerto.

h) ACLARAMIENTO DE CREATININA

El aclaramiento de creatinina estimado a través de la creatinina plasmática se considera en la actualidad la mejor herramienta para valorar la función renal en sujetos sanos y enfermos,¹¹⁷ como reconoce la sociedad española de nefrología en su documento de consenso publicado en 2006.¹¹⁸ Sin embargo, el aclaramiento de creatinina es difícil de medir, por ello se utilizan modelos para estimarlo a través de las cifras de creatinina plasmática. Según el citado documento de consenso el comportamiento de las ecuaciones es diferente dependiendo del valor de filtrado glomerular.

- Sobrestiman el FG para valores inferiores a 15 mL/min.
- Presentan mayor exactitud para valores comprendidos entre 15 y 60 mL/min.
- En caso de población sana con $FG > 90$ mL/min el comportamiento es variable dependiendo de la población y el método de medición de la creatinina.
- Para cualquier valor de FG MDRD es más precisa

Estos métodos han demostrado una alta variabilidad para la valoración de donantes añosos de vivo¹¹⁹ que pueden oscilar de -11.4 a +9.2 mL/min para la fórmula MDRD de 4 variables y -4 a +16 mL/min para la fórmula de Cockcroft-Gault.¹²⁰

Stratta et al realizan trasplante simple si el aclaramiento estimado es mayor de 65 mL/min/1.73 m², doble entre 40 a 65 mL/min/1.73 y descartan el riñón con

aclaramiento menores de 40 mL/min/1.73 m². Esta política ha obtenido buenos resultados en este centro equiparando la supervivencia del injerto con los procedentes de donantes ECD.

Cockcroft-Gault: $FG \text{ (mL/min)} = (140 - \text{edad}) \times \text{Peso} / 72 \times \text{Creatinina plasma} \times 0.85$
(si mujer).

MDRD-4: $FG \text{ (mL/min/1.73)} = 186 \times (\text{Cr})^{-1.154} \times (\text{Edad})^{-0.203} \times (0.742 \text{ si mujer})$

MDRD-4IDMS: $FG \text{ (mL/min/1.73/m}^2) = 175 \times (\text{Cr})^{-0.1154} \times (\text{edad})^{-0.203} \times (0.742 \text{ si mujer})$

La presencia de un aclaramiento de creatinina menor de 60 mL/min estimado por la fórmula de Cockcroft se asocia con un RR de fallo del injerto de 1.1.¹²¹

En estudios en receptores de donantes ECD, la presencia de un aclaramiento de creatinina inferior a 40 mL/min al año se relaciona con una supervivencia inferior del injerto al año.¹²²

3.1.9 IMPORTANCIA DEL TIEMPO DE ISQUEMIA FRIA EN LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO RENAL.

La extracción, el almacenamiento y el trasplante de un órgano sólido de un donante alteran significativamente la homeostasis del medio interno del órgano. Sus efectos se manifestarán en el receptor pudiendo influenciar la recuperación funcional y el rechazo agudo tras el trasplante. La lesión del órgano ocurre

principalmente como resultado de la isquemia, y las diferentes técnicas de preservación de órganos sirven para minimizar este daño y mejorar la función y la supervivencia del injerto.

El daño de los órganos durante el trasplante ocurre en dos fases. La primera, denominada fase de isquemia caliente, incluye el tiempo que pasa desde la interrupción de la circulación del órgano donado hasta el momento en que es perfundido con la solución hipotérmica de preservación. La segunda fase, llamada fase de isquemia fría, es el período que transcurre desde que el órgano es preservado en un estado hipotérmico hasta su trasplante en el receptor. La conservación hipotérmica de los órganos destinados a trasplantes se basa en la supresión del metabolismo y de las enzimas catabólicas mediante hipotermia a 4 °C, enlenteciendo la actividad enzimática con disminución de los requerimientos de oxígeno. La mayoría de las enzimas en los animales normotérmicos reducen su actividad de 1.5 a 2 veces por cada 10 °C de descenso de la temperatura. Sin embargo, la congelación no ha sido útil para la preservación de órganos porque produce la formación de cristales de hielo que destruyen la célula.¹²³

Los tiempos de isquemia fría se han relacionado históricamente con función retrasada del injerto,^{124,125} rechazo agudo¹²⁶ y peor supervivencia a largo plazo.^{127,128, 129}

En un estudio reciente realizado en Estados Unidos¹³⁰ se han comparado los tiempos de isquemia fría entre los dos riñones de un mismo donante, ajustados en el análisis multivariado para las características del receptor, para establecer la relación entre los tiempos de isquemia fría y la supervivencia del injerto. El tiempo medio de diferencia de isquemia fría fue de 5 horas para los dos riñones. En este estudio se demuestra un aumento de la función retardada del injerto:

-
- OR 1.06 (IC 95% 0.95-1.17) para tiempo de isquemia fría 1-3 horas.
 - OR 1.5 (IC 95% 1.29-1.74) para tiempo de isquemia fría mayores de 15 horas.

No se demostró diferencia en la supervivencia de los tiempos cortos frente a los largos de isquemia tanto para la cohorte de donantes óptimos y subóptimos. Otros autores han identificado tiempos de isquemia fría superiores a 19 horas como predictor de función retrasada del injerto.¹³¹

3.1.10 ¿PODEMOS PREDECIR LA EVOLUCIÓN DE LOS INJERTOS PROCEDENTES DE DONANTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS?: SCORES PREDICTIVOS.

En los últimos años se han desarrollado varios scores con algoritmos que pretenden valorar el riesgo individual de cada injerto y la evolución final del trasplante. No están desarrollados para valorar a priori la validez renal en donantes añosos. Basada en el registro UNOS entre los años 1994-1999. Estas variables encontraron relación con la función renal a los doce meses y la supervivencia del injerto a los 5 años. Los injertos se clasifican en:

- Grado A: 0-9 puntos.
- Grado B: 10-19 puntos.
- Grado C: 20-29 puntos.
- Grado D: 30-39 puntos.

Los riñones de grado C y D, tuvieron un aclaramiento de creatinina menor a los 12 meses y una supervivencia inferior del injerto a los 6 años.

- The donor risk score.¹³²

- Deceased Donor Score.¹³³

	Variable	Puntuación
Edad	<30	0
	30-39	5
	40-49	10
	50-59	15
	60-69	20
	>70	25
HTA	No	0
	Si, duración desconocida	2
	Duración ≤ 5 años	2
	Duración 6-10 años	3
	Duración > 10 años	4
Aclaramiento de Cr por Cockcroft-Gault	>100	0
	75-99	2
	50-74	3
	<50	4
Causa de muerte	No ACV	0
	ACV	3
Incompatibilidad HLA	0	0
	1-2	1
	3-4	2
	5-6	3

Otorga una puntuación entre 0 y 1 a una serie de características del donante. La puntuación final clasifica a los injertos en 5 grados. Los grados superiores

presentaron una supervivencia inferior del injerto a los 5 años y un riesgo superior de pérdida del injerto HR 2.24 y 2.89 para los grados IV y V.

Variable	Niveles	Puntuación
CMV match	D+/R-	0.136
	Otros	0
Raza donante	Afroamericana	0.165
	No afroamericana	0
Edad donante	12-29	0
	29-39	0.138
	40-49	0.268
	50-59	0.422
	60-69	0.676
	>70	0.770
Causa de la muerte	ACV	0.089
	Otros	0
Concordancia HLA-A	0-1	0
	2	0.069
Concordancia HLA-B	0-1	0
	2	0.111
Concordancia HLA- DR	0	0
	1	0.085
	2	0.163
Tiempo de isquemia fría	0-9	0
	10-18	0.108
	19-29	0.152
HTA	NO	0
	SI	0.138
DM	NO	0
	SI	0.156

- The kidney donor risk index.¹³⁴

Desarrollado del registro Americano de trasplantes. Calcula el riesgo relativo de fallo del injerto. Los valores oscilan entre 0.5 y 4.2.

$$\text{KDRI} = \exp\{ 0.0128(\text{edad}-40) + 0.0107(\text{edad}-50 \text{ si } \text{edad}>50) + 0.179 \text{ (si afroamericano)} + 0.126 \text{ (si HTA)} + 0.130 \text{ (si DM)} + 0.220(\text{Cr}-1\text{mg/dL}) - 0.209\Omega(\text{cr} - 1.5\text{mg/dL, si creatinina}>1.5) + 0.0881(\text{s ACV}) - 0.0464(\text{altura}-170/10) - 0.0199(\text{peso}-80/5, \text{ si peso}<80 \text{ kg}) + 0.240(\text{si hepatitis C}) - 0.0766 \text{ (si concordancia HLA B } =0) - 0.0610 \text{ (si concordancia HLA 1)} - 0.130(\text{si concordancia HLA DR 0}) + 0.0765 \text{ (si concordancia HLA DR 2)} + 0.00548 \text{ (TIF-20)}\}.$$

Se han excluido de la fórmula las variables de trasplantes en asistolia, doble trasplante, en bloque y la raza, ya que todos los trasplantes se realizaron en simple, en raza caucásica y de cadáver.

- UK Kidney Donor Index.¹³⁵

Basada en la escala anterior, un análisis del registro inglés entre los años 2000 y 2007, incluyendo a 7620 pacientes desarrolla un modelo predictivo similar. Dentro de los factores del donante la edad, la historia de HTA, uso de adrenalina y estancia en UCI, tuvieron interés predictivo. No se mostraron como factores importantes la creatinina sérica del donante ni el fallecimiento por ACV. Una puntuación de 1 equivale al donante ideal, menor de 40 años, sin antecedentes, estancia en UCI menor de 1 día y sin uso de adrenalina. Una puntuación menor de 1 representa menor riesgo del donante y una puntuación mayor de 1 mayor riesgo. Esta escala tiene la ventaja de que se trata de una escala europea y no utiliza la incompatibilidad HLA como predictor, por lo que puede tener mayor utilidad clínica pre-extracción. Para el cálculo en nuestro estudio se excluyó la adrenalina pues ninguno de los donantes tuvo soporte vasoactivo con este fármaco.

$$\exp\{-0.245(\text{si edad}<40) + 0.396(\text{si edad}>60)+0.0253(\text{peso}-75)/10+0.00461(\text{estancia})+0.0465(\text{adrenalina})\}$$

3.1.11 PAPEL DE LA POLI ADP RIBOSA POLIMERASA-1

La poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP1) es una enzima nuclear que actúa regulando numerosos procesos celulares y se activa en respuesta a daños en el ADN como consecuencia de agente genotóxicos como la radiación ionizante, los agentes alquilantes y/o radicales libres. La activación de la PARP es importante para la reparación celular, pero su sobreexpresión en situaciones patológicas como la lesión por isquemia reperfusión conduce a consumo de NAD y ATP que pueden disminuir hasta niveles inferiores al 20% de los normales en una hora. La poli ADP ribosilación de proteínas es por tanto una modificación covalente transitoria en determinadas proteínas nucleares permitiendo que modifiquen su función biológica ante mecanismos de estrés que requieren una adaptación rápida.¹³⁶

Numerosos modelos animales y estudios piloto en humanos han demostrado el papel de la PARP1 a enzima en el daño por isquemia-reperfusión en shock séptico^{137,138} y hemorrágico,¹³⁹ así como procesos inflamatorios crónicos.¹⁴⁰ Los ratones tratados con inhibidores de la PARP1 mostraron mayor protección frente a procesos inflamatorios y lesión por isquemia reperfusión, debido a un menor estrés oxidativo y una disminución de la transcripción de factores dependientes de la PARP en modelos de traumatismo craneoencefálico,¹⁴¹ isquemia cerebral perinatal,¹⁴² estrés oxidativo inducido por disfunción endotelial¹⁴³ y enterocolitis necrotizante.¹⁴⁴ La conservación en una solución con un inhibidor de la PARP1 de corazones de rata sometidos a lesión por isquemia reperfusión ha puesto de manifiesto una mejor recuperación funcional y menor liberación enzimática,¹⁴⁵

frente al grupo control. Los ratones *knockout* para Parp1 (carentes de la expresión de PARP1) presentan menor sensibilidad renal a la toxicidad por cisplatino, con mejor funcionalidad a los cinco días y menor presencia de necrosis tubular inducida por el estrés oxidativo.¹⁴⁶ La inflamación y fibrosis en riñones de ratas sin actividad PARP1 fue inferior en un modelo de ratones con ligadura ureteral,¹⁴⁷ disminuyendo los cambios histológicos, pero no la apoptosis. Estos datos parecen asociar a la PARP con el daño tubular y necrosis de células renales en la insuficiencia renal aguda.

Estos datos en modelos animales, presentan a la PARP1 como un marcador atractivo para la valoración de los injertos renales que están sometidos a inflamación y lesión por isquemia-reperfusión durante el mantenimiento del donante y la isquemia caliente.

El desarrollo de lesión renal aguda es un proceso complejo que afecta a células tubulares epiteliales, endoteliales e inflamatorias. Las células tubulares epiteliales tienen una alta sensibilidad a la lesión renal y pueden tener un papel mediador en la iniciación y desarrollo de la fibrosis renal.¹⁴⁸ Además la presencia de lesiones tubulares histológicas precede al desarrollo de las mismas a nivel glomerular, lo que hace que el estudio de la PARP1 a nivel tubular pueda resultar muy interesante para valorar la idoneidad de los injertos renales y predecir el desarrollo de nefropatía crónica del injerto.

Nuestro grupo ha demostrado que los niveles de PARP1 se asocian a la presencia de necrosis tubular, rechazo agudo, función retardada del injerto y nefropatía crónica del injerto, comparados con las biopsias de donante usados como grupo control.¹⁴⁹ La expresión de PARP1 en la biopsia preimplante tiene una buena

capacidad de discriminación para identificar la presencia de necrosis tubular aguda y función retardada del injerto.¹⁵⁰

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 TIPO DE ESTUDIO:

El diseño del estudio para identificar los factores que influyen sobre la validez renal y expresión de PARP1 a nivel tubular, intersticial y glomerular se realizó con un estudio cohorte retrospectivo.

El análisis de supervivencia se realizó mediante un estudio de casos y controles anidado en una cohorte.

El análisis de la influencia de la PARP1 en la evolución de los receptores tanto inmediata como a largo plazo se realizó con un estudio de cohorte retrospectivo.

3.2.2 PACIENTES:

Se incluyeron todos los donantes con criterios expandidos a los que se les practicó biopsia preimplante. A partir de las biopsias se revisaron protocolos de donación e historias clínicas de los donantes. Los receptores fueron seguidos según el protocolo habitual de la unidad de trasplante renal. Se excluyeron todos aquellos injertos que se implantaron en otra provincia, los injertos en los que no ha sido posible recoger la historia clínica del donante y aquellos en los que no ha sido posible localizar al receptor.

3.2.3 PERIODO DE ESTUDIO:

Desde el 1 de enero de 1998 hasta el 31 de diciembre de 2010. La fecha de final de seguimiento fue el 25 de octubre de 2011.

3.2.4 ÁMBITO

La coordinación sectorial de Granada-Jaén tiene un área de influencia de 1.593.710 habitantes y realiza en torno a 50 trasplantes renales/anuales de donante cadáver. Incluye a los siguientes centros hospitalarios:

- HU San Cecilio de Granada
- HU Virgen de las Nieves de Granada
- Complejo Hospitalario de Jaén
- Hospital Comarcal San Juan de la Cruz de Úbeda
- Hospital Comarcal San Agustín de Linares
- Hospital Comarcal Santa Ana de Motril
- Hospital General Básico de Baza.

La lista de espera para trasplante renal en esta zona de influencia es única para su población. Se incluyeron a todos los donantes con criterios expandidos (donantes ECD) durante el periodo de estudio. Hasta el año 2004, esta coordinación de trasplantes incluía a la provincia de Huelva, por ello 4 de los injertos incluidos proceden de esta provincia. Del mismo modo 18 de los injertos incluidos en el estudio proceden de otras provincias según la política de optimización de los trasplantes renales de la Coordinación Autonómica de Trasplantes de Andalucía. Para el análisis de supervivencia se seleccionaron al azar 320 receptores de injertos procedentes de donantes estándar, cuyo seguimiento estaba registrado en la base de datos de la consulta de seguimiento de trasplante renal del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

3.2.5 PROTOCOLO DE BIOPSIA:

La coordinación sectorial de Granada-Jaén realiza de forma protocolizada biopsia preimplante a todos los injertos procedentes de donantes que cumplen los criterios UNOS¹⁵¹ de definición de donante con criterios expandidos:

- Edad mayor de 60 años.
- Edad comprendida entre 50 y 59 con 2 de 3 de los factores de riesgo (HTA, muerte por enfermedad cerebrovascular y creatinina >1.5 mg/dL)

La biopsia se realiza mediante cuña renal cumpliendo los requisitos de calidad descritos en la conferencia de consenso de Toledo en 2007 y publicados en la Revista Nefrología en año 2008.¹⁵²

Las biopsias se realizaron tras la cirugía de banco en el hospital de extracción, mediante cuña en el polo renal superior con un tamaño mínimo de 5x5x5 mm. Las biopsias fueron procesadas por el Servicio de Anatomía Patológica del HU San Cecilio de Granada, con método de inclusión acelerada en parafina mediante horno de microondas. Las biopsias fueron valoradas mediante Las tinciones de hematoxilina-eosina y PAS por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Cecilio según el protocolo andaluz de valoración de la biopsia renal preimplante descrito previamente en la introducción de esta Tesis Doctoral. Se consideró riñón apto para trasplante una muestra histológica con puntuación ≤7.

3.2.6 PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO DE LOS RECEPTORES.

El seguimiento del paciente que ha recibido un trasplante renal incluye dos periodos tras el trasplante.

1º.- Periodo Postoperatorio Inmediato:

Comprende el periodo de tiempo desde la cirugía hasta el alta hospitalaria. El objetivo de este periodo es optimizar la función del injerto, con el menor número de complicaciones quirúrgicas, inmunológicas e infecciosas. La duración de este periodo es muy variable dependiendo del tipo de trasplante realizado y la situación clínica, antecedentes y evolución del injerto.

2º Periodo de seguimiento en Consulta Externa de trasplante renal:

Periodo comprendido desde el alta hospitalaria hasta el exitus o pérdida del injerto. El objetivo es maximizar la duración del injerto evitando problemas inmunológicos, quirúrgicos, infecciosos, de riesgo cardiovascular, de alteraciones del metabolismo calcio fósforo, del equilibrio ácido-base, hematológicos y tumorales.

Por regla general el paciente trasplantado no alcanza un filtrado glomerular normal, sigue presentando una insuficiencia renal de un nivel menor, pasando de estadio V en la fase de diálisis a estadio III (lo más frecuente) o estadio II, raramente a estadio I según la clasificación KDIGO.¹⁵³

El seguimiento cronológico se realiza según el siguiente esquema.

Los tres primeros meses, dos visitas semanales, generalmente lunes y jueves. Una visita quincenal del 3^{er} al 6^o mes. Una visita mensual desde el 6^o al 9^o mes. Una vez cada 1.5 meses del 9^o al 12^o mes. A partir del año se va espaciando cada 3 meses/6 meses, según evolución clínica y distancia al hospital de referencia.

En cada visita se realiza una exploración clínica y toma medidas antropométricas y una serie de exploraciones complementarias variables dependiendo de la revisión que corresponda que incluye determinaciones de hematología y bioquímica completa, niveles de inmunosupresores, analítica de orina incluyendo microalbuminuria, determinación del metabolismo fosfocálcico, homocisteína, cistatina C, gasometría, marcadores tumorales, etc. También se pueden realizar exploraciones complementarias como ecografía/TAC abdominal o exploraciones radiológicas.

3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se ha realizado con la colaboración de la Fundación para la investigación Biomédica de Andalucía Oriental (FIBAO).

a) METODOLOGÍA DE RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS

Se diseñó una Base de Datos (BdD) protegida con clave y dotada de diferentes mecanismos lógicos que impidan la introducción de datos erróneos. A esta base de datos sólo ha tenido acceso el autor de esta tesis doctoral y en ella quedan reflejados los nombre de donantes y receptores. Para el análisis estadístico se ha diseñado una segunda BdD y con diferente clave de acceso de la que se han excluido los datos identificativos de los pacientes (proceso de anonimización), en esta última BdD se ha permitido el acceso a los investigadores colaboradores. Todos los investigadores se comprometen a respetar la confidencialidad de los datos de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre la Protección de datos de Carácter Personal y la ley 41/2002 de 14 de noviembre, ley

básica reguladora de la autonomía del paciente y derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

b) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizarán diferentes paquetes estadísticos, fundamentalmente el IBM-SPSS V.21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), el R y el R-Commander 2.6.2 de libre distribución "Paquete R-UCA (con rutinas creadas para este estudio). Se aplicó el Test de Shapiro-Wilk o bien el test Omnibus de D'Agostino-Pearson para comprobar si las variables cuantitativas (edad, talla, glucosa, urea, creatinina, etc.) analizadas siguen una distribución normal y se efectuó transformación logarítmica en aquellas que no lo seguían.

Estadística descriptiva: Se describió el perfil de la población del estudio. Los resultados de las variables cualitativas fueron expresados en porcentajes y las variables cuantitativas expresadas como medias, desviación típica, incluyendo los intervalos de confianza (IC95%) y el rango (valor mínimo y máximo). Se obtuvo también la distribución de la población para cada uno de los parámetros hematológicos y bioquímicos analizados así como los valores correspondientes a los percentiles P5, P25, P50, P75 y P95. **Análisis Bivariante:** Se utilizó el test de Chi-cuadrado para comparar proporciones entre grupos y cuando éste no cumplió las condiciones de validez se aplicó el test exacto de Fisher. Para analizar las diferencias entre los valores medios de las variables cuantitativas entre dos grupos, se aplicó el test de la "t" de Student, previo análisis de igualdad de varianza mediante la Prueba de Levene o su equivalente no paramétrico Prueba U de Mann-Whitney. La asociación entre variables continuas se analizó mediante el

coeficiente de correlación de Pearson o el no paramétrico de Spearman dependiendo de la normalidad de las variables.

c) Análisis multivariado:

El análisis multivariado se realizó mediante un modelo de regresión lineal múltiple y regresión logística ordinal introduciendo en el mismo las variables independientes con un grado de significación inferior de 0.20. Se comprobó las condiciones mediante análisis de residuales, de la heterocedasticidad y linealidad e identificación de la multicolinealidad mediante VIF. La fuerza de la asociación se descubrió mediante la OR.

d) Análisis de Supervivencia:

El análisis de supervivencia fue estimado usando el método de Kaplan-Meier, la significación estadística entre los tiempos de supervivencia se determinó con el test de Log-Rank que compara la supervivencia en los dos grupos de estudio. El análisis Multivariado de Supervivencia se realizó mediante la evaluación de los riesgos proporcionales de Cox para identificar las variables que influyen en la supervivencia global. El nivel de significación estadística para esta tesis doctoral fue de $P < 0.05$.

3.2.8 DEFINICIONES:

1. Función retardada del injerto (FRI): **aparición de al menos una de las siguientes afecciones:**

- Oliguria persistente: producción media de orina < 0.5 cc/Kg/hora de 18 a 24 horas después del TRR.

-
- Reducción de la Cr a las 24 horas después del TRR <0.5 mg%.
 - Necesidad de HD.

2. **Necrosis tubular aguda (NTA):** Presencia de NTA en la biopsia del donante o no disminuir la creatinina sérica por debajo de 1.7 mg/dL en la primera semana postrasplante. siempre y cuando no haya rechazo agudo, ni nefropatía previa en el donante que pudiera justificar la no llegada a ese nivel. Este criterio se ve reforzado si después de esa fecha se alcanza una cifra de Cr normal.

3.3 RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se reclutaron 120 donantes a los que se les realizaron 221 biopsias en el momento 0 pretrasplante. Del total de injertos renales 144 se consideraron aptos para trasplante en simple (65.5%), 63 (28.6%) se consideraron no aptos y 13 (5.9%) se destinaron a trasplante en doble (birrenal en receptor añoso) y se derivaron a la provincia de Málaga. El análisis de supervivencia se realizó a 25 de octubre de 2011 seleccionando 320 receptores de injertos óptimos que actuaron como grupo control.

El tiempo medio de seguimiento ha sido de 6.4 años (dt 3.9).

3.3.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

En la tabla 3.2 se incluyen las características de los dos grupos de estudio. Los donantes con criterios expandidos tuvieron mayor edad, mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, mayor IMC, mayor puntuación en los *scores* de valoración de donantes renales y menores cifras de aclaramiento.

En el grupo ECD se destacan las siguientes características:

- Edad media: 63.1 años (dt 8.2).
- Puntuación media en la escala APACHE II 20.5.
- Puntuación media en la escalada APACHE III 75.6.
- Tiempo desde el fallecimiento hasta la extracción: 11.9 horas (dt 6.4 horas).

Los donantes de este grupo son mayoritariamente varones (145; 67.1%), no diabéticos (191; 86.8%), sin otros factores de riesgo cardiovascular (173; 80.8%).

La causa mayoritaria de muerte de los donantes ECD en nuestra serie es la

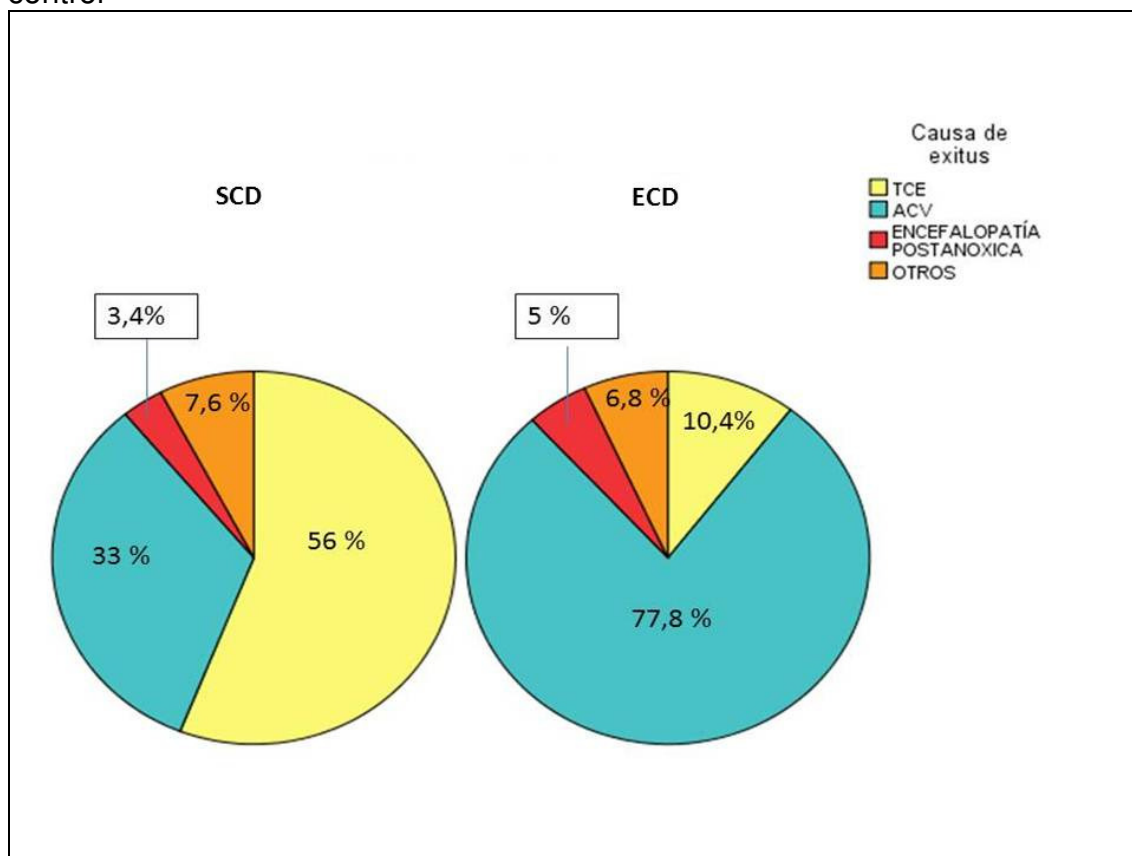
enfermedad cerebrovascular (172; 78.2%), con predominio del ACV hemorrágico (153; 70.2%). (Figura 3.1)

Tabla 3.2. Análisis de variante de los grupos de estudio. Grupo donante ECD frente a grupo control. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

VARIABLES	ECD	SCD	P
N	221	320	
Edad	63 (8.2)	34.2 (11.9)	<0.001
Sexo	145 (65.6%)	207 (63.3%)	0.58
Tabaquismo	28 (30.1%)	101 (33.4%)	0.54
Hipercolesterolemia	18 (18.2%)	5 (1.6%)	<0.001
Diabetes Mellitus	25 (11.5%)	6 (2.1%)	<0.001
HTA	109 (49.3%)	23 (7%)	<0.001
Talla	165.5 (7.5)	169.4 (9)	<0.001
Peso	76.8 (10.6)	73.4 (15)	0.03
IMC	28.1 (3.6)	25.5 (4.1)	<0.001
Estancia UCI	88.56 (80.4)	79.2 (95.3)	0.24
Donor risk score	1.01 (0.22)	0.45 (0.19)	<0.001
Kidney donor index	2.01 (0.55)	0.96 (0.26)	<0.001
UK donor index	1.54 (0.36)	0.93 (0.17)	<0.001
DDS score	25.8 (5.3)	9.3 (6.1)	<0.001
Aclaramiento MDRD	83.6 (32.1)	96.01 (43.3)	<0.001
Aclaramiento MDRD4IDMS	78.7 (30.2)	90.6 (41.7)	<0.001
Aclaramiento CG	86.1 (28.8)	111.1 (46.9)	<0.001
Creatinina	1.01 (0.47)	1.06 (0.57)	0.23

La causa de la muerte según los diferentes grupos se esquematiza en la figura 3.1. La causa predominante de muerte en el grupo de donantes ECD es el accidente cerebrovascular (isquémico o hemorrágico). En el grupo control el TCE sigue siendo la causa de muerte más frecuente, condicionado por la franja de edad y el periodo de seguimiento.

Figura 3.1. Distribución de la causa de fallecimiento. Donante ECD frente a grupo control



3.3.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS RECEPTORES

Las características de los receptores se muestra en la tabla 3.3 (análisis vicariante). Los receptores de riñones procedentes del grupo ECD fueron mayores y existió una diferencia de edad negativa entre el donante y el receptor. Los

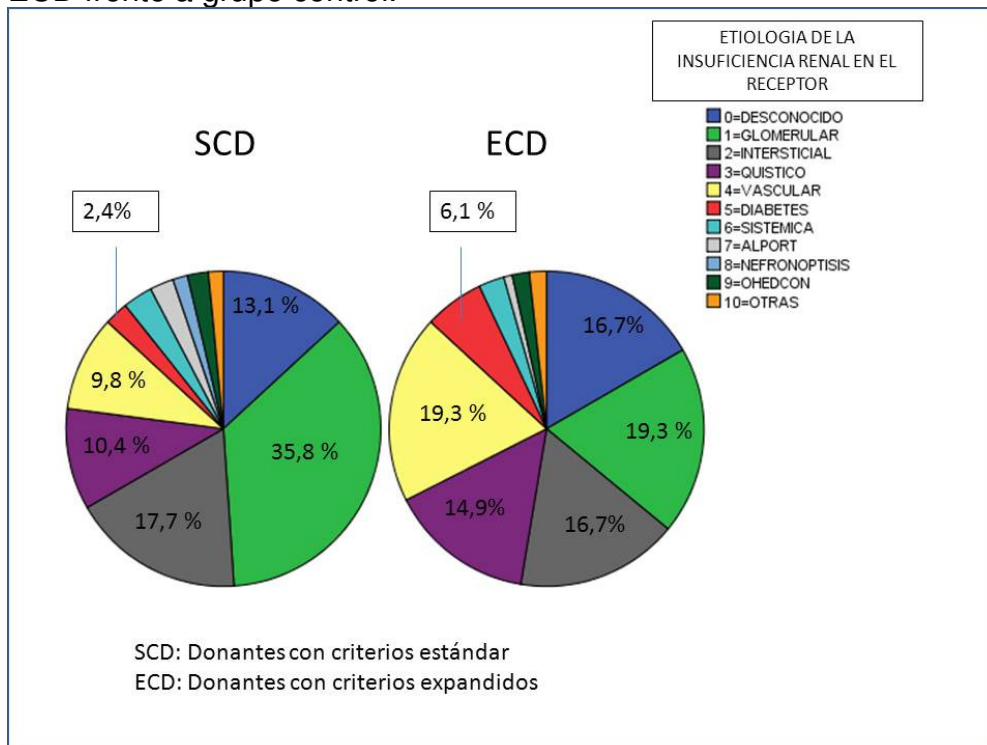
receptores de injertos procedentes de donantes ECD también presentaron mayor peso y mayor IMC, esta diferencia es debida a la mayor edad de los receptores de este grupo en cuya franja de edad es más frecuente la obesidad.

Tabla 3.3. Análisis bivariante de las características de los receptores grupo ECD frente a grupo control. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	RECEPTORES ECD	RECEPTORES SCD	P
N	114	327	
Edad	56.8 (10.9)	39.8 (11.5)	<0.001
Sexo	71 (62.3%)	197 (60.2%)	0.73
Retrasplante	10 (8.8%)	42 (12.8%)	0.31
Hepatitis C	9 (7.9%)	35 (10.7%)	0.38
HTA	91 (79.8%)	247 (75.5%)	0.35
Talla	162.1 (7.6)	164.8 (9.6)	0.34
Peso	68.3 (11.2)	67.1 (13.3)	0.03
IMC	26.2 (4.4)	24.6 (4.5)	0.02
Tiempo de Hemodiálisis	3.2 (2.4)	3.3 (3.4)	0.88
Diferencia Peso D-R	7.6 (14.1)	5.7 (19.9)	0.27
Diferencia Edad D-R	5.2 (10.9)	-5.6 (13.8)	<0.001
Incompatibilidades HLA	3.3 (1.04)	3.4 (1.02)	0.48
Incompatibilidad A	1.3 (0.6)	1.2 (0.6)	0.66
Incompatibilidad B	1.4 (0.6)	1.3 (0.6)	0.41
Incompatibilidad DR	0.71 (0.47)	0.73 (0.47)	0.64

La causa de insuficiencia renal en los receptores se detalla en la figura 3.2. La causa predominante en los dos grupos es la glomerulonefritis. En el grupo de ECD la causa vascular, la poliquistosis y la diabetes son más frecuentes, condicionados por la diferente edad de los receptores para los dos grupos.

Figura 3.2. Distribución de la causa de insuficiencia renal en los receptores. Grupo ECD frente a grupo control.



3.3.3 EVOLUCIÓN POSTQUIRÚRGICA DE LOS RECEPTORES

Las características demográficas de los receptores y la evolución postquirúrgica inmediata se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Evolución postquirúrgica tras el trasplante análisis, bivalente. Grupo ECD frente a grupo control. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	SCD	ECD	P
N	320	144	
Edad	39.8	56.8	<0.001
Tiempo Isquemia fría	16.8 (4.8)	18.3 (3.9)	0.01
Riñón funcionando	321 (98.2%)	111 (97.4%)	0.70
NTA	197 (60.4%)	91 (79.8%)	<0.001
Función retrasada del injerto	153 (50.6%)	86 (76.1%)	<0.001
Rechazo agudo	56 (17.2%)	17 (14.9%)	0.66
Diuresis efectiva	320 (97.9%)	112 (98.2%)	0.8
Día de diuresis efectiva	5.1	7.6	0.02
Día Cr sérica normal	44.2	111.08	0.011
Cr. al alta	2.02	2.44	0.001
Número de HD	1.22	2.19	0.13
Estancia hospitalaria	17.2	21.1	0.005
Aclaramiento 7días	34.5	21.9	<0.001
Aclaramiento al año	73.5	51.9	<0.001
Proteinuria al mes	0.16	0.29	0.26
Proteinuria al año	0.18	0.14	0.31

Los receptores de donantes con criterios expandidos (ECD) fueron mayores y presentaron peor evolución postrasplante con mayor proporción de NTA y función retardada del injerto, día de diuresis eficaz más tardío y menor aclaramiento calculado por C&G a los 7 días y al año. El tiempo de isquemia fría fue superior en

el grupo ECD debido a que la realización de biopsia que demora la realización del trasplante.

3.3.4 FACTORES QUE CONDICIONAN LA VALIDEZ RENAL.

En el periodo de estudio se recogieron 220 donantes con criterios expandidos. Del total de órganos extraídos la distribución según tipo de trasplante fue la siguiente:

- Riñones aptos para trasplante en simple: 144 (69.9%).
- Riñones aptos para trasplante en doble en receptor añoso: 13 (5.9%)
- Riñones no aptos para trasplante: 63 (28.6%) no se consideraron aptos.

Para el análisis de validez renal los riñones aptos para trasplante en doble se consideraron riñones no aptos.

Con respecto a la distribución de la causa de la muerte en ambos grupos no existieron diferencias significativas ($p=0.11$) (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Causa de la muerte en el grupo de estudio (donantes ECD). Riñón válido frente a riñón no válido. Los datos se presentan en número de pacientes y porcentaje.

Causas	Riñón válido	Riñón no valido
ACV isquémico	23 (16.1%)	3 (4.8%)
ACV hemorrágico	94 (65.7%)	48 (77.4%)
Encefalopatía postanóxica	6 (4.2%)	4 (6.5%)
TCE	16 (11.2%)	7 (11.3%)
Otras	4 (2.8%)	0

En la tabla 3.6 se muestra el resultado del análisis bivalente para validez renal. La puntuación media de los riñones aptos fue de 4.2 (dt 1.46) y 8.1 (dt 1.58) para los no aptos.

Tabla 3.6. Análisis bivalente de factores que condicionan la validez renal en el grupo de estudio (donante ECD). Riñón válido frente a riñón no válido. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	Riñón válido	Riñón no válido	P
Puntuación biopsia	4.2 (1.4)	8.1 (1.5)	
Edad	62.2 (8.2)	63.7 (7.7)	NS
APACHE III	75.8 (27.7)	79.7 (33.1)	NS
Estancia en UCI (horas)	92.42 (5-515)	59.8 (6.4-264)	0.033
Kidney donor index	1.94 (0.55)	2.16 (0.49)	0.006
UK donor index	1.52 (0.36)	1.60 (0.35)	0.16
Sexo Femenino	54 (37.5%)	14 (22.2%)	0.03
HTA	70 (48.6%)	35 (55.6%)	0.35
Diabetes	11 (7.7%)	13 (21.7%)	0.006
Aterosclerosis demostrada	20 (14.2%)	20 (23.3%)	0.003
IMC	28.1 (3.6)	27.5 (3.3)	NS
Aclaramiento MRDR	86.2 (22.2)	80.6 (30.2)	NS
Aclaramiento CCG	89.4 (29.2)	78.9 (24.9)	0.017
Urea sérica a la extracción	32.9 (16.4)	38.9 (16.1)	0.02
Cr. sérica a la extracción	0.96 (0.36)	1.1 (0.66)	0.04
Proteinuria	27 (20.6%)	22 (40%)	0.01
Uso de DVA	113 (87.6%)	46 (76.7%)	0.05
Hiperglucemia	34 (27.9%)	26 (45.6%)	0.016

Los scores predictivos de función renal del injerto en el receptor se comportan adecuadamente en nuestra cohorte de pacientes ECD para valorar la validez renal. Los injertos no válidos presentan una puntuación mayor en KDRI y UKDI. La escala KDRI es útil en nuestra cohorte de pacientes ($p=0.006$).

En el análisis bivalente se identifican como variables cualitativas significativas para la predicción de validez renal: estancia en UCI, sexo, presencia de HTA, uso de DVA, DM, presencia de hiperglucemia en UCI y aterosclerosis demostrada. Las variables cuantitativas asociadas con la validez renal en el análisis bivalente son estancia en UCI, CICCG, Urea y creatinina séricas a la extracción. Estos hallazgos que se confirma en la regresión logística simple bivalente (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Análisis mediante regresión logística simple (bivalente) de los factores asociados a validez renal en el grupo de estudio (donante ECD).

Variables	OR	P	IC al 95%
Sexo femenino	0.47	0.031	0.24-0.94
Diabetes Mellitus	3.31	0.005	1.39-7.91
Aterosclerosis	3.02	0.002	1.47-6.1
Proteinuria	2.56	0.006	1.29-5.09
Ausencia de DVA	0.46	0.05	0.21-1.03
Soporte con NORA	0.17	0.03	0.33-0.89
Hiperglucemia	2.17	0.019	1.12-4.17
Estancia en UCI	0.996	0.03	0.992-1
CICCG	0.98	0.01	0.97-0.99
Creatinina sérica	1.86	0.06	0.96-3.5
Urea sérica	1.02	0.02	1-1.04

Posteriormente realizamos una regresión logística multivariada mediante introducción manual de las variables para identificar posibles interferencias y variables confundentes, así como desarrollar un modelo predictivo con una sensibilidad y especificidad adecuadas. En el análisis multivariado se mantienen como variables significativas estancia en UCI, CLCCG, sexo femenino, presencia de aterosclerosis clínicamente demostrada, urea sérica y creatinina séricas a la extracción (Tabla 3.8)

Tabla 3.8. Análisis multivariado mediante regresión logística de validez renal en el grupo de estudio (donante ECD).

Variabes	OR	P
Estancia en UCI	0.991	0.02
CICCG	0.95	0.006
Sexo femenino	0.46	<0.001
Aterosclerosis	3.98	0.013
Urea extracción	1.08	0.002
Cr extracción	1.5	0.002
Ausencia DVA	0.27	0.04

Con estas variables desarrollamos diversas ecuaciones para predecir la validez renal por biopsia utilizando las variables creatinina sérica del donante, CICCG y urea sérica del donante ya que consideramos a estas tres variables redundantes en el análisis.

La mejor AUC del modelo se obtiene al utilizar como variables predictoras (Figura 3.3).

- Estancia en UCI.
- Sexo del donante.
- Presencia de aterosclerosis.
- Urea sérica en el momento de la valoración del donante.
- Uso de soporte vasoactivo.

La ecuación obtenida, referida como Modelo Andaluz de Validez Renal es la siguiente:

$$\text{Validez} = 1 / (1 + (2.718 - (-4.579 - 0.009 * \text{estancia en UCI} + 1.792 * \text{sexo} + 1.496 * \text{aterosclerosis} - 1.626 * \text{DVA} + 0.047 * \text{urea})))$$

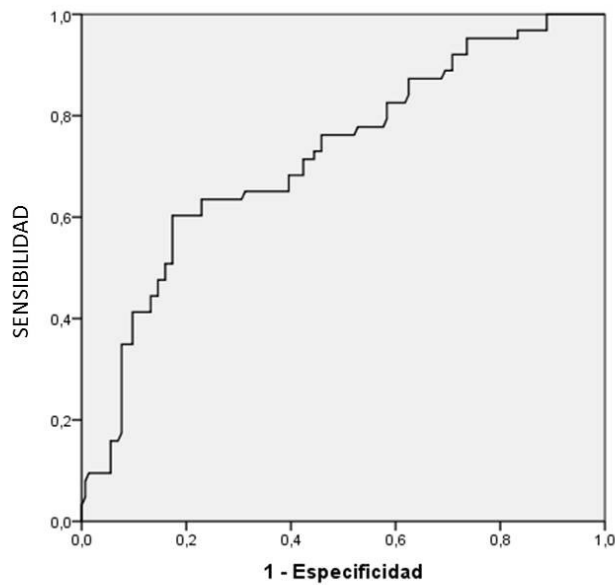
Sexo: 1 si mujer; 0 si varón

Aterosclerosis: 1 presente; 0 ausente

Uso de DVA: 1 no; 0 si

Figura 3.3. Curva COR de Validez renal obtenida con la puntuación de la ecuación del Modelo Andaluz.

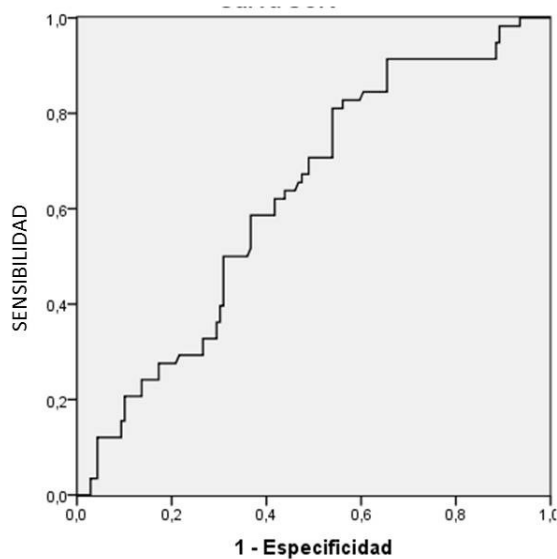
CURVA ROC PARA VALIDEZ RENAL OBTENIDA MEDIANTE EL MODELO ANDALUZ



Con esta ecuación obtenemos un área bajo la curva de 0.72. Si introducimos en el modelo el CICCG y la creatinina sérica el valor de área bajo la curva es de 0.56 y 0.67 respectivamente. Usando como variables predictoras de validez el KDRI y UKDI se obtienen las siguientes curvas y AUC (0.62 y 0.57) respectivamente.

Figura 3.4. Curva COR para predicción de validez renal según el modelo KDRI.

CURVA ROC PARA VALIDEZ RENAL OBTENIDA MEDIANTE KDRI



Para un valor de corte de 0.1 de nuestra ecuación el valor predictivo positivo es del 79.6% y el valor predictivo negativo del 60%. Con este valor de corte estaríamos clasificando correctamente al 80% de los donantes, disminuyendo el porcentaje de descartes en un 8% en nuestra serie, sacrificando la sensibilidad para minimizar la pérdida de donantes aptos.

3.3.5 ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE NECROSIS TUBULAR AGUDA Y FUNCIÓN RETARDADA DEL INJERTO RENAL

El trasplante con donantes ECD se ha relacionado con un aumento de la incidencia de NTA y FRI. Para el estudio de los factores asociados con el desarrollo de necrosis tubular aguda y función retardada del injerto incluimos a todos los donantes incluyendo el grupo de estudio y el grupo control. Los resultados del análisis bivariante se muestran en la tabla 3.9 y 3.10.

Tabla 3.9. Factores asociados con el desarrollo de NTA. Análisis bivariante. Para toda la cohorte de pacientes. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	NTA (No)	NTA (Si)	P
Edad del donante	36.5 (16.2)	44.1 (16.1)	<0.001
Edad del receptor	41.6 (13.8)	45.6 (13.3)	0.003
Puntuación biopsia	3.8 (1.3)	4.2 (1.4)	0.24
TIF	16.1 (4.3)	17.8 (4.6)	<0.001
Incompatibilidades	3.35 (1.05)	3.36 (1.01)	0.93
Tratamiento con CSA	46 (30.3%)	102 (35.4%)	0.29
CICCG	108.9 (34.4)	102.9 (48.6)	0.14

Las variables asociadas con el desarrollo de NTA en el receptor son la edad del donante y receptor y el tiempo de isquemia fría.

Tabla 3.10. Factores asociados con el desarrollo de FRI. Análisis bivariante. Para toda la cohorte de pacientes. Los datos se presentan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	FRI No	FRI SI	P
Edad del donante	36.4 (15.6)	45.3 (16.1)	<0.001
Edad del receptor	42.02 (13.3)	45.03 (13.6)	0.002
Puntuación biopsia	3.6 (1.5)	4.3 (1.4)	0.03
TIF	16.2 (4.2)	17.8 (4.8)	<0.001
Incompatibilidades	3.43 (1.03)	3.31 (1.03)	0.22
Tratamiento con CSA	51 (27.4%)	81 (32.5%)	0.29
CICCG	111.9 (46.7)	99.3 (41.2)	0.003

Las variables asociadas con una FRI son edad del donante, puntuación de la biopsia, tiempo de isquemia fría y aclaramiento de CICCG.

El trasplante con injertos procedentes de donantes ECD se asocia de forma significativa con el desarrollo de necrosis tubular y función retardada del injerto (tabla 3.11).

Tabla 3.11. Desarrollo de NTA y FRI en el receptor, donantes ECD frente a grupo control.

Variables	Donantes SCD	Donantes ECD	P
NTA	197 (60.2)	91 (80.5)	P<0.001
FRI	164 (50.8)	85 (75.9)	P<0.001

En la tabla 3.12 y 3.13 se muestran los resultados de la regresión logística bivariante para necrosis tubular y función retardada del injerto.

Tabla 3.12. Análisis bivariante mediante regresión logística simple de los factores implicados en el desarrollo de NTA para toda la cohorte de pacientes.

NTA	OR	IC al 95%
ECD	2.73	1.63-4.57
Edad donante	1.03	1.01-1.04
Edad receptor	1.02	1.007-1.03
Isquemia fría	1.08	1.03-1.13
Uso de DVA: NO	1	
DOPA	0.15	0.19-1.3
NORA	0.51	0.55-4.8
DOPA y NORA	0.26	0.02-2.8

Tabla 3.13. Análisis bivariante mediante regresión logística simple de los factores implicados en el desarrollo de FRI para toda la cohorte de pacientes.

FRI	OR	IC al 95%
ECD	3.05	1.88-4.95
Edad donante	1.03	1.02-1.04
Edad receptor	1.02	1.01-1.03
Isquemia fría	1.08	1.03-1.12
Uso de DVA: NO		
DOPA	0.12	0.15-1.03
NORA	0.29	0.03-2.5
DOPA y NORA	0.17	0.17-1.8

En el análisis mediante regresión logística simple se confirman los resultados del análisis bivariante.

Mediante regresión logística realizamos un análisis multivariante introduciendo las variables significativas en el análisis bivariante. La utilización de drogas vasoactivas no alcanzó significación estadística en el modelo multivariante.

Para valorar la influencia de los donantes ECD sobre la NTA introducimos en el modelo las variables tipo de donante, puntuación de la biopsia, isquemia fría, CICCG, edad del donante y edad del receptor. Para el modelo de FRI introducimos las variables la edad del donante, edad del receptor, tiempo de isquemia fría y la puntuación en la biopsia. (tabla 3.14)

Tabla 3.14. Análisis multivariante de desarrollo de NTA y FRI en toda la cohorte de pacientes.

Variables	NTA	FRI
Edad del receptor	1.01 (0.98-1.02)	0.99 (0.97-1.01)
Edad del donante	1.02 (1.01-1.04)	1.03 (1.01-1.05)
Isquemia fría	1.20 (1.04-1.38)	1.15 (1.01-1.31)
Donantes ECD	1.53 (0.72-3.24)	1.48 (0.73-3.02)
CICCG	0.99 (0.97-1.01)	0.99 (0.97-1.01)
Puntuación	1.42 (0.94-2.15)	1.63 (1.10-2.42)

El desarrollo de NTA y FRI en el receptor están determinadas fundamentalmente por la edad del donante y el tiempo de isquemia fría. El efecto de la variable donante ECD, que no viene definida exclusivamente por la edad, desaparece el análisis multivariante. Una puntuación elevada en la valoración anatomopatológica

según el protocolo andaluz se relaciona con la incidencia de función retardada del injerto.

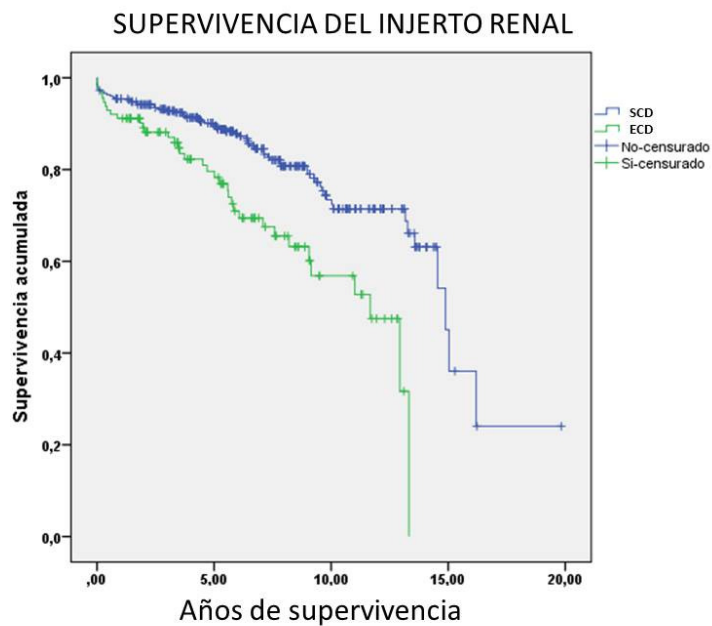
3.3.6 SUPERVIVENCIA DEL INJERTO RENAL

Del total de riñones aptos (144), 13 injertos no se incluyeron en el análisis posterior por diversas causas.

- 4 injertos renales se trasplantaron en otra provincia
- Ha sido imposible localizar 2 receptores.
- 1 injerto procedía de un donante Serología positiva para Hepatitis C
- 2 injertos presentaron problemas vasculares
- 4 injertos no se implantaron por otras causas.

Cuando comparamos las curvas de supervivencia del injerto del grupo control (SCD) frente al de donantes con criterios expandidos, la supervivencia del injerto es superior en el grupo control (log Rank=0.035). La supervivencia media es de 6.7 años para el grupo de SCD y 5.4 años para el grupo de ECD. La supervivencia a los 5 años es superior al 50% para ambos grupos.

Figura 3.5. Curva de supervivencia del injerto renal (Kaplan-Meier) grupo ECD frente a grupo control.



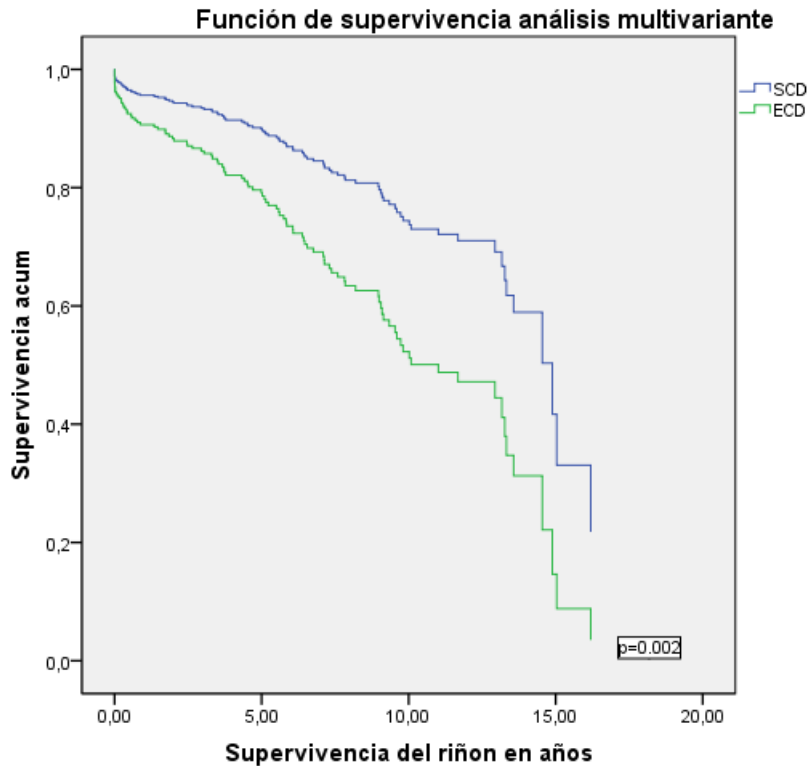
Log Rank $p < 0.0001$

Mediante regresión de Cox el grupo de pacientes con injerto procedentes de SCD, tiene un riesgo de pérdida del injerto inferior (HR 0.42, IC al 95% 0.28-0.65). Esta diferencia se mantiene cuando incluimos en el modelo la edad del receptor y el tiempo de isquemia fría (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Análisis multivariado mediante de regresión de Cox de supervivencia. Grupo ECD frente a grupo control.

VARIABLES	HR	IC al 95%	P
Tipo de donante	0.45	0.27-0.75	0.002
Tiempo de isquemia fría	1.01	0.95-1.04	0.95
Edad receptor	1.03	0.98-1.02	0.73

Figura 3.6. Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox, incluyendo como covariables tiempo de isquemia fría y edad del receptor. Grupo ECD frente a grupo control.

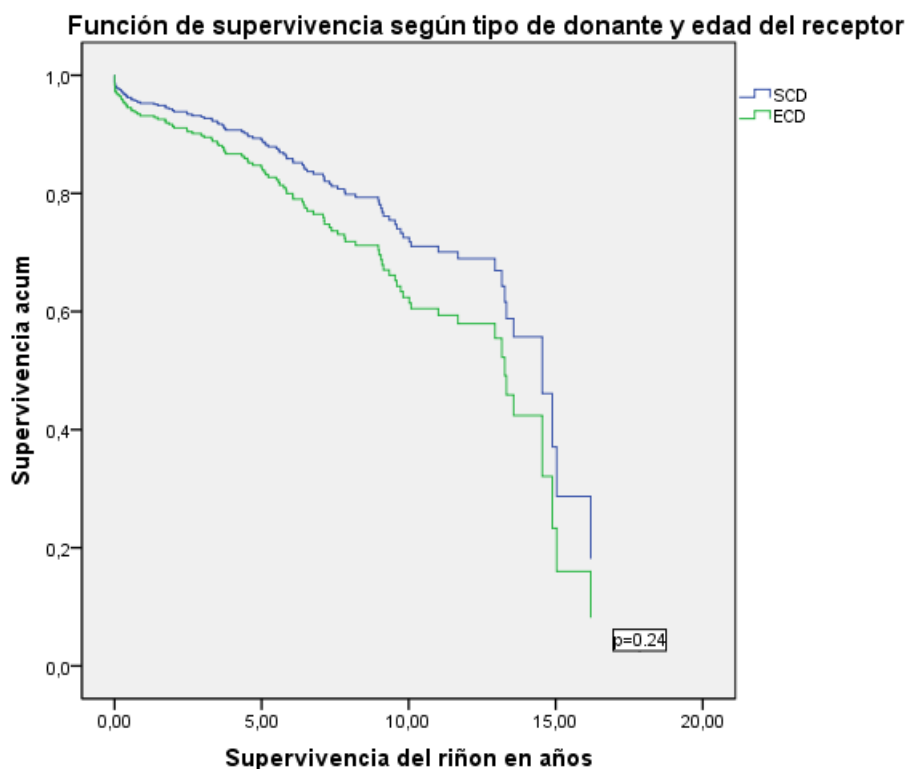


Esta diferencia de supervivencia está condicionada fundamentalmente por la edad del donante de forma que al introducir la variable en el modelo desaparece la significación, apareciendo la edad del donante como variable cercana a la significación (tabla 3.16).

Tabla 3.16. Análisis multivariado mediante de regresión de Cox de supervivencia.

Variables	HR	IC al 95%	P
Tipo de donante	0.68	0.35-1.3	0.24
Edad donante	1.01	0.99-1.035	0.07

Figura 3.7. Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox, incluyendo como covariables tiempo de isquemia fría, edad del donante y edad del receptor. Grupo ECD frente a grupo control.

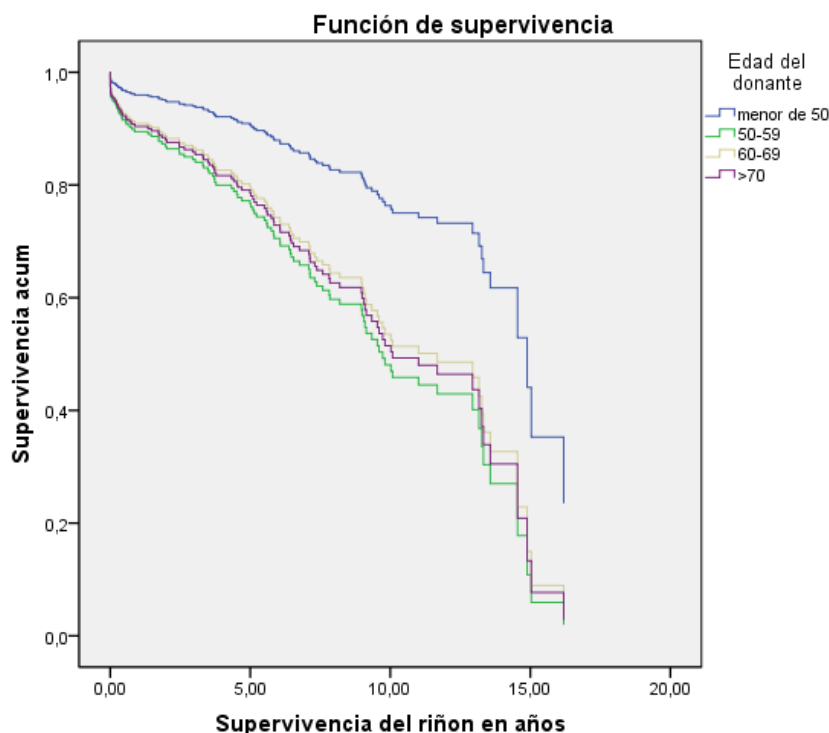


La diferencia de supervivencia en ambos grupos está condicionada fundamentalmente por la edad del donante. En el grupo ECD la supervivencia del injerto es similar si estratificamos la supervivencia por rangos de edad (Tabla 3.17).

Tabla 3.17. Análisis multivariado mediante de regresión de Cox de supervivencia.

Edad	HR	IC al 95%	P
Menor de 50 años	0.40	0.19-0.85	<0.0001
50-60 años	1		
60-70	1.10	0.48-2.5	0.81
Mayor de 70	0.94	0.39-2.24	0.89

Figura 3.8. Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox covariables tiempo de isquemia fría, edad del donante. La edad del receptor se muestra estratificada en 3 grupo de edad: menor de 50 años (grupo control), edades comprendidas entre 50 y 59, 60 y 69 y mayores de 70 años.



La probabilidad de muerte con injerto funcionando es del 7.3% en el grupo control, frente al 17.2% en el grupo ECD ($p=0.02$). La muerte con injerto funcionando es la causa más frecuente de pérdida del injerto en el grupo de donantes añosos (19 pacientes, el 16.7%). Por el contrario el rechazo crónico FI/AT lo es para el grupo control (Tabla 3.18).

Tabla 3.18. Causa más frecuente de pérdida del injerto.

Causas	SCD	ECD
Pérdida del injerto	63 (19.1%)	36 (31.6%)
Rechazo agudo	6 (1.8%)	3 (2.6%)
Nefropatía crónica del injerto	19 (5.8%)	12 (10.5%)
Abandono del tratamiento	4 (1.2%)	0
Exitus	24 (7.3%)	19 (16.7%)
Recidiva de enfermedad de base	8 (2.4%)	1 (0.9%)
Otros	2(0.6%)	1 (0.9%)

3.3.7 RELACIÓN DE LA PARP1 CON LA LESIÓN RENAL INDUCIDA POR LA MUERTE ENCEFÁLICA

Medimos la expresión de la enzima Poli ADP ribosa polimerasa tipo 1 (PARP1) en el grupo de donantes subóptimos con biopsia preimplante para valorar la influencia de la muerte encefálica y del mantenimiento del donante sobre la lesión por isquemia-reperfusión. En la tabla 3.19 se muestran los resultados de expresión de PARP1 a nivel tubular (PARPt). Se muestran en media (dt) o rango y en número de casos (porcentaje).

Tabla 3.19. Expresión en túbulos renales de PARP1 mediante inmunohistoquímica. Análisis bivalente. Los resultados se muestran en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

VARIABLES	PARPt (ausente)	PARPt (presente)	P
Edad	63.07 (8.7)	62.8 (8.1)	0.85
Puntuación Andaluza	5.59 (2.4)	5.21 (2.26)	0.52
APACHE II	20.08 (8.9)	20.8 (9.1)	0.75
APACHE III	72.7 (29.9)	84.1 (30.7)	0.14
Causa de la muerte encefalopatía postanóxica	2 (1.5%)	8 (13.8%)	0.001
Aclaramiento a la extracción CCG	88.2 (29.6)	82.9 (28.3)	0.28
Estancia en UCI (horas)	81.3	83.9	
Tiempo de ME (minutos)	729.2 (408.1)	643.9 (242.5)	0.50
Hemoglobina	11.8 (2.2)	11.7 (2.6)	0.73
Hipotensión	10 (7.8%)	7 (12.5%)	0.30
Hiper glucemia	41 (38.3%)	14 (28%)	0.21
Uso de DVA	91 (76.5%)	44 (88%)	0.09
Diabetes insípida	35 (27.3%)	24 (42.9%)	0.04
Diuresis a la extracción	234.8 (132.1)	331.6 (169.5)	<0.001
Proteinuria	32 (27.6%)	15 (30%)	0.75

Mediante regresión logística binaria analizamos el efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel tubular (Tabla 3.20).

Tabla 3.20. Regresión logística binariante del efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel tubular.

	OR	P	IC al 95%
NO	1		
DOPA	3.6	0.02	1.19 - 10.8
NORA	0.8	0.70	0.25 - 2.54
DOPA Y NORA	11.5	0.001	2.78 - 47.66

El uso de DOPA y el uso combinado de DOPA y NORA se muestran como factores que inducen expresión de PARP1 a nivel del injerto renal en el análisis bivariante.

Para analizar las posibles interacciones entre estas variables diseñamos un modelo multivariado añadiendo como covariables la DI, muerte por encefalopatía postanóxica y diuresis. En este modelo el fallecimiento por encefalopatía postanóxica y del uso combinado de DOPA y NORA se mantienen como factores de riesgo para la expresión de PARP1 (Tabla 3.21).

Tabla 3.21. Análisis multivariado de los factores que influyen en la expresión de PARP1 a nivel tubular.

	OR	P	IC
Encefalopatía postanóxica	9.9	0.02	1.3-72.4
Uso de NORA y DOPA	6.04	0.01	1.3-27.2

Con la misma metodología analizamos los factores relacionados con la expresión de PARP1 a nivel glomerular (PARPg) e intersticial (PARPi) (Tabla 3.22)

Tabla 3.22. Expresión glomerular de PARP1 mediante inmunohistoquímica. Análisis bivariante. Los resultados se muestran en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

VARIABLES	PARPg (ausente)	PARPg (presente)	P
Edad	63.06 (8.6)	62.8 (8.4)	0.86
Puntuación Andaluza	5.5 (2.3)	5.2 (2.3)	0.40
APACHE III	72.7 (29.8)	85.4 (31.1)	0.11
APACHE II	20.05 (8.7)	21 (9.5)	0.70
Causa de la muerte encefalopatía postanóxica	5 (3.6%)	7 (14%)	0.01
Aclaramiento a la extracción CCG	87.2 (29.6)	85.1 (28.3)	0.68
Estancia en UCI (horas)	82.6	80.7	0.90
Tiempo de ME (minutos)	723.8 (399.4)	656.6 (288.1)	0.65
Hemoglobina	11.8 (2.25)	11.7 (2.71)	0.70
Hipotensión	11 (8.1%)	6 (12%)	0.42
Hiperglucemia	42 (37.8%)	13 (28.3%)	0.25
Uso de DVA	95 (77.2%)	40 (87%)	0.16
Diabetes insípida	37 (27.6%)	22 (44%)	0.03
Diuresis a la extracción	238.6 (137.7)	331.1 (164.4)	0.001
Proteinuria	34 (27.9%)	13 (28.3%)	0.83

Mediante regresión logística binaria analizamos el efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel glomerular (Tabla 3.23).

Tabla 3.23. Regresión logística binariante del efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel glomerular.

	OR	P	IC al 95%
NO	1		
DOPA	3.1	0.04	1.03 - 9.35
NORA	0.5	0.34	0.16 -1.86
DOPA Y NORA	8.8	0.002	2.2 - 35.1

Construimos un modelo multivariado similar al previo, obteniendo resultados similares (Tabla 3.24).

Tabla 3.24. Análisis multivariado de los factores que influyen en la expresión de PARP1 a nivel glomerular.

	OR	P	IC
Encefalopatía postanóxica	4.3	0.13	0.64-29.8
Uso de NORA y DOPA	4.5	0.04	1.04-19.7

Tabla 3.25. Expresión en infiltrado inflamatorio intersticial de PARP1 mediante inmunohistoquímica. Análisis bivariante. Los resultados se muestran en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

VARIABLES	PARPi (ausente)	PARPi (presente)	P
Edad	62.8 (9.2)	63.7 (7.1)	0.75
Puntuación Andaluza	5.2 (2.4)	5.9 (2.1)	0.06
APACHE III	75.06 (30.8)	77.7 (29.9)	0.72
APACHE II	19.1 (9.4)	22.1 (8.1)	0.23
Causa de la muerte encefalopatía postanóxica	5 (3.9)	7 (11.7)	0.05
CICG	89.9 (31.1)	79.8 (23.9)	0.03
Estancia en UCI (horas)	79.4 (100.8)	88.03 (93.4)	0.57
Tiempo de ME (minutos)	717.6 (416.1)	712.5 (272.9)	0.96
Hemoglobina	12.1 (2.5)	11.3 (2.1)	0.07
Hipotensión	10 (8)	7 (11.7)	0.42
Uso de DVA	87 (77)	48 (85.7)	0.18
Diabetes insípida	35 (28.2)	24 (40)	0.11
Diuresis a la extracción	247.9 (135.7)	299.6 (173.2)	0.06

Mediante regresión logística binaria analizamos el efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel glomerular (Tabla 3.26).

Tabla 3.26. Regresión logística bivariante del efecto de las drogas vasoactivas sobre la expresión de PARP1 a nivel intersticial.

	OR	P
NO	1	
DOPA	3.6	0.02
NORA	1.8	0.28
DOPA Y NORA	4.2	0.03

Construimos un modelo multivariado añadiendo como covariables a DI, diuresis a la extracción, fallecimiento por encefalopatía postanóxica, puntuación en la biopsia, aclaramiento de creatinina y hemoglobina. En este modelo no se obtiene significación estadística.

3.3.8 INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE PARP1 SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL RECEPTOR

La expresión de PARP en los injertos condiciona una peor evolución de los receptores con diuresis eficaz más tardía, mayor creatinina al alta, menor aclaramiento calculado por CCG y mayor necesidad de hemodiálisis, aunque sin significación estadística. El grupo que no expresaba PARP presentó una edad mayor de los receptores, mayor tiempo de isquemia fría, mayor número de incompatibilidades y mayor tratamiento con ciclosporina A. (Tabla 3.27)

Tabla 3.27. Influencia de la expresión de PARP1 sobre la evolución del receptor. Los datos se expresan en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	PARPt (negativo)	PARPt (positivo)	P
Edad donante	63.1 (8.7)	62.83 (8.1)	0.85
Puntuación biopsia	5.59 (2.4)	5.21 (2.2)	0.31
Edad receptor	59.04 (9.1)	54.1 (13.3)	0.03
Incompatibilidades	3.5 (0.98)	3.03 (1.14)	0.02
Tiempo de isquemia fría	18.9 (3.9)	17.2 (3.7)	0.04
Tratamiento con CSA	16 (23.2%)	14 (48.3%)	0.01
Día de diuresis eficaz	6.8 (dt 6.9)	8.4 (dt 7.39)	0.31
Día de creatinina <1.7	52.05 (86.9)	83.1 (211.8)	0.35
Creatinina al alta (mg/dL)	2.3 (1.14)	2.8 (1.47)	0.08
Nº de sesiones de HD	1.75 (3.1)	2.41 (3.5)	0.36
Aclaramiento CCG al alta	37.2 (15.1)	43.9 (16.5)	0.06
Aclaramiento al año	51.6 (17.9)	52.6 (15.2)	0.78
Proteinuria al año	0.044 (0.13)	0.16 (0.39)	0.14

Para aislar la posible influencia de estos factores se ha realizado una regresión múltiple. La expresión de PARP1t en la biopsia preimplante no se relaciona con la funcionalidad del injerto a corto plazo en el análisis multivariado.

Los factores implicados en la evolución del injerto renal a corto plazo son:

- Día de diuresis eficaz: tratamiento con CSA

- Creatinina al alta:

Edad del donante	0.02
Edad del receptor	0.01
KD Index	0.02
Tratamiento con CSA	0.003

- Sesiones de hemodiálisis:

Edad del donante	0.03
Edad del receptor	0.03
KD Index	0.04
Tratamiento con CSA	0.006

- CICCg a los 30 días:

CICCg donante	0.02
Puntuación de la biopsia	0.02
Tratamiento con CSA	0.05

- CICCg al año: KDI<0.001.

La inducción con CSA aparece como un factor constante que condiciona peor funcionalidad del injerto a corto plazo, desapareciendo la significación al año de evolución del trasplante renal (Tabla 3.28)

3.3.9 INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON DVA SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO A CORTO PLAZO.

El paciente en muerte encefálica necesita soporte vasoactivo para combatir la vasoplejia secundaria a la muerte encefálica. En la actualidad sigue existiendo

controversia con respecto a la droga vasoactiva idónea para el mantenimiento de los pacientes potencialmente donantes de órganos. En la tabla 3.28 se muestran las características de los donantes y receptores según el uso de las drogas vasoactivas utilizadas habitualmente para el mantenimiento del paciente potencialmente donantes de órganos.

Tabla 3.28. Influencia de la inducción con CSA en la evolución postquirúrgica del injerto renal procedente de donantes ECD. Los resultados se muestran en media y dt.

Variables	Tratamiento con CSA		P
	No	Si	
Día de diuresis eficaz	5.65 (5.2)	11.3 (8.6)	<0.001
Creatinina al alta (mg/dL)	2.24 (1.08)	2.84 (1.42)	0.03
Número de sesiones de HD	1.42 (2.7)	3.6 (4.9)	0.006
Estancia hospitalaria	19.6 (13.6)	23.9 (11.2)	NS
CICCG a 30 días	43.5 (15.9)	37.4 (16.2)	0.05
CICCG al año	53.4 (18.1)	45.7 (13.4)	NS

En el análisis bivalente el uso de noradrenalina se asoció con menor estancia hospitalaria, menor necesidad de diálisis, menor número de sesiones de HD, mayores cifras de aclaramiento al mes y al año en el análisis bivalente. El uso de dopamina se asocia con menor porcentaje de NTA y FRI.

El análisis de la muestra evidencia importantes diferencias en los grupos de estudio con respecto a características fundamentales como la edad del donante y receptor, así como la puntuación de la biopsia.

Para eliminar la influencia de estos factores realizamos un análisis multivariante mediante regresión logística y regresión múltiple. Se introdujeron en el análisis

como covariables la edad del donante, edad del receptor, puntuación en la biopsia, tratamiento con micofenolato-mofetil y número de incompatibilidades. En el análisis multivariante desaparece la significación estadística para el uso de noradrenalina y dopamina.

Las variables con significación estadística en el análisis multivariante son:

1. Función Retardada del injerto: puntuación de la biopsia, OR 1.603 (IC 1.10-2.33)
2. Aclaramiento por Crockoft-Gault al mes: puntuación de la biopsia ($p=0.05$)
3. Número de sesiones de hemodiálisis: Edad del receptor ($p=0.02$)
4. CCG al año: Edad del donante ($p=0.006$)

Tabla 3.28. Características del donante y receptor en función del tratamiento con drogas vasoactivas. Análisis bivariante. Los datos se muestran en media y dt o número de pacientes y porcentaje.

Variables	NO (14)	DOPAMINA (41)	NORA (41)	DOPA Y NORA (14)	P
Edad donante	61.9 (7.1)	64.1 (6.2)	63.7 (9.1)	58.4 (10.4)	0.03
Edad receptor	56.5 (13.5)	54.1 (10.7)	60.4 (9.5)	54.6 (11.6)	0.05
Puntuación	6.07 (2.06)	5.3 (2.2)	5.6 (2.5)	4.1 (1.6)	0.03
Isquemia fría	17.9 (3.7)	18.05 (3.5)	18.8 (4.4)	18.3 (3.4)	0.79
Incompatibilidades	3.7 (1.1)	2.9 (0.9)	3.6 (0.9)	3.2 (1.1)	0.008
Tratamiento con CSA	6 (43%)	19 (45.2)	9 (22%)	5 (35.7%)	0.15
Tratamiento con MMF	9 (64.3%)	40 (95.2)	38 (92.7)	14 (100)	0.002
NTA	13 (92.9%)	29 (69%)	36 (87.8%)	11 (78.6%)	0.10
Función retardada del injerto	14 (100%)	26 (63.4%)	33 (80.5%)	10 (71.4%)	0.03
Día diuresis eficaz	11.15 (1-20)	7.05 (1-24)	6.39 (1-34)	10.1 (1-24)	0.09
Cr. al alta	2.7 (1.4)	2.6 (1.5)	2.1 (0.8)	2.5 (0.8)	0.30
HD	11 (78.6%)	20 (48.8%)	15 (36.6%)	7 (50%)	0.06
Nº HD	3.6 (3-15)	2.4 (0-24)	1.4 (0-13)	2.6 (0-9)	0.26
Estancia hospitalaria	23.7 (9-54)	24 (8-99)	18 (8-47)	19.7 (8-35)	0.13
CCG 1 mes	36.3 (16.6)	38.9 (16.6)	46.5 (16.2)	35.6 (8.06)	0.04
CCG al año	46.1 (16.4)	47.6 (14.5)	56.4 (19.7)	54.4 (13.2)	0.08

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1 FACTORES QUE DETERMINAN LA APARICIÓN DE NTA Y FUNCIÓN RETARDADA DEL INJERTO

La necrosis tubular aguda y la isquemia fría son dos fenómenos frecuentes que afectan a los receptores renales en el periodo inmediato postrasplante y son más frecuentes en los donantes ECD.¹⁵⁴ La FRI es un tipo de insuficiencia renal aguda postrasplante que resulta en oliguria y puede afectar hasta el 50% de los trasplantes renales. El impacto a largo plazo sobre la supervivencia del injerto es controvertido en la actualidad.^{155,156,157}

El sustrato histopatológico de la FRI del injerto se ha considerado que es la NTA. Diversas características del donante en muerte encefálica y del mantenimiento en las unidades de cuidados intensivos pueden tener un impacto significativo sobre el desarrollo de FRI¹⁵⁸. La isquemia fría, edad del donante y la puntuación de la biopsia son los factores relacionados con la FRI en nuestro estudio.

En nuestro estudio una puntuación elevada de la biopsia preimplante influye en el desarrollo de FRI, lo que indica que las lesiones crónicas presentes en el donante determinan una peor recuperación del injerto a la lesión por isquemia-reperfusión en el periodo postoperatorio inmediato. La relación entre la puntuación de la biopsia y la presencia de función retardada del injerto ya fue descrita por Chiurchui et al.¹⁵⁹ En un estudio preliminar en el año 2011. La puntuación de la biopsia aparece en nuestro estudio como un factor determinante de la evolución en el primer año postrasplante y está relacionado con el CICG al año. Estos hallazgos son compatibles con nuestra experiencia clínica en la que los pacientes de Edad avanzada y con datos clínicos de lesión renal (ya sea DM, HTA o insuficiencia

renal constatada) presenta una recuperación más lenta tras la insuficiencia renal aguda.^{160,161}

Tanto la edad del donante como la edad del receptor han sido ampliamente descritos como factores de riesgo del desarrollo de FRI.¹⁶² En nuestra cohorte de pacientes el aumento del tiempo de isquemia fría aumenta un 15% el riesgo de sufrir FRI por cada hora.

Diferentes publicaciones han relacionado el desarrollo de FRI con el trasplante con donantes ECD.¹⁶³ En el análisis univariante la variable donante ECD aparece como un factor de riesgo para el desarrollo de FRI, esta significación desaparece en el análisis multivariado, donde la edad del donante, la puntuación de la biopsia y el tiempo de isquemia aparecen como variables confundentes. En nuestra opinión el concepto de donante ECD clásico debe abandonarse, ya que son características innatas de los injertos procedentes de donantes mayores de 50 años (que en la actualidad constituyen en torno al 80% de las donaciones en España) como el mayor tiempo de isquemia fría, la edad y la presencia de lesiones crónicas en el injerto las que condicionan el desarrollo de FRI y no el clásico concepto de donante con criterios expandidos según los criterios UNOS. Debido al cambio de perfil en la donación una selección adecuada de los donantes con modelos predictivos como los existentes o el que se describirá en apartados posteriores de esta Tesis Doctoral y la valoración de la biopsia preimplante son las herramientas adecuadas de selección de donantes en España en el momento actual. El pool de injertos procedentes de donantes ECD es un grupo de alto riesgo de desarrollo de FRI, al sumar edades avanzadas del donante y receptor, así como puntuaciones elevadas en la biopsia y tiempo de isquemia prolongados, por lo que es necesario optimizar

al máximo el proceso de donación y trasplante en este grupo de pacientes minimizando el tiempo de isquemia fría.

3.4.2 ¿PODEMOS SELECCIONAR SEGÚN VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS A LOS DONANTES POTENCIALES? MODELO ANDALUZ DE SELECCIÓN DE DONANTES.

En el momento actual la valoración del donante potencial renal se realiza según variables clínicas y analíticas entre las que se incluyen la función renal valorada mediante aclaramiento de creatinina calculado mediante la fórmula de Cockcroft-Gault, presencia de proteinuria en orina, edad del donante, causa de la muerte y antecedentes del donante que aumenten el riesgo de rechazo crónico FI/AT, fundamentalmente la hipertensión y diabetes mellitus.

Los criterios UNOS¹⁶⁴ identifican a los donantes con criterios expandidos y establecen la indicación de biopsia preimplante en un grupo específico de pacientes, pero solamente contemplan tres factores de riesgo. Utilizando estos criterios el porcentaje de donaciones fallidas (riñones descartados por presencia de lesiones histopatológicas en la biopsia preimplante) se sitúa entorno al 24% en el año 2010¹⁶⁵ en el territorio español. En nuestra serie el porcentaje de riñones no aptos para trasplante por las lesiones histopatológicas fue del 28%.

Existen modelos predictivos que están destinados a valorar la funcionalidad y supervivencia del injerto utilizando datos del donante y del receptor^{166,167,168}. Estos scores aportan información permitiendo elegir al receptor idóneo y destinando los órganos a trasplante simple o birrenal, Pero no están destinados a predecir la viabilidad final del órgano por biopsia.

En nuestra revisión bibliográfica no hemos encontrado un modelo que permita predecir la validez de un potencial donante renal en función de características clínicas y analíticas, permitiendo a los coordinadores de trasplantes disminuir el porcentaje de donantes ECD fallidos y de órganos desechados. Del mismo modo permitiría una selección adecuada de los donantes mayores de 70 años que en el futuro constituirán una fuente importante de injertos renales.

Nuestro grupo ha demostrado la validez de la biopsia renal para identificar la presencia de lesiones histopatológicas que condicionan una peor evolución de los receptores.¹⁶⁹ Sin embargo, la extracción y valoración de los injertos renales supone un importante consumo de recursos sanitarios tanto económicos como personales implicando a una gran cantidad de profesionales: enfermería, auxiliares de enfermería, urólogos, intensivistas, anatomopatólogos y un reto continuado para los coordinadores de trasplantes que deben seleccionar a los candidatos idóneos para la donación renal en un grupo de pacientes que presentan factores de riesgo para nefropatía del injerto.

Utilizando como “*Gold standard*” la validez renal por biopsia preimplante hemos desarrollado un modelo que permite clasificar correctamente entorno al 80% de los donantes. Además este modelo permitiría hacer una adecuada valoración de los donantes renales de edad superior a 75 años que habitualmente se desechan por criterios clínicos. Este modelo incluye:

1. Parámetros de función renal: cifra de urea del donante a la extracción.
2. Parámetros clínicos: sexo, presencia de aterosclerosis clínicamente demostrada (definida antecedentes de como cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular isquémica o hemorrágica e isquemia crónica de miembros inferiores).

3. Parámetros de mantenimiento del donante: uso de drogas vasoactivas y estancia en UCI.

Los parámetros usados habitualmente para la valoración de la función renal del donante incluyen creatinina sérica y aclaramiento de creatinina. Los criterios UNOS¹⁶⁷ consideran a la creatinina sérica como uno de los parámetros y se encuentra presente en los diferentes modelos de selección de donantes con criterios expandidos.¹⁷⁰ Pero sigue existiendo controversia sobre que fórmula de estimación de aclaramiento de creatinina debe utilizarse para valorar la función del injerto renal. La fórmula de Cockcroft-Gault se utiliza de forma generalizada para la valoración de la función renal del donante en muerte encefálica. En nuestra revisión bibliográfica no hemos encontrado estudios dirigidos a determinar la mejor forma de estimar el aclaramiento de creatinina en donantes procedentes de muerte encefálica. Existen experiencias en este sentido en trasplante renal de vivo.^{171,172} Utilizando como "Gold standad" el aclaramiento medido con creatinina marcada con radioisótopos, tanto la fórmula MRD como Cockcroft-Gault tienen una alta variabilidad en la estimación del aclaramiento, esta variabilidad es más evidente para cifras de aclaramiento de 60 mL/min en los que esta variabilidad puede llegar a los 8 mL/min/1.73 m². La fórmula MDRD fue diseñada para una población de edad media y un aclaramiento medio de 40 mL/min/1.73 m², esta fórmula tiene a infraestimar en aclaramiento en donantes con aclaramientos normales o cercanos. La fórmula de Cockcroft- Gault fue desarrollado con una cohorte de pacientes con aclaramientos entre 30 y 130 mL/min, de forma sistemática sobreestima el aclaramiento debido a la secreción tubular de creatinina.¹⁷³

En nuestro estudio el CICG tiene una relación estadísticamente significativa tanto con la validez renal medida por biopsia preimplante y el aclaramiento del receptor a

los 30 días en el análisis multivariante. Según estos resultados la fórmula de Cockcroft-Gault es la mejor fórmula para estimar el aclaramiento de creatinina en el potencial donante renal en muerte encefálica y tiene aplicabilidad clínica.

En nuestro estudio hemos realizado curvas ROC con tres modelos diferentes de valoración incluyendo a la creatinina sérica, CICG y urea sérica como parámetros de valoración de la función renal del donante renal potencial. El modelo que presenta mejor AUC (0.72) es el que incluye a la cifra de urea sérica como parámetro de funcionalidad renal. La cifra de urea sérica es un marcador inespecífico de insuficiencia renal que puede variar ampliamente en función de la dieta, la presencia de hemorragia, traumatismos o tratamiento con corticoides.¹⁷⁴ El aclaramiento de urea se ha utilizado de forma complementaria al aclaramiento de creatinina en pacientes con insuficiencia renal crónica y aclaramiento por debajo de 15 mLmin para determinar el momento idóneo de inicio de la diálisis.¹⁷⁵ La cohorte de pacientes potencialmente donantes renales es un grupo seleccionado en el que se controlan otras circunstancias que influirían en la cifra urea sérica y son pacientes en situación hipercatabólica, por lo que esta determinación puede constituir un marcador más precoz de insuficiencia renal.

El sexo femenino es un factor que favorece la validez del injerto renal. Diversos estudios españoles han demostrado la mayor prevalencia de nefroesclerosis,¹⁷⁶ así como un perfil de riesgo cardiovascular más elevado y a edades más tempranas¹⁷⁷ en el hombre con respecto a la mujer. Estos hallazgos explican la mayor validez de los injertos procedentes de mujeres en el grupo ECD donde los donantes son cada vez más longevos.

La presencia de aterosclerosis sistémica aterosclerótica en el donante se ha considerado como factor de riesgo para fallo del injerto,¹⁷⁸ pero no ha sido

introducida en los diferentes scores predictivos de función del injerto. En nuestra sería la evidencia de patología aterosclerótica previa definida como antecedentes de Ictus isquémico o hemorrágico, cardiopatía isquémica o isquemia crónica de miembros inferiores, se asocia con un aumento del riesgo de presentar una puntuación elevada en la biopsia (OR 3.98). Este aumento de riesgo de “riñón no válido” puede ser explicado por la presencia de nefropatía vascular en el grupo de pacientes con antecedentes de aterosclerosis.¹⁷⁹ El término nefrosclerosis se utiliza para referirse a la enfermedad renal que puede aparecer como complicación de la HTA esencial y que afecta fundamentalmente a la vascular preglomerular. Es la expresión renal de una enfermedad sistémica que afecta a otros territorios vasculares como la cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y arteriopatía periférica. La presencia de HTA en el donante en nuestro estudio no constituye un factor que influya en la validez renal. La incidencia de HTA en nuestra cohorte de donantes ECD es casi del 50%, lo que constituye una expresión del cambio del perfil del donante en muerte encefálica. La presencia de antecedentes de HTA con repercusión sistémica constituye un marcador más específico de HTA con repercusión sistémica y alto prevalencia de nefrosclerosis, lo que se ha comprobado en una cohorte de pacientes HTA.¹⁸⁰

La estancia en UCI es una variable que se ha asociado con mal pronóstico postrasplante inmediato y fue introducida como variable de interés en el UK donor index.¹⁸¹

El tratamiento con drogas vasoactivas es muy frecuente en el mantenimiento del paciente potencialmente donantes de órganos. En esta tesis doctoral hemos demostrado que el tratamiento con drogas vasoactivas no tiene influencia sobre la evolución del injerto a corto y medio plazo. En un estudio realizado en una UCI

española el 86% de los donantes precisaron de soporte vasoactivo durante su estancia en UCI.¹⁸² El uso de drogas vasoactivas está relacionado con la vasoplejia secundaria al proceso de muerte encefálica, esta respuesta puede estar más comprometida en el grupo de pacientes con una reserva cardiovascular limitada que incluiría a pacientes de mayor edad, diabéticos, con disfunción ventricular, HTA con repercusión sistémica que a priori serían los pacientes con menores posibilidades de viabilidad renal.

3.4.3 SUPERVIVENCIA DEL INJERTO RENAL PROCEDENTE DE DONANTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS

La utilización de donantes ECD se ha asociado con una disminución de la supervivencia del injerto. El planteamiento de nuestro grupo es optimizar la selección de los donantes idóneos dentro del pool de donantes con criterios expandidos, no sólo mediante criterios clínicos, sino mediante la realización de biopsia preimplante que permite desestimar a aquellos injertos con lesiones crónicas que tendrían una menor supervivencia del injerto.

Cuando comparamos las curvas de Kaplan-Meier de nuestro estudio observamos que la supervivencia de los injertos procedentes de donantes ECD es inferior a la del grupo control (log Rank 0.03). Esta diferencia de supervivencia no desaparece en el análisis por regresión de Cox introduciendo la isquemia fría, incompatibilidades en el sistema HLA y la edad del receptor como covariables. El tiempo de isquemia fría como ya se ha discutido ampliamente en apartados previos, se ha demostrado como un factor determinante en la evolución a largo plazo del injerto. El TIF fue 16.8 horas en el grupo control frente a 18.3 horas para

el grupo ECD, esto fue debido a la realización de biopsia preimplante que demora el implante en unas 3 horas.

La edad del receptor es otro factor que se relaciona con la supervivencia del injerto.^{183, 184, 185} En nuestro estudio la media de edad de los receptores es de 39.8 para el grupo control frente a 56.8 para el grupo ECD ($p < 0.01$).

El principal determinante de la diferencia de supervivencia del injerto no es el tipo de donante ECD vs SCD, sino la edad del donante (HR 1.01 $p = 0.07$). Al ajustar el análisis de supervivencia mediante regresión de Cox en rangos de edad se observa que la diferencia en la supervivencia se establece entre los receptores de injertos procedentes de donantes menores de 50 años y el resto de grupos. En el grupo de receptores de injertos ECD la supervivencia es similar para los grupos de edad de 50 a 60 años, de 60 a 70 años y mayores de 70 años.

Nuestros resultados contrastan con los de otras publicaciones. En el estudio de Chiurchiu et al.,¹⁸⁶ el tipo de donante es el principal determinante de la supervivencia, aunque encuentra supervivencias inferiores a las descritas por nuestro grupo. Este estudio presenta importantes limitaciones: primero se trata de un estudio retrospectivo en el que los donantes se clasificaron después del trasplante según los hallazgos clínicos y de la biopsia con un 20% de disfunción primaria del injerto y una puntuación de la biopsia muy elevada lo que indica una mala selección de los donantes. Además los tiempos de isquemia son muy elevados, el 41% de los trasplantes presentó un tiempo de isquemia fría superior a 24 horas.

La edad es un factor determinante en la supervivencia a largo plazo del injerto debido a la pérdida nefronal ligada a la edad. Sin embargo los riñones procedentes de donante ECD pueden tener un potencial importante teniendo en cuenta que

más del 70% de los donantes españoles en el año 2010 estuvieron en el rango de edad entre 45 y 70 años. La cohorte de donantes EDC seleccionados presenta una menor supervivencia del injerto frente al grupo de donantes estándar, si bien no existen diferencia entre los diferentes grupos de edad a partir de los 50 años y la supervivencia media es superior al 80% a los 5 años y al 60% a los diez años. En un reciente análisis retrospectivo¹⁸⁷ de 362 trasplantes con injertos renales procedentes de donantes ECD la supervivencia de los injertos renales procedentes de donantes extremadamente añosos (>70 años) es similar a la del grupo de donantes entre 50 y 69 años. Olaverri et al.,¹⁸⁸ obtienen similares resultados en una cohorte de pacientes con biopsia preimplante, la supervivencia de los injertos es similar para la cohorte superior e inferior a 65 años.

Estos resultados pueden parecer discordantes con el clásico estudio de Remuzzi et al.,¹⁸⁹ en el que la supervivencia del injerto de una cohorte de pacientes mayores de 60 años y evaluados con biopsia preimplante era similar a los injertos procedentes de donantes menores de 60 años. La media de edad de los donantes del grupo control en este estudio fue de 49.9 años con desviación típica de 9 años, 10 años superior a la de nuestro grupo control. De hecho en nuestro estudio al estratificar la supervivencia por grupos los donantes del rango edad entre 50 y 60 años tuvieron una supervivencia del injerto similar a los donantes de mayor edad.

De este modo podemos concluir que el trasplante de injertos procedentes de donantes con criterios expandidos seleccionados por biopsia preimplante es una técnica eficiente con supervivencias en torno al 80% a los 5 años y por encima del 50% a los 10 años.

3.4.4 EXPRESIÓN DE PARP1 A NIVEL DEL INJERTO RENAL.

La PARP1 es una enzima nuclear implicada en la reparación celular. Su sobreexpresión en situaciones que conducen a lesión por isquemia reperusión y la protección que los inhibidores de la PARP1 frente a este tipo de lesión la señalan como un mediador importante que podrían intervenir en la lesión renal por isquemia-reperusión desencadenada por la muerte encefálica. La parada cardíaca produce directamente isquemia renal por cese del flujo sanguíneo renal. Esta fase de isquemia viene seguida de una fase de reperusión corporal generalizada conocida como síndrome posPCR y que desencadena un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).¹⁹⁰

En nuestra serie, el grupo de pacientes que fallecen debido a encefalopatía postanóxica tras una parada cardíaca (PCR) presentan mayor expresión de PARP1 en el injerto renal, estos hallazgos son más evidentes a nivel tubular (OR 9.9, IC al 95% 1.3-72.4). Esta relación se ha reproducido en un modelo animal de isquemia renal mediante ligadura de la arteria renal en ratones con y sin capacidad de expresión de PARP1 (*Parp1 knockout*) durante 37 minutos. En los cortes histológicos los ratones salvajes presentaron mayor necrosis, obstrucción tubular y descamación celular a nivel tubular. Los ratones *Parp1 knockout* presentaron una recuperación histológica y funcional más rápida, así como menor inflamación y depleción de ATP a nivel histológico.¹⁹¹

La hipoxia resultante de la interrupción del flujo sanguíneo produce alteraciones del metabolismo celular con aparición de radicales libres y productos derivados del nitrógeno.^{192,193} La lesión del DNA por estos productos produce sobreexpresión de PARP y conduce a la apoptosis celular.¹⁹⁴

La inhibición genética o farmacológica de la expresión de PARP1 ejerce un factor protector de la lesión renal por isquemia-reperfusión a nivel funcional e histopatológico.^{195,196}

El mecanismo por el que la sobreexpresión de PARP1 produce muerte apoptosis no está totalmente aclarado. La sobreactivación de PARP1 conduce a una depleción total del ATP intracelular y una situación de colapso energético, si bien este único mecanismo puede no ser letal para la célula.^{197,198} Un modelo experimental de lesión celular ha permitido demostrar la inhibición de la glicolisis anaerobia mediante inhibición directa por ribosilación mediante la PARP1 de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), impidiendo la regeneración del ATP intracelular en las células tubulares renales.¹⁹⁹ Los niveles de ATP de las células PARP negativas fueron superiores a las nativas. La actividad de GAPDH permanece inhibida hasta 12 horas después del insulto isquémico.

Nuestro grupo ha reproducido estos resultados en un modelo animal de ratones con actividad PARP1 inhibida genética y farmacológica.²⁰⁰ El modelo de isquemia renal se reprodujo mediante clampaje durante 45 minutos del pedículo vascular completo, sirviendo como control el riñón contralateral. Los ratones fueron sacrificados a la 6 y 48 horas tras la reperusión. Los ratones *Parp1 knockout* no presentaron expresión de PARP1 tras la isquemia renal. Los ratones con inhibición farmacológica de la *Parp1* presentaron menor expresión de PARP1 y una actividad reducida de la misma (publicación D de esta Tesis Doctoral).

El otro factor relacionado con la expresión de PARP1 en el injerto renal es la necesidad de soporte vasoactivo combinado con Dopamina y Noradrenalina. El uso de drogas vasoactivas es una práctica habitual en el tratamiento del paciente potencialmente donante de órganos para combatir la vasoplejia inducida por la

muerte encefálica y el SRIS posterior.²⁰¹ Del mismo modo la liberación de citocinas produce disfunción miocárdica.²⁰² Los pacientes que recibieron tratamiento con DOPA y NORA precisaron dosis mayores de NORA (0.3 vs 1.4 ug/Kg/h, $p < 0.001$). El uso combinado de los dos vasoactivos identifica a un grupo con mayor respuesta vasopléjica debida un SRIS que condiciona mayor lesión por isquemia-reperfusión a nivel renal y sobreexpresión de PARP1.

3.4.5 INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE PARP1 SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO RENAL.

Nuestro grupo ha demostrado la influencia de la expresión de PARP1 en biopsias de receptores con NTA, función retardada del injerto y rechazo agudo en dos estudios previos^{203,204} comparados con respecto a controles procedentes de donantes con biopsia preimplante. Del mismo modo en un estudio preliminar encontramos relación entre la expresión de PARP1 y la evolución inmediata postranplante. Valores inferiores de PARP1 están relacionados con el día de diuresis eficaz, los niveles de creatinina sérica a los tres meses y la capacidad del injerto de alcanzar una creatinina por debajo de 1.7 mg/dL.²⁰⁵

Con estos resultados planteamos un estudio de cohortes con la hipótesis de que la expresión de PARP1 en biopsias preimplante de donantes ECD influye en la evolución posterior del receptor.

En nuestro estudio la expresión PARP1t en biopsias preimplante no predice peor evolución inmediata postrasplante en el análisis multivariante mediante regresión múltiple. Los factores asociados con peor evolución postquirúrgica son el tratamiento con CSA, la puntuación KDI, la edad del donante y la edad del receptor. La principal limitación de nuestro estudio es el tamaño muestral a pesar

de que se ha remontado el seguimiento a más de 10 años. De los 220 injertos valorados y debido al alto porcentaje de descarte renal y la imposibilidad de localizar algunos receptores solamente 98 biopsias pudieron ser incluidas en el análisis, de ellas solamente 30 expresaban PARP1t lo que ha hecho necesario dicotomizar la variable para el análisis como expresión de PARP1t ausente y presente. Además las muestras son heterogéneas con respecto a diferentes características.

Si bien cierto que el tamaño muestral ha podido condicionar los resultados del presente estudio, la expresión de PARP1t no es un factor determinante de mala evolución del injerto renal. Otros factores como el tratamiento con CSA, la puntuación KDI y las edades de donante y receptor aparecen como factores de primer nivel.

El tratamiento con CSA ha sido el estándar de tratamiento para el trasplante renal desde su introducción en 1983. La nefrotoxicidad de la ciclosporina a largo plazo está ampliamente demostrada²⁰⁶ tanto en receptores de trasplante renal como en receptores de otros órganos sólidos.²⁰⁷ Existen regímenes alternativos para la inducción de inmunosupresión en el paciente transplantado con injertos procedentes de donantes ECD aunque la bibliografía muestra resultados discordantes.²⁰⁸ En nuestro estudio el tratamiento con inducción con ciclosporina empeora la lesión por isquemia-reperfusión postrasplante condicionando una diuresis eficaz más tardía, mayor número de sesiones de hemodiálisis, mayor estancia hospitalaria, mayores niveles de creatinina sérica al alta y menor aclaramiento a los tres meses.

3.4.6 TRATAMIENTO CON DROGAS VASOACTIVAS y FUNCIÓN INICIAL DEL INJERTO RENAL.

El tratamiento con catecolaminas forma parte del soporte habitual del paciente potencialmente donante de órganos para combatir la vasoplejia inducida por la muerte encefálica. Aunque son fármacos ampliamente utilizados en las unidades de cuidados intensivos, la evidencia actual con el uso de estos fármacos es dispersa y los estudios heterogéneos. Los datos obtenidos del registro Eurotrasplant muestran a la Dopamina a cualquier dosis como un factor protector del injerto renal, aumentando la supervivencia del injerto a los 4 años (HR 0.85 IC 95% 0.74-0.98).²⁰⁹ El uso de dopamina en pacientes con disfunción sistólica e insuficiencia cardíaca ha demostrado aumento de la perfusión renal y del filtrado glomerular disminuyendo la incidencia de insuficiencia renal aguda²¹⁰. Sin embargo existen diferentes meta-análisis²¹¹ y ensayos clínicos no demuestran que el uso de dopamina a bajas dosis sirva para prevenir²¹² o tratar²¹³ la insuficiencia renal aguda precoz.

En el ensayo clínico de Schunelle et al.,²⁰⁴ el uso de dopamina profiláctica en 264 donantes en muerte encefálica a una dosis de 4 ug/Kg/h redujo de forma significativa la necesidad de diálisis múltiple. Estos datos contrastan con recientes publicaciones en los que el tratamiento con dopamina como fármaco de primera elección en los pacientes con shock de diferente origen (séptico, cardiogénico, hipovolémico, anafiláctico, etc.) mostraron una mortalidad superior, aunque sin significación estadística (OR 1.17 IC al 95% 0.97-1.42), y un aumento de los eventos cardiovasculares.^{214,215}

Nuestro estudio no está diseñado para valorar el uso de dopamina a dosis baja (dosis renal) en la profilaxis de la lesión por isquemia-reperfusión ni para mitigar el

efecto de la isquemia fría. La dosis media de dopamina en nuestro estudio fue de 8.54 ug/Kg/min (dt 4.26). El número de pacientes que recibieron tratamiento con dopamina a dosis baja no es suficiente para poder extraer conclusiones a este respecto (n=16, 7.2%). La dosis media de noradrenalina en nuestros pacientes fue de 0.56 ug/Kg/min que es 5 veces superior a la utilizada en el citado estudio en el que sólo se incluyeron pacientes estables hemodinámicamente o con soporte con noradrenalina a dosis baja.

Nuestro resultados no contradicen a los trabajos de Schunuelle et al.,²⁰⁴ en el momento actual no podemos afirmar que el uso de Dopamina o Noradrenalina en el tratamiento de soporte del paciente potencialmente donante de órganos condicione mejor evolución postrasplante midiendo numerosos parámetros de función renal que incluyen la necesidad de hemodiálisis, número de sesiones, tiempo de recuperación de diuresis, función renal, etc...

El principal determinante de la necesidad de diálisis en nuestro estudio es la edad del receptor. La edad avanzada del donante y del receptor se han relacionado con la aparición función retardada del injerto^{216,217,218} en numerosas publicaciones. En nuestro estudio que se ha realizado sobre una cohorte de donantes con criterios expandidos, es la edad del receptor y no la del donante la que condiciona la necesidad de hemodiálisis en el periodo inmediato postrasplante. Este resultado es acorde con el contenido de esta tesis doctoral (ver apartados 3.4 y 4.3) de esta tesis doctoral en el que la edad del donante es un factor determinante en la supervivencia y evolución inmediata cuando comparamos lo grupos ECD y SCD. En donantes mayores de 50 años la presencia de otros factores de riesgo de nefroesclerosis y la puntuación de la biopsia son los determinantes de la supervivencia del injerto. Estos resultados ya han sido reseñados en la bibliografía.

La práctica habitual de seleccionar a los receptores según su edad para recibir un trasplante procedente de donantes ECD puede explicar la relación entre la edad del receptor y la diálisis, pues los receptores de mayor edad presentan con mayor frecuencia historia de enfermedad vascular y mayor frecuencia de eventos vasculares trasplante.²¹⁹

4. CONCLUSIONES

A. RELATIVAS AL COMPENDIO DE TRABAJOS PUBLICADOS:

1. La PARP1 está implicada en la lesión renal por isquemia-reperfusión y tiene un papel determinante en el desarrollo de NTA y FRI, así como en la eventual recuperación de la función en el período inmediato postrasplante.
2. La determinación de PARP1 en las biopsias renales puede identificar a los pacientes de alto riesgo de sufrir función retardada del injerto.
3. La administración de inhibidores farmacológicos de la expresión de PARP1 aparece como una opción terapéutica para reducir la lesión por isquemia-reperfusión y mejorar la función renal postrasplante.

B. RELATIVAS AL TRABAJO CLÍNICO DE INVESTIGACIÓN AÚN NO PUBLICADO:

1. El trasplante de injertos renales de nuestra serie de donantes con criterios expandidos (ECD) presenta mayor incidencia de eventos desfavorables en el periodo inmediato post-trasplante y menor supervivencia a largo plazo en comparación con la cohorte estándar de donantes. Debido al aumento progresivo de la lista de espera y al cambio en el perfil del donante y el receptor así como la supervivencia de nuestra cohorte de pacientes ECD, este tipo de trasplante es una es una

técnica adecuada para mejorar la supervivencia de los pacientes con insuficiencia renal crónica como ya se ha demostrado en la bibliografía nacional e internacional.

2. En nuestra serie de casos el modelo empleado para la valoración clínica y anatomopatológica de los donantes ECD presenta una validez adecuada, de manera que su generalización podría disminuir hasta en 8% el porcentaje de donantes fallidos.
3. El score KDI (Kidney donor index) ha sido útil en nuestra cohorte de pacientes ECD para la selección de los receptores idóneos.
4. La fórmula de cálculo de aclaramiento de creatinina de Crockft-Gault es la que mejor se comporta para la selección de potenciales donantes en el análisis uni- y multivariado de nuestra serie en comparación con la fórmula MDRD.
5. En este trabajo se corrobora que la biopsia renal preimplante es una herramienta indispensable para la selección de donantes ECD. La selección de injertos renales según sus lesiones histológicas ha permitido a nuestra serie alcanzar supervivencias similares en los receptores en los diferentes rangos de edad (50-60, 60-70 y mayores de 70 años) reproduciendo los resultados de importantes estudios internacionales. Del mismo modo la puntuación de la biopsia identifica a

los injertos con mayor riesgo de función retardada del injerto y menor aclaramiento al mes post-trasplante

6. Los principales factores que condicionan la aparición de NTA y fracaso renal del injerto en el período post-trasplante inmediato en la cohorte de pacientes ECD son la edad del donante, el tiempo de isquemia fría y la puntuación total de la biopsia.

7. La expresión de PARP1 a nivel tubular está relacionada con la lesión renal por isquemia-reperfusión desencadenada tras la PCR y la muerte encefálica. No hemos conseguido relacionar la expresión de PARP1 con la evolución inmediata post-trasplante. Los factores que condicionan la evolución inmediata y durante el primer año del receptor ha sido la edad del donante y del receptor, la puntuación de la biopsia y el tratamiento de inducción con CSA.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ Ludwig A, Behnke B, Holtlund J, Hilz H. Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes. *J Biol Chem.* 1988; 263: 6993–6999.
- ² Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(3):375-429.
- ³ Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci.* 2008; 13:3046–3082
- ⁴ Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly (ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13: 411-424.
- ⁵ de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:7303-7307.
- ⁶ Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 1997; 11: 2347-2358.
- ⁷ Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. DNA repair defect in poly (ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:2644-2649.
- ⁸ Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem.* 1998; 273: 33533-33539.
- ⁹ Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral. ischemia. *Nat Med.* 1997; 3:1089-1095.
- ¹⁰ Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med.* 1999; 5:314-319.
- ¹¹ Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Texeira AC, Cappi SD et al. Potential role of poly (adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase activation in pathogenesis of

myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34 (4): 1073-1079.

¹² Lobo SM, Orrico SR, Queiroz MM, Cunrath GS, Chibeni GS. Penumonia-induced sepsis and gut injury: effects of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor. *J Surg Res.* 2005; 129 (2): 292-297.

¹³ Evgenov OV, Liaudet L. Role of nitrosative stress and activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular failure associated with septic and hemorrhagic shock. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; 3(3): 239-239.

¹⁴ Laudisi F, Sambucci M, Pioli C. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) as immune mediator. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2011; 11(4): 326-333.

¹⁵ d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, Massa S, Liu J, Swanson RA. Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 31.

¹⁶ Allende-Castro C, Espina-Marchant P, Bustamante D, Rojas-Mancilla E, Neira T, Gutierrez-Hernandez MA et al. Further Studies on the Hypothesis of PARP1 Inhibition as a Strategy for Lessening the Long-Term Effects Produced by Perinatal Asphyxia: Effects of Nicotinamide and Theophylline on PARP1 Activity in Brain and Peripheral Tissue : Nicotinamide and Theophylline on PARP1 Activity. *Neurotox Res.* 2012; 22(1):79-90.

¹⁷ Gebhard C, Stähli BE, Shi Y, Camici GG, Akhmedov A, Hoegger L et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects from oxidative stress induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 414(4): 641-646. .

¹⁸ Giannone PJ, Alcamo AA, Schanbacher BL, Nankervis CA, Besner GE, Bauer JA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: a novel therapeutic target in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2011; 70(1): 67-71.

¹⁹ Yamazaki K, Tanaka S, Sakata R, Miwa S, Oriyanhan W, Takaba K et al. Protective effect of cardioplegia with poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vitro study of isolated rat heart model. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013; 28(1): 143-147.

²⁰ Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 1997; 29: 465-477.

²¹ Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 281:F948-957.

²² Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah SV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 2010; 16: 535–543.

²³ Gobe G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 1999; 56: 1299-1304.

²⁴ Filipovic DM, Meng X, Reeves WB. Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1999; 277: F428-436.

-
- ²⁵ Martin DR, Lewington AJ, Hammerman MR, Padanilam BJ. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279:R1834-1840.
- ²⁶ Gilad E, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Protection by inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase against oxidant injury in cardiac myoblasts in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29: 2585-2597.
- ²⁷ Gobe G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z: Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56:1299-304.
- ²⁸ Kim J, Long KE, Tang K, Padanilam BJ. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2012;82(2):193-203.
- ²⁹ Kim J, Padanilam BJ. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase 1 attenuates renal fibrosis and inflammation during unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Aug;301(2):F450-9.
- ³⁰ Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55(2):713-23.
- ³¹ Harrison JH, Merrill JP, Murray JE: Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum.* 1956; 6:432.
- ³² Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(11):2135-2141.
- ³³ Tajima A, Ueda D, Hirai M, Morinaga S, Sudoko H, Yamaguchi Y et al. Dialysis versus renal transplantation; a comparative study on medical cost and quality of life in patients with chronic renal failure. *Hinyokika Kyo.* 1987; 33(10):1536-1541.
- ³⁴ Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, Okechukwu CN, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Kaplan B, Port FK. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 589-97.
- ³⁵ Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation and recipients of a first cadaveric transplant. *N Eng J Med.* 1999; 341:1725.
- ³⁶ Tousignant P, Guttman RD, Hollomby DJ. Transplantation and home hemodialysis: their cost-effectiveness. *J Chronic Dis.* 1985; 38(7):589-601.
- ³⁷ Roberts SD, Maxwell DR, Gross TL. Cost-effective care of end-stage renal disease: a billion dollar question. *Ann Intern Med.* 1980; 92: 243-248.
- ³⁸ Memoria de Actividad. ONT 2010. Trasplante renal. Disponible en http://www.ont.es/infesp/Memorias/MemoriaRenal_2010.pdf

-
- ³⁹ Matesanz R, Marazuela R, Domínguez-Gil B, Coll E, Mahillo B, de la Rosa G. The 40 donors per million population plan: an action plan for improvement of organ donation and transplantation in Spain. *Transplant Proc.* 2009; 41(8):3453-3456.
- ⁴⁰ Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transplant.* 2002; 2 (8):701-711.
- ⁴¹ Memoria de Actividad. ONT 2010. Donantes. Disponible en <http://www.ont.es/infesp/Registros/MEMORIA%20RETH%202010.pdf>
- ⁴² Cooper M, Forland CL. The elderly as recipients of living donor kidneys, how old is too old?. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011; 16(2): 250-255.
- ⁴³ P. Eufrásio, P. Moreira, B. Parada, P. Nunes, A. Figueiredo, R. Alves et al. Renal Transplantation in Recipients over 65 Years Old. *Transplant Proc.* 2011; 43: 117–119.
- ⁴⁴ Kaplan C, Paternack B, Shah H, Gallo G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am J Pathol.* 1975; 80: 227-229.
- ⁴⁵ Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: An approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002; 74:1281–1286.
- ⁴⁶ Noppakun K, Cosio FG, Dean PG, Taler SJ, Wauters R, Grande JP. Living donor age and kidney transplant outcomes. *Am J Transplant.* 2011; 11(6):1279-1286.
- ⁴⁷ Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med.* 2006.; 26 (4):343-352.
- ⁴⁸ Gallinat A, Feldkamp T, Schaffer R, Radünz S, Treckmann JW, Minor T et al. Single-center experience with kidney transplantation using deceased donors older than 75 years. *Transplantation.* 2011; 92(1):76-81.
- ⁴⁹ Doyle SE, Matas AJ, Gillingham K, Rosenberg ME. Predicting clinical outcome in the elderly renal transplant recipient. *Kidney Int.* 2000; 57(5):2144-2150.
- ⁵⁰ Milesa CD, Schaubelb DE, Jiab X, Ojo AO, Portc FK, Raoa PS. Mortality Experience in Recipients Undergoing Repeat Transplantation with Expanded Criteria Donor and Non-ECD Deceased-Donor Kidneys. *Am J Transplant.* 2007; 7: 1140–1147.
- ⁵¹ Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY et al. K. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999; 341:1725-1730.
- ⁵² Johnson DW, Herzig K, Purdie D, Brown AM, Rigby RJ, Nicol DL et al. A comparison of the effects of dialysis and renal transplantation on the survival of older uremic patients. *Transplantation.* 2000; 69: 794-799.
- ⁵³ Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. How great is the survival advantage of transplantation over dialysis in elderly patients?. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 945.
- ⁵⁴ Herrero JC, Gutiérrez E, Martínez A, González E, Morales E, Muñoz MA, Valentín M, Bueno B, Praga M, Hernández E, Morales JM, Rodicio JL, Andrés A. Results of kidney

transplantation in recipients over 70 years of age: Experience at a single center. *Transplant Proc.* 2003; 35: 1675-6.

⁵⁵ Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation.* 1995; 60 (4):334-339.

⁵⁶ Karpinski J, Lajoie G, Cattran D, Fenton S, Zaltzman J, Cardella C et al. Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation.* 1999; 67 (8):1162-1167.

⁵⁷ Howie AJ, Ferreira MA, Lipkin GW, Adu D. Measurement of chronic damage in the donor kidney and graft survival. *Transplantation.* 2004; 77 (7):1058-1065.

⁵⁸ Ugarte R, Kraus E, Montgomery RA, Burdick JF, Ratner L, Haas M et al. Excellent outcomes after transplantation of deceased donor kidneys with high terminal creatinine and mild pathologic lesions. *Transplantation.* 2005; 80 (6):794-800.

⁵⁹ Eapen G, Hinduja A, Abraham G, Kuruvilla S, Panicker V, Thirumalai R et al. Does implantation biopsy help in predicting renal allograft management and outcome? *Transplant Proc.* 2000; 32 (7): 1795.

⁶⁰ Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Amiri MH, Vera SR, Gaber AO. Glomerulosclerosis as a determinant of posttransplant function of older donor renal allografts. *Transplantation.* 1995; 60 (4): 334-339.

⁶¹ Randhawa PS, Minervini MI, Lombardero M, Duquesnoy R, Fung J, Shapiro R et al. Biopsy of marginal donor kidneys: correlation of histologic findings with graft dysfunction. *Transplantation.* 2000; 69(7):1352-1357.

⁶² Ciciarelli J, Cho Y, Mateo R, El-Shahawy M, Iwaki Y, Selby R. Renal biopsy donor group: the influence of glomerulosclerosis on transplant outcomes. *Transplant Proc.* 2005; 37 (2): 712-713.

⁶³ Howie AJ, Ferreira MA, Lipkin GW, Adu D. Measurement of chronic damage in the donor kidney and graft survival. *Transplantation.* 2004; 77 (7):1058-1065.

⁶⁴ Serón D, Anaya F, Marcén R, García del Moral R, Vázquez Martul E, Alarcón A et al. Recomendaciones para la indicación, obtención, procesamiento y evaluación de biopsias en el trasplante renal. *Nefrología.* 2008; 28 (4): 385-396

⁶⁵ Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G et al. Dual Kidney Transplant Group. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med.* 2006; 354(4):343-352.

⁶⁶ Munivenkatappa RB, Schweitzer EJ, Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Thom KA, Perencevich EN et al. Maryland aggregate pathology index :a deceased donor kidney biopsy scoring system for predicting graft failure. *Am J Transplant.* 2008 ;8(11):2316-2124.

⁶⁷ Proceso asistencial integrado. Tratamiento sustitutivo de la insuficiencia rena: diálisis y trasplante renal. Disponible en http://www.juntadeandalucia.es/salud/sites/csalud/contenidos/Informacion_General/p_3_p_3_procesos_asistenciales_integrados/listado_procesos?perfil=org

-
- ⁶⁸ Disponible en <http://www.boe.es/boe/dias/2000/01/04/pdfs/A00179-00190.pdf>
- ⁶⁹ Luo Y, Ji X, Ling F, Li W, Zhang F, Cao G, Chen J. Impaired DNA repair via the base-excision repair pathway after focal ischemic brain injury: a protein phosphorylation-dependent mechanism reversed by hypothermic neuroprotection. *Front Biosci.* 2007; 12:1852-62.
- ⁷⁰ Lee JC, Cho GS, Choi BO, Kim HC, Kim WK. Aging exacerbates intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *J Neurotrauma.* 2009;26(9):1567-1576.
- ⁷¹ Powner DJ, Boccalandro C, Alp MS, Vollmer DG. Endocrine failure alter traumatic brain injury in adults. *Neurocrit Care.* 2006; 5:61–70.
- ⁷² Pérez López S, Otero Hernández J, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Alvarez Menéndez F, Astudillo González A. Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28:815-820.
- ⁷³ H. B. Lim, M. Smith. Systemic complications after head injury: a clinical review. *Anaesthesia.* 2007; 62:474-482.
- ⁷⁴ Miñambres E, Cemborain A, Sánchez-Velasco P, Gandarillas M, Díaz-Regañón G, Sánchez-González U et al. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit Care Med.* 2003; 31: 933–938.
- ⁷⁵ Murugan R, Venkataraman R, Wahed AS, Elder M, Hergenroeder G, Carter Met al. Increased plasma interleukin-6 in donors is associated with lower recipient hospital-free survival after cadaveric organ transplantation. *Crit Care Med.* 2008; 36(6):1810-1816.
- ⁷⁶ Rostron AJ, Avlonitis VS, Cork DM, Grenade DS, Kirby JA, Dark JH. Hemodynamic resuscitation with arginine vasopressin reduces lung injury after brain death in the transplant donor. *Transplantation.* 2008 ; 85(4):597-606.
- ⁷⁷ Ruiz Bailén M, Rucabado Aguilar L, López Martínez A. Neurogenic stunned myocardium. *Med Intensiva.* 2006; 30(1):13-18.
- ⁷⁸ Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Brain death induced renal injury *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2011;16:151-156.
- ⁷⁹ Domínguez-Roldán JM, García-Alfaro C, Jiménez-González PI, Hernández-Hazañas F, Gascón Castillo ML, Egea Guerrero JJ. Muerte encefálica: repercusión sobre órganos y tejidos. *Med Intensiva.* 2009; 33:434-441.
- ⁸⁰ Bouma HR, Ploeg RJ, Schuurs TA. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury. *Am J Transplant.* 2009; 9(5):989-997.
- ⁸¹ Van der Hoeven JAB, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, reinout Van Schilfgaarde R et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic instability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int.* 2003; 64:1874-1882.

-
- ⁸² Kusaka M, Kuroyanagi Y, Kowa H, Nagaoka K, Mori T, Yamada K et al. Genomewide expression profiles of rat model renal isografts from brain dead donors. *Transplantation*. 2007; 83:62-70.
- ⁸³ Bouma HR, Ploeg RJ, Schuurs TA. Signal transduction pathways involved in brain death induced renal injury. *Am J Transplant*. 2009 ;9(5):989-997.
- ⁸⁴ Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*. 2006; 27:552–558.
- ⁸⁵ Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Leuvenink HG, van der Heide JJ, van Goor H, Ploeg RJ. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplant Proc*. 2005; 37:367–369.
- ⁸⁶ Cecka JM. The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl*. 2005:1-16.
- ⁸⁷ Harada KM, Mandia-Sampaio EL, de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Park SI, Pinheiro-Machado PG et al. Risk factors associated with graft loss and patient survival after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2009; 41(9):3667-3670.
- ⁸⁸ Westendorp WH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Brain death induced renal injury. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2011; 16:151–156.
- ⁸⁹ D'Alessandro AM, Sollinger HW, Knechtle SJ, Kalayoglu M, Kiskin WA, Uehling DT et al. Living related and unrelated donors for kidney transplantation. A 28-year experience. *Ann Surg*. 1995; 222(3): 353-362.
- ⁹⁰ Taniguchi S, Kitamura S, Kawachi K, Doi Y, Aoyama N. Effects of hormonal supplements on the maintenance of cardiac function in potential donor patients after cerebral death. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992; 6(2):96-101.
- ⁹¹ Dimopoulou I, Tsagarakis S, Anthi A, Milou E, Ilias I, Stavrakaki K et al. High prevalence of decreased cortisol reserve in brain-dead potential organ donors. *Crit Care Med*. 2003; 31(4):1113-1117.
- ⁹² Dimopoulou I, Tsagarakis S, Kouyialis AT, Roussou P, Assithianakis G, Christoforaki et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in critically ill patients with traumatic brain injury: incidence, pathophysiology, and relationship to vasopressor dependence and peripheral interleukin-6 levels. *Crit Care Med*. 2004;32(2):404-408.
- ⁹³ Plurad DS, Talving P, Lam L, Inaba K, Green D, Demetriades D. Early vasopressor use in critical injury is associated with mortality independent from volume status. *J Trauma*. 2011; 71: 656-572.
- ⁹⁴ Del Río F, Escudero D, de la Calle B, Gordo Vidal F. Evaluación y mantenimiento del donante pulmonar. *Med Intensiva*. 2009; 33 (1): 40-49.
- ⁹⁵ Abdelnour T, Rieke S. Relationship of hormonal resuscitation therapy and central venous pressure on increasing organs for transplant. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28(5):480-485.

-
- ⁹⁶ Schnuelle P, Lorenz D, Mueller A, Trede M, Johannes Van der Woude F. Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney Int.* 1999; 56:738-746.
- ⁹⁷ Bellomo R, Wan L, May C. Vasoactive drugs and acute kidney injury. *Crit Care.* 2008; 36(4): S179-S186.
- ⁹⁸ Hoang K, Tan JC, Derby G, Blouch KL, Masek M, Ma I et al. Determinants of glomerular hypofiltration in aging humans. *Kidney Int;* 2003; 64: 1417-1424.
- ⁹⁹ Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin Transplant.* 1997; 11: 366-72.
- ¹⁰⁰ Meier-Kriesche HU, Cibrik DM, Ojo AO, Hanson JA, Magee JC, Rudich SM et al. Interaction between donor and recipient age in determining the risk of chronic renal allograft failure. *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50: 14-17.
- ¹⁰¹ Głyda M, Włodarczyk Z, Czapiewski W. Results of renal transplantation from expanded criteria deceased donors: a single-center experience. *Ann Transplant.* 2012;17(1):35-42.
- ¹⁰² Chavalitdhamrong D, Gill J, Takemoto S, Madhira BR, Cho YW, Shah T, Bunnapradist S. Patient and graft outcomes from deceased kidney donors age 70 years and older: an analysis of the Organ Procurement Transplant Network/United Network of Organ Sharing database. *Transplantation.* 2008;85(11):1573-1579.
- ¹⁰³ Fraser SM, Rajasundaram R, Aldouri A, Farid S, Morris-Stiff G, Baker R et al. Acceptable outcome after kidney transplantation using "expanded criteria donor" grafts. *Transplantation.* 2010; 89(1):88-96.
- ¹⁰⁴ Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA et al. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis.* 2000; 36(1):153-159.
- ¹⁰⁵ Matas AJ, Gillingham K, Payne WD, et al. Should I accept this kidney?. *Clin Transplant.* 2000; 14: 90-95.
- ¹⁰⁶ Pessione F, Cohen S, Durand D, Hourmant M, Kessler M, Legendre C et al. Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation.* 2003; 75(3):361-7.
- ¹⁰⁷ Verran DJ, de Leon C, Chui AK, Chapman JR,. Factors in older cadaveric organ donors impacting on renal allograft outcome. *Clin Transplant.* 2001; 15:1-5.
- ¹⁰⁸ Moore J, Tan K, Cockwell P, Krishnan H, McPake D, Ready A. Predicting renal allograft function using clinical variables. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 2669-2677.
- ¹⁰⁹ Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002; 74(9):1281-1286.
- ¹¹⁰ Sung RS, Christensen LL, Leichtman AB, Greenstein SM, Distant DA, Wynn JJ et al. Determinants of discard of expanded criteria donors kidneys. Impact of biopsy and machine perfusion. *Am J Transplant.* 2008; 8: 783-792.

-
- ¹¹¹ Cabello M, Cobelo C, González Molina M, León G, García E, Gutierrez E et al. Renal transplantation in old recipients from expanded criteria donors selected by kidney biopsy. *Transplant Proc.* 2010; 42:2845-2847.
- ¹¹² Ahmad M, Cole EH, Cardella CJ, Cattran DC, Schiff J, Tinckam AJ et al. Impact of deceased donor diabetes mellitus on kidney transplant outcomes: a propensity score-matched study. *Transplantation* 2009; 88: 251-260.
- ¹¹³ Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002; 74(9):1281-1286.
- ¹¹⁴ Duncan L, Heathcote J, Djurdjev O, Levin A. Screening for renal disease using serum creatinine: who are we missing?. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 1042-1046.
- ¹¹⁵ Swedko PJ, Clark HD, Paramsothy K, Akbari A. Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in elderly patients. *Arch Intern Med.* 2003; 163:356-360.
- ¹¹⁶ Duncan L, Heathcote J, Djurdjev O, Levin A. Screening for renal disease using serum creatinine: who are we missing?. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 1042-1046.
- ¹¹⁷ Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005; 67:2089-2100.
- ¹¹⁸ Gracia S, Montañés R, Bover J, Cases A, Deulofeu R, et al. Documento de consenso: Recomendaciones sobre la utilización de ecuaciones para la estimación del filtrado glomerular en adultos. *Nefrología.* 2006; 26(6): 658-665.
- ¹¹⁹ Grassi G, Abdelkawy H, Barsotti M, Paleologo G, Tregnaghi C, et al. Living kidney transplantation: evaluation of renal function and morphology of potential donors. *Transplant Proc.* 2009; 41:1121-1124.
- ¹²⁰ Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976; 16:31-41.
- ¹²¹ Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002 ; 74(9):1281-1286.
- ¹²² Martínez Esteban D, Jironda Gallegos C, Cabello Diaz M, Frias P, López Jiménez V, Gutierrez de la Fuente C et al. Creatinine clearance and proteinuria as early markers of kidney graft survival. *Transplant Proc.* 2010; 42(8):2880-2882.
- ¹²³ Southard JH, Senzig KA, Belzer FO. Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. *Cryobiology.* 1980;17:148-153.
- ¹²⁴ Koning OH, Ploeg RJ, van Bockel JH, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: A prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. *Eur Multicenter Study Group Transplant.* 1997; 63:1620–1628.

-
- ¹²⁵ Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int.* 2000; 58: 859–866.
- ¹²⁶ Matas AJ. Acute rejection is a major risk factor for chronic rejection. *Transplant Proc.* 1998; 30:1766-1768.
- ¹²⁷ Marcén R, Pascual J, Orofino L, de la Cal MA, Teruel JL, Villafruela JJ et al. The effect of delayed graft function and early graft rejection on renal transplant outcome. *Transplant Proc.* 1998; 30:1776-1777.
- ¹²⁸ Cacciarelli TV, Sumrani N, DiBeneditto A, Hong JH, Sommer BG. The influence of cold ischemia and donor age on renal allograft outcome in the cyclosporine era. *Transplant Proc.* 1992; 24: 2044–2045.
- ¹²⁹ Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997; 63: 968–974.
- ¹³⁰ Kayler LK, Magliocca J, Zendejas I, Srinivas TR, Schold JD. Impact of cold ischemia time on graft survival among ECD transplant recipients: a paired kidney analysis. *Am J Transplant.* 2011;11(12):2647-2656.
- ¹³¹ Moore J, Tan K, Cockwell P, Krishnan H, McPake D, Ready A, Mellor S, Hamsho A, Ball S, Lipkin G, Borrows R. Predicting early renal allograft function using clinical variables. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(9):2669-2677.
- ¹³² Schold JD, Kaplan B, Baliga RS, Meier-Kriesche HU. The broad spectrum of quality in deceased donor kidneys. *Am J Transplant.* 2005; 5: 757-765.
- ¹³³ Nyberg SL, Matas AG, Kremers WK, Thostenson JD, Larson TS, Prieto M et al. Improved scoring system to assess donors from cadaver renal transplantation. *Am J Transplant.* 2003; 3: 715-721.
- ¹³⁴ Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, Andreoni KA, Wolfe RA, Merion RM et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidney: The Kidney Donor Risk Index. *Transplantation.* 2009; 88 (2):231-236.
- ¹³⁵ Watson CJ, Johnson RJ, Birch R, Collet D, Bradley JA. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation.* 2012; 93(3):314-318.
- ¹³⁶ Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly (ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 13:411-424.
- ¹³⁷ Soriano FG, Nogueira AC, Caldini EG, Lins MH, Texeira AC, et al. Potential role of poly (adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase activation in pathogenesis of myocardial contractile dysfunction associated with human septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34 (4): 1073-1079.
- ¹³⁸ Lobo SM, Orrico SR, Queiroz MM, Cunrath GS, Chibeni GS. Penumonia-induced sepsis and gut injury: effects of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor. *J Surg Res.* 2005; 129 (2): 292-297.

-
- ¹³⁹ Evgenov OV, Liaudet L. Role of nitrosative stress and activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular failure associated with septic and hemorrhagic shock. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005; 3(3): 239-239.
- ¹⁴⁰ Laudisi F, Sambucci M, Pioli C. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) as immune mediator. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011; 11(4): 326-333.
- ¹⁴¹ d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM et al. Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation*. 2012 ;9:31.
- ¹⁴² Allende-Castro C, Espina-Marchant P, Bustamante D, Rojas-Mancilla E, Neira T, Gutierrez-Hernandez MA et al. Further Studies on the Hypothesis of PARP1 Inhibition as a Strategy for Lessening the Long-Term Effects Produced by Perinatal Asphyxia: Effects of Nicotinamide and Theophylline on PARP1 Activity in Brain and Peripheral Tissue : Nicotinamide and Theophylline on PARP1 Activity. *Neurotox Res*. 2012; 22(1):79-90.
- ¹⁴³ Gebhard C, Stähli BE, Shi Y, Camici GG, Akhmedov A, Hoegger L et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects from oxidative stress induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414(4):641-646.
- ¹⁴⁴ Giannone PJ, Alcamo AA, Schanbacher BL, Nankervis CA, Besner GE, Bauer JA. *Pediatr Res*. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: a novel therapeutic target in necrotizing enterocolitis. 2011; 70(1):67-71.
- ¹⁴⁵ Yamazaki K, Tanaka S, Sakata R, Miwa S, Oriyhan W, Takaba K et al. Protective effect of cardioplegia with poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vitro study of isolated rat heart model. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2013 28(1):143-147.
- ¹⁴⁶ Kim J, Long KE, Tang K, Padanilam BJ. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2012;82(2):193-203.
- ¹⁴⁷ Kim J, Padanilam BJ. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase 1 attenuates renal fibrosis and inflammation during unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Aug;301(2):F450-459.
- ¹⁴⁸ Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. 2010; 16:535–543.
- ¹⁴⁹ O'Valle F, Del Moral RG, Benítez M del C, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, Aguilar D, et al. Poly[ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation. *PLoS One*. 2009; (9):e7138.
- ¹⁵⁰ O'Valle F, Gómez-Morales M, Del Moral RM, Serón D, Moreso F, Osuna A et al. Poly(ADP-ribose) polymerase expression in kidney transplantation: from alpha (alpha) to Omega (Omega). *Transplant Proc*. 2007; 39(7):2099-2101.
- ¹⁵¹ Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transplant*. 2002; 2 (8): 701-711.

-
- ¹⁵² Serón D, Anaya F, Marcén R, del Moral RG, Martul EV, Alarcón A et al. Recomendaciones para la indicación, obtención, procesamiento y evaluación de biopsias en el trasplante renal. *Nefrología*. 2008; 28 (4): 385-396.
- ¹⁵³ KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Disponible en http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
- ¹⁵⁴ Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004; 364:1814-1827.
- ¹⁵⁵ Giral-Chase M, Hormant M, Cantarovich D. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidney. *Kidney Int*. 1998; 54:972-978.
- ¹⁵⁶ Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int*. 2000; 58:859-866.
- ¹⁵⁷ Butala NM, Reese PP, Doshin MD, Parikh CR. Is delayed graft function associated with long-term outcomes after kidney transplantation? Instrumental variable analysis. *Transplantation* 2013; 95 (8): 1008-1014.
- ¹⁵⁸ Giral M, Bertola JP, Foucher Y, Villers D, Bironneau E, Blanloeil Y et al. Effect of brain dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis. *Transplantation*. 2007; 83(9):1174-1181.
- ¹⁵⁹ Chiurciu C, Riva V, Bürguesser J, de Arteaga J, Douthat W, de la Fuente J et al. Expanded criteria donors, histological scoring, and prolonged cold ischemia: impact on renal graft survival. *Transplantation Proc*. 2011; 43: 3312-3314.
- ¹⁶⁰ Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int* 2012; 82 (5): 516-524.
- ¹⁶¹ Cartin-Ceba R, Kashiouris M, Plataki M, Kor Dj, Gajic O, Casey ET. Risk factors for development of acute kidney injury in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Crit Care Res Pract*. 2012 , Article ID 691313. Doi 10.1155/2012/691013.
- ¹⁶² Van der Vliet JA, Warié MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18: 174-178.
- ¹⁶³ Barba J, Zudaire JJ, Robles JE, Rossel D, Berlan JM, Pascual I. Complications of kidney transplantation with grafts from expanded criteria donors. *World J Urol*. 2013; 31:893-900.
- ¹⁶⁴ Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transplant*. 2002; 2 (8): 701-711.
- ¹⁶⁵ Memoria de Actividad. ONT 2010. Trasplante renal. Disponible en http://www.ont.es/infesp/Memorias/MemoriaRenal_2010.pdf

-
- ¹⁶⁶ Nyberg SL, Matas AJ, Kremers WK, Thostenson JD, Larson TS, Prieto M. Improved scoring system to assess donors from cadaver renal transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3:715-721.
- ¹⁶⁷ Schold JD, Kaplan B, Baliga RS, Meier-Kriesche HU. The broad spectrum of quality in deceased donor kidneys. *Am J Transplant* 2005; 5:757-765.
- ¹⁶⁸ Watson CJ, Johnson RJ, Birch R, Collet D, Bradley JA. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2012; 93(3): 314-318.
- ¹⁶⁹ Moreso F, Seron D, O'Valle F, Ibernón M, Gomà M, Hueso M et al. Immunophenotype of glomerular and interstitial infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies and histological diagnosis. *Am J Transplant*. 2007;7(12):2739-2747.
- ¹⁷⁰ Gallinat A, Feldkamp T, Schaffer R, Radünz S, Treckmann JW, Minor T et al. Singlecenter experience with kidney transplantation using deceased donors older than 75 years. *Transplantation*. 2011; 92(1):76-81.
- ¹⁷¹ Barlow AD, Taylor AH, Elwell R, Buttress AS, Moorhouse J, Nicholson ML. The performance of three estimates of glomerular filtration rate before and after live donor nephrectomy. *Transpl Int*. 2010; 23(4):417-423.
- ¹⁷² Ibrahim HN, Rogers T, Tello A, Matas A. The performance of three serum creatinine-based formulas in estimating GFR in former kidney donors. *Am J Transplant*. 2006 ; 6(6):1479-1485.
- ¹⁷³ Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing Kidney function- Measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med*. 2006; 354(23): 2473-2483.
- ¹⁷⁴ Julie Lin , Bradley M Denker. Chapter 44. Azotemia and urinary abnormalities. En *Harrison's Online*. Disponible en <http://accessmedicine.com>.
- ¹⁷⁵ Almon A, Siddiqui S, Robertson S, Norrie J, Isles C. Comparison of combined urea and creatinine clearance and prediction equations as measures of residual function when GFR is low. *Q J Med*. 2008; 101:619-624.
- ¹⁷⁶ Aranda P, Ruilope LM, Marín R, Aljama P, Luque M. Estudio trasversal sobre prevalencia de insuficiencia renal en la hipertensión esencial. *Estudio Laennec. Nefrología*. 1995; 25:134-140.
- ¹⁷⁷ Modrego Navarro A, Rodríguez Ledo MP, Cucalón Arenal JM, Tarraga López PJ, Roble del Corro M, Montilla Garzón L y Grupo de Investigadores CAPSIME. Impacto de la prediabetes y el sexo en el riesgo cardiovascular asociado a síndrome metabólico. *Hipertens riesgo vasc*. 2010; 27 (1):4-12.
- ¹⁷⁸ Ahmad M, Cole EH, Cardella CJ, Cattran DC, Schiff J, et al. Impact of deceased donor diabetes mellitus on kidney transplant outcomes: a propensity scored-matched study. *Transplantation*. 2009; 88:251-260.

-
- ¹⁷⁹ Gorostidi M, Marín R. Nefropatía vascular. Concepto y significado. *Epidemiología. Hipertensión esencial e insuficiencia renal. Nefroesclerosis. Nefropatía isquémica o aterosclerótica. Nefrología*. 2004; Suplemento 6:73-83.
- ¹⁸⁰ Kasiske BL. The kidney in cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2011; 134:707-709.
- ¹⁸¹ Watson CJ, Johnson RJ, Birch R, Collet D, Bradley JA. A simplified donor risk index for predicting outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 2012; 93(3): 314-318.
- ¹⁸² Seller-Pérez G, Herrera Gutierrez ME, Lebrón-Gallardo M, Fernández-Ortega JF, Arias-Verdú D, Mora-Ordoñez J. Donantes de órganos en una Unidad de Cuidados Intensivos. *Med Intensiva*. 2004; 28: 308-315.
- ¹⁸³ Bisigniano L, López-Rivera A, Tagliafichi V, Fernández V, Soratti C. Factors associated with patient and graft survival using kidneys from cadaveric donors in transplanted patients over 18 years of age in Argentina. *Transplant Proc*. 2012; 44(7):2242-2245.
- ¹⁸⁴ Carrier M, Lizé JF. Québec-Transplant Programs. Impact of expanded criteria donors on outcomes of recipients after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(7):2227-2230.
- ¹⁸⁵ Laging M, Kal-van Gestel JA, van de Wetering J, Ijzermans JN, Weimar W, Roodnat JI. The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney transplantation. *Transpl Int*. 2012; 25:1150-1157.
- ¹⁸⁶ Chiurciu C, Riva V, Bürgesser MV, de Arteaga J, Douthat W, de la Fuente J, de Diller AB, Massari PU. Expanded criteria donors, histological scoring, and prolonged cold ischemia: impact on renal graft survival. *Transplant Proc*. 2011; 43(9):3312-3314.
- ¹⁸⁷ Machado S, Figueiredo N, Neves M, Macário F, Alves R, Mota A, Campos M. Kidney transplantation using donors over 70 years old: are the criteria for organ allocation too expanded? *Transplant Proc*. 2012; 44(8):2289-2292.
- ¹⁸⁸ Olaverri JG, Mora Christian J, Elorrieta P, Esnaola K, Rodríguez P, Marrón I et al. Utilization of advanced-age donors in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2011; 43(9):3340-3343.
- ¹⁸⁹ Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G. Dual Kidney Transplant Group. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med*. 2006 ; 354(4):343-352.
- ¹⁹⁰ Martín-Hernández, López-Messa JB, Pérez-Vela JL, Molina-Latorre R, Cárdenas-Cruz, Lesmes-Serrano A. Manejo del síndrome posparada cardíaca. *Med Intensiva*. 2010; 34(2):107-126.
- ¹⁹¹ Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288:F387-F398.
- ¹⁹² Ueda N, Kaushal GP, Shah SV: Recent advances in understanding mechanisms of renal tubular injury. *Adv Ren Replace Ther*. 1997; 4:17-24.

-
- ¹⁹³ Walker LM, York JL, Imam SZ, Ali SF, Muldrew KL, Mayeux PR. Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia. *Toxicol Sci* 2001; 63: 143–148.
- ¹⁹⁴ Berger NA: Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* 1985; 101:4-15.
- ¹⁹⁵ Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288:F387–F398.
- ¹⁹⁶ Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. Poly(ADPribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure. *Pharmacol Res.* 2005, 52:44–59.
- ¹⁹⁷ Paschen W, Olah L, Mies G. Effect of transient focal ischemia of mouse brain on energy state and NAD levels: No evidence that NAD depletion plays a major role in secondary disturbances of energy metabolism. *J Neurochem.* 2000; 75:1675-1680.
- ¹⁹⁸ Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW. Biochemical pathways of apoptosis: Nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kD apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med.* 1996; 183:463-471.
- ¹⁹⁹ Devalaraja-Narashimha K, Padanilam BJ. PARP1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(1):95-103.
- ²⁰⁰ O'Valle F, Del Moral RG, Benítez M del C, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M, Aguilar D et al. Poly[ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation. *PLoS One.* 2009 Sep 28;4(9):e7138.
- ²⁰¹ Schnuelle P, Lorenz D, Mueller A, Trede M, Johannes Van der Woude F. Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney Int.* 1999; 56:738-746.
- ²⁰² Powner DJ, Truong H. Takotsubo cardiomyopathy: its possible impact during adult donor care. *Prog Transplant.* 2011; 21(4):344-349; .
- ²⁰³ O'Valle F, Gómez-Morales M, Del Moral RM, Serón D, Moreso F, Osuna A et al. Poly(ADP-ribose) polymerase expression in kidney transplantation: from alfa (alpha) to Omega (Omega). *Transplant Proc.* 2007; 39(7):2099-2101.
- ²⁰⁴ O'Valle F, Benítez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, Martín-Oliva D et al. Role of poly (ADP-ribose) polymerase in kidney transplant and its relationship with delayed renal function: multivariate analysis. *Transplant Proc.* 2005; 37(9):3684-3687.
- ²⁰⁵ O'Valle F, Benitez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, del Moral RM et al. Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly(ADP-ribose)polymerase. *Transplant Proc.* 2004; 36(3):733-735.
- ²⁰⁶ Bennet WM, Houghton DC, Buss WC. Cyclosporine-induced renal dysfunction: correlations between cellular events and whole kidney function. *J Am Soc Nephrol.* 1991; 1:1212-1219.

-
- ²⁰⁷ Rigotti P, Kahan BD. Sirolimus-based therapy for kidney transplantation from expanded criteria donors. *Transplantation*. 2009 Apr 27; 87(8 Suppl):S11-13.
- ²⁰⁸ Durrbach A, Rostaing L, Tricot L, Ouali N, Wolf P, Pouteil-Noble C, Kessler M, Viron B, Therivet E. Prospective comparison of the use of sirolimus and cyclosporine in recipients of a kidney from an expanded criteria donor. *Transplantation*. 2008 Feb 15; 85(3):486-490.
- ²⁰⁹ Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ. Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2001; 72(3):455-463.
- ²¹⁰ Giamouzis G, Butler J, Starling RC, Karayannis G, Nastas J, et al. Impact of dopamine infusion on renal function in hospitalized heart failure patients: results of the dopamine in acute decompensated heart failure (DAD-HF) trial. *J Card Fail*. 2010; 16(12): 922-930.
- ²¹¹ Kellum JA, Decker JM. Use of dopamine in acute renal failure: a metaanalysis. *Crit Care*. 2001; 29(8): 1526-1531.
- ²¹² Marik PE, Iglesias J. Low-dose dopamine does not prevent acute renal failure in patients with septic shock and oliguria: The NORASEPT II study investigators. *Am J Med*. 1999; 107 (4): 387-390.
- ²¹³ Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J. Australia and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) clinical trial group. Low dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomized trial. *Lancet* 2000; 356 (9248): 2139-2143.
- ²¹⁴ De Backer D, Biston P, Devriest J, Madl C, Chochrad D, et al. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. *N Eng J Med*. 2010, 362 (9): 779-789.
- ²¹⁵ Patel GP, Grahe SJ, Sperry M, Singla S, Elpern E, et al. Efficacy and safety of dopamine versus noradrenaline in the management of septic shock. *Shock*. 2010; 33(4): 375-380.
- ²¹⁶ Grosso G, Corona D, Mistretta A, Zerbo D, Sinagra N, Giaquinta A et al. Delayed graft function and long-term outcome in kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2012 Sep;44(7):1879-1883.
- ²¹⁷ Figueiredo A, Moreira P, Parada B, Nunes P, Macário F, Bastos C, Mota A. Risk factors for delayed renal graft function and their impact on renal transplantation outcome. *Transplant Proc*. 2007; 39:2473.
- ²¹⁸ Veroux M, Grosso G, Corona D, Mistretta A, Giaquinta A, Giuffrida G et al. Age is an important predictor of kidney transplantation outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Apr;27(4):1663-1671.
- ²¹⁹ Giral M, Bertola JP, Foucher Y, Villers D, Bironneau E, Blanloeil Y et al. Effect of brain-dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis. *Transplantation*. 2007 May 15; 83(9):1174-1181.