



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Programa de doctorado en Medicina**

**Departamento de Medicina**

**Tesis Doctoral**

**Contribución de la inflamación del  
aloinjerto renal a la inflamación  
sistémica**

**Doctoranda: Anna Carabén Redaño**

**Director: Daniel Serón Micas**

**Tutor: Vicent Fonollosa Pla**

**2019**



*“Cada solución da pie a una nueva pregunta...”*

*David Hume*



# **Agradecimientos**



Al Dr Serón por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar mi doctorado en el Servicio de Nefrología del Hospital Vall d'Hebron. Durante estos años me ha inculcado su pasión por la investigación y para mí ha sido todo un referente.

Al Dr Moreso, que juntamente con el Dr Serón, me dieron la oportunidad de trabajar en la unidad de ensayos clínicos del servicio de Nefrología. Trabajar en ensayos clínicos me ha permitido crecer en todos los aspectos y, sobretodo, estoy agradecida a la gran familia que formamos con Oreto, Estefania, Miriam, Fiona, Betty y Néstor. Trabajar a vuestro lado ha sido un regalo.

A Conxita Jacobs, por ser mi puntal durante todos estos años pero, sobre todo, por su amistad.

A todos los servicios implicados en el desarrollo de esta tesis: Biobanco, Unidad de Estadística y Bioinformática y Servicio de Inmunología. Sin la ayuda de todas y cada una de las personas que conforman estos servicios esta tesis no se habría podido realizar. Gracias por vuestra profesionalidad e implicación, ha sido un placer trabajar y aprender a vuestro lado.

A todas las personas con las que he compartido estos 4 años en el hospital y que han sido "culpables" de que pudiera entrar cada día a trabajar con una sonrisa.

A mi familia y amigos, por apoyarme y confiar en mí cuando más lo necesitaba.



# **Abreviaturas**



PTH: Hormona paratiroidea

FG: Filtrado glomerular

IRA: Insuficiencia renal aguda

IRC: Insuficiencia renal crónica

KDIGO: Kidney Disease improving global outcomes

ERC: Enfermedad renal crónica

PA: Presión arterial

KDOQI: Kidney disease outcomes quality initiative

GRADE: Grading of recommendations assessment, development and evaluation

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

ABO: Grupo sanguíneo

ONT: Organización nacional de trasplante

ME: Muerte encefálica

DAC: Donación en asistolia controlada

DANC: Donación en asistolia no controlada

MAP cinasa: proteína quinasa activada por mitógeno

NFkB: factor nuclear potenciados de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

IL: Interleucina

LT: Linfocito T

LB: Linfocito B

CSA: Ciclosporina

TAC: Tacrolimus

AZA: Azatioprina

MMF: Mofetil micofenolato

MTOR: Serina treonina cinasa de mamíferos

IFTA: Fibrosis intersticial y atrofia tubular

TCMR: Rechazo crónico mediado por células T

ABMR: Rechazo agudo mediado por anticuerpos

CPA: células presentados de antígeno

CDC: citotoxicidad dependiente del complemento

ELISPOT: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos

GoCar: Genómica del rechazo crónico del aloinjerto

CADI: Daño crónico del injerto

Biomargin: Biomarcadores de lesiones del injerto renal

ATAGC: Centro de genómica aplicada de trasplante de Alberta

MMDx: Microscopio molecular

PBT: Transcripciones basadas en patogénesis

PCR: Proteína C reactiva

Treg: Células T reguladoras

TTOG: Test tolerancia oral de glucosa

PBMC: Células mononucleares periféricas

RIN: RNA integrity number

PAM: Partición alrededor de medoides

CART: Construcción de un árbol de clasificación

NIH: National institutes of health

PCA: Análisis de componentes principales

MAPA: Monitorización ambulatoria de la presión arterial de 24h

VOP: Velocidad de la onda del pulso



# Índice



Abreviaturas.....	I
Resumen.....	1
Introducción.....	7
1. Aparato Urinario .....	9
2. El Riñón.....	9
2.1 Anatomía del riñón .....	10
2.2 Vascularización renal .....	11
2.3 La nefrona .....	13
3. La insuficiencia renal.....	17
3.1 Insuficiencia renal aguda.....	17
3.2 Insuficiencia renal crónica .....	18
3.3 Estadios y progresión de la Insuficiencia renal crónica .....	19
4. Tratamiento sustitutivo renal .....	20
4.1 Diálisis.....	20
4.2 Trasplante renal .....	21
5. Monitorización histológica .....	27
5.1 Biopsias de protocolo .....	27
5.2 Inflamación subclínica en injertos renales estables.....	29
6. Monitorización inmunológica .....	30
6.1 Anticuerpos anti HLA.....	30
6.2 Subpoblaciones linfocitarias .....	32

7. Biomarcadores.....	33
7.1 Microarrays en sangre periférica .....	34
7.2 Microarrays en biopsias renales .....	37
7.2 Citocinas .....	39
Hipótesis y objetivos.....	43
Material y métodos .....	47
8. Obtención de suero para medición de un panel de 20 citocinas.....	51
9. Obtención de células mononucleares periféricas en sangre periférica	53
10. Extracción de ARN de las células mononucleadas periféricas .....	55
11. Extracción del ARN a partir de tejido .....	57
12. Realización de microarrays.....	60
13. Análisis estadístico microarrays.....	62
13.1 Gráficas con genes seleccionados de la toptable RechazovsNormal.....	63
13.2 Gráficas con genes seleccionados de las listas .....	63
14. Análisis estadístico citocinas .....	64
14.1 Análisis exploratorio de los datos .....	64
14.2 Reducción de la dimensión.....	65
14.3 Obtención de perfiles de pacientes .....	65
14.4 Evaluación y clasificación CART .....	65
14.5 Concordancia entre diagnósticos clínicos y grupos generados .	66
Resultados.....	67

15. Caracterización de genes asociados a rechazo .....	69
15.1 Caracterización de genes asociados a rechazo en tejido .....	75
15.2 Caracterización de genes asociados a rechazo en sangre periférica .....	88
16. Caracterización de la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica.....	98
16.1 Obtención de perfiles de pacientes a partir de los grupos histológicos.....	104
16.2 Obtención de perfiles de pacientes a partir de las citocinas.....	111
Discusión .....	129
17. Expresión de genes de rechazo en biopsias renales .....	131
18. Expresión de genes de rechazo en sangre periférica.....	135
19. Caracterización de la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica.....	140
Conclusiones.....	145
Líneas de investigación de futuro.....	149
Bibliografía .....	153



# Resumen



El trasplante renal ha permitido mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con enfermedad renal crónica ya que disminuye la mortalidad respecto a los pacientes en diálisis. A pesar de esto, la enfermedad cardiovascular constituye la primera causa de fallecimiento del paciente después del trasplante renal y está asociada a la presencia de inflamación sistémica (niveles elevados de proteína C reactiva o de la interleucina 6 en sangre).

Nuestra hipótesis sostiene que la inflamación a nivel del aloinjerto renal contribuye a la inflamación sistémica. Se han incluido 236 pacientes portadores de un trasplante renal a los que se ha realizado una biopsia del injerto, ya sea de seguimiento o indicación por causa, en el Hospital Universitario Vall de Hebrón, entre julio de 2015 y abril de 2019. De esta cohorte de pacientes se ha obtenido una muestra de sangre periférica para la medición de un panel de 20 citocinas. Además, en un subgrupo de 94 pacientes se ha realizado un estudio de expresión génica mediante microarrays, tanto en el tejido renal como en células mononucleares periféricas, con el objetivo de caracterizar la expresión de genes relacionados con el rechazo inmunológico. Para ello hemos comparado los perfiles de expresión génica obtenidos en los pacientes trasplantados con hallazgos de rechazo (incluye rechazo celular y rechazo humoral), cambios borderline, fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA) e histología normal en biopsias del injerto renal.

Los pacientes con diagnóstico histológico de rechazo presentan un aumento de la inflamación sistémica, ya sea medido con el panel de 20 citocinas o con la proteína C reactiva. Además, el método estadístico de construcción de un árbol de clasificación (CART), nos ha permitido determinar que es posible clasificar a los pacientes según su estado de inflamación sistémica utilizando únicamente los niveles plasmáticos de tres citocinas: MIP-1alpha, IL-13 e IL-4. Mediante el estudio de expresión de genes relacionados con el rechazo inmunológico en el subgrupo de 94 pacientes hemos observado que la expresión de dichos genes se encuentran aumentados en aquellos pacientes con diagnóstico de rechazo respecto a los pacientes con histología normal. Además, aunque en menor medida, también se encontraron

incrementados los niveles de expresión de genes de rechazo en pacientes con diagnóstico de cambios Borderline, tanto en biopsias por seguimiento como por causa, y en los pacientes con diagnóstico IFTA en biopsias por causa. Estos datos se confirmaron y validaron con los resultados obtenidos previamente en tres cohortes externas e independientes. En sangre periférica se observó que la expresión diferencial de genes relacionados con el rechazo es menor que en tejido. Encontramos una expresión diferencial de genes entre las biopsias con diagnóstico de rechazo versus a las biopsias con diagnóstico normal, pero estos datos no se confirmaron con los resultados obtenidos en las tres cohortes de validación.

En conclusión, nuestros datos confirman que existe una relación entre la inflamación tisular y la inflamación sistémica evaluada mediante un panel de 20 citocinas. Los pacientes con cambios borderline en biopsia por causa o de seguimiento, así como, los pacientes con IFTA en biopsia por causa presentan un incremento variable de la expresión de genes de rechazo. En cambio, no existe un aumento de la expresión de genes de rechazo en las biopsias de seguimiento con diagnóstico histológico de IFTA. Los cambios en la expresión génica observados a nivel del aloinjerto, no se reflejan en las células mononucleares periféricas.

Renal transplantation has improved the survival and life quality of patients with chronic kidney disease since it reduces mortality compared to patients in dialysis. Despite this fact, cardiovascular disease is the first cause of death of kidney transplanted patients and is associated with the presence of systemic inflammation (elevated blood levels of C-reactive protein or interleukin 6).

We hypothesize that inflammation of the renal allograft contributes to systemic inflammation. We included 236 kidney transplanted patients who have undergone a graft biopsy, either surveillance or indicated by cause, at the Vall de Hebrón University Hospital, between July 2015 and April 2019. From this cohort a peripheral blood sample was obtained to measure a panel of 20 cytokines. In addition, a microarray based gene expression study has been performed in a subgroup of 94 patients, both in renal allograft tissue and in peripheral mononuclear cells, with the aim of characterizing the expression of genes related to immunological rejection. We have compared the gene expression profiles obtained in transplanted patients with findings of rejection (including cellular rejection and humoral rejection), borderline changes, interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and normal histology in renal graft biopsies.

Patients with histological diagnosis of rejection showed an increase in systemic inflammation, either assessed with the panel of 20 cytokines or with the C-reactive protein. In addition, the statistical method of building a classification tree (CART) has allowed us to determine that it is possible to classify the patients according to their systemic inflammation state using only the plasma levels of three cytokines: MIP-1 $\alpha$ , IL-13 and IL-4. Through the immune rejection related gene expression study in the subgroup of 94 patients we have observed that immune rejection related genes are more expressed in those patients with a diagnosis of rejection when compared to patients with normal histology. In addition, although to a lesser extent, levels of rejection gene expression were also increased in patients diagnosed with borderline changes, both in surveillance and cause biopsies, and in patients with IFTA diagnosis in cause biopsies. These data were confirmed and validated with the results previously obtained in three external and independent cohorts. In peripheral blood it was observed that the differential expression of genes related to

rejection is lower than in tissue. We found a differential expression of genes between biopsies with diagnosis of rejection versus biopsies with normal diagnosis, but these data were not confirmed with the results obtained in the three validation cohorts.

In conclusion, our data confirm that there is a relationship between tissue inflammation and systemic inflammation evaluated by a panel of 20 cytokines. Patients with borderline changes in cause or surveillance biopsies, as well as, patients with IFTA in cause biopsy have a variable increase in the expression of rejection related genes. On the other hand, there is no increase in the expression of rejection related genes in surveillance biopsies with histological diagnosis of IFTA. The changes observed in the allograft gene expression are not reflected in peripheral mononuclear cells.

# **Introducción**



## **1. Aparato Urinario**

El aparato urinario está formado por un conjunto de estructuras que intervienen en la depuración de sustancias tóxicas de la sangre mediante el almacenaje y posterior evacuación en forma de orina. El aparato excretor está formado por dos riñones, dos uréteres, una uretra y una vejiga. La función principal del aparato urinario es la de mantener el balance o equilibrio de fluidos y electrolitos, mediante la excreción de agua y varios productos de desecho. Gracias al riñón y su capacidad de reabsorción, un cierto número de sustancias son conservadas en el organismo, otras son excretadas y el producto final, la orina, es liberada.

## **2. El Riñón**

Los riñones son dos órganos de color rojizo, cada uno aproximadamente de 12 a 13 cm de longitud según su eje mayor y unos 6 cm de anchura, 4 cm de grosor, siendo su peso entre 130 y 170 gr. Tienen forma de alubia y en el centro de su borde medial cóncavo aparece una profunda depresión denominada hilio. En el ser humano los riñones están situados en las fosas lumbares, a los lados de la 12<sup>o</sup> vértebra y de las dos primeras vértebras lumbares, detrás del peritoneo (1).

La función principal de los riñones es la de mantener el volumen y el pH de los líquidos del cuerpo dentro de los límites normales; por medio de la excreción de cantidades variables de agua y de sustancias orgánicas e inorgánicas que pasan por el torrente circulatorio. Los riñones excretan casi todos los desechos nitrogenados, la mayor parte de sales que no necesita la sangre y cerca de la mitad del exceso de agua. También eliminan sustancias extrañas como toxinas, ya sea que se hayan formado dentro del organismo o que provengan de fuera. Esta homeostasis se logra mediante un correcto funcionamiento de los glomérulos de los riñones, gracias al filtrado glomerular.

Por otro lado, el riñón también tiene función endocrina al secretar hormonas como la renina, que activa el sistema renina-angiotensina aldosterona, la eritropoyetina que estimula la producción de eritrocitos, el

calcitriol que inhibe la liberación de la hormona paratiroidea PTH o la trombopoyetina, que estimula la producción de plaquetas por partes de los megacariocitos (2).

## 2.1 Anatomía del riñón

El riñón está cubierto por la cápsula renal y por la fascia de Gerota que tienen la función de contener las extravasaciones sanguíneas y de orina, así como, de realizar los procesos depurativos. El parénquima renal está envuelto por una membrana de tejido conjuntivo llamada cápsula fibrosa y, por fuera, está rodeado por una cápsula de grasa. La fascia renal envuelve esta grasa perineal y la separa del resto de tejido graso extraperitoneal de la región renal.

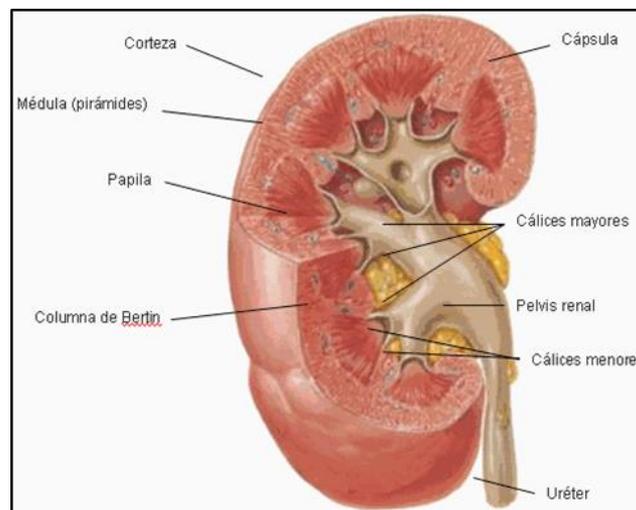


Figura 1. Anatomía del riñón

El hilio renal está limitado por dos labios, uno anterior y otro posterior y sigue por una cavidad denominada seno renal, que se extiende hacia el interior. Las paredes del seno renal están tapizadas por tejido conjuntivo de la cápsula renal y presentan numerosas protuberancias denominadas papilas renales. Por esta zona discurren los grandes vasos y los nervios renales, así como el extremo terminal superior del uréter, que tiene forma de embudo y que se denomina pelvis renal. La pelvis del uréter se divide en dos o tres grandes ramas (sistema de drenaje) que se conocen como cálices mayores y, a su vez, cada uno de éstos se bifurcan en varias ramas más cortas o cálices menores (Figura 1) (1).

En el vértice de la pirámide renal se encuentra situada la papila y su función es recibir la orina y descargarla en el cáliz renal. Una papila puede estar en contacto con dos o incluso más pirámides; el número de papilas de un riñón oscila entre 8 y 18. En un cáliz desembocan de 1 a 3 papilas (cáliz menor). Entre 2 y 4 cálices menores se unen a un cáliz mayor. Los 2 o 3 cálices mayores desembocan en la pelvis renal en forma de embudo, que tras abandonar el hilio se convierte en el conducto urinario (uréter). La musculatura de la pared de la pelvis tiene una estructura en espiral, que contribuye de forma significativa a hacer avanzar la orina a través de las papilas (3).

## 2.2 Vascularización renal

Debido a las características funcionales de los riñones, éstos poseen una gran vascularización; el flujo sanguíneo es de aproximadamente 1.200 ml/min, los riñones reciben por minuto aproximadamente una cuarta parte del flujo cardíaco.

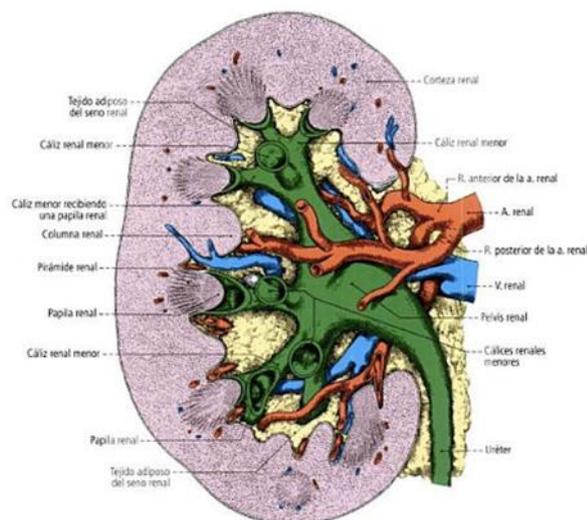


Figura 2. Vascularización renal

La sangre es suministrada por medio de la arteria renal, que alcanza al riñón por el hilio, y se ramifica en dos grandes ramas, una anterior y otra posterior, que, antes de penetrar en el tejido renal, se dividen en varias arterias segmentarias (Figura 2). Una vez que éstas se introducen en el parénquima renal, originan las arterias interlobulares, las cuales discurren por las columnas de Bertin hasta la base de las pirámides, dónde dan lugar a las arterias

arciformes, que se incurvan para disponerse, justamente, entre la base de las pirámides y la corteza renal siguiendo un trayecto lateral.

A partir de ahí, las arterias arciformes emiten ramas denominadas arterias interlobulillares, que, de forma perpendicular a la superficie renal, ascienden por la corteza, donde pueden originar colaterales antes de seguir su trayecto directo hacia la superficie. A partir de las arterias interlobulillares, a diferentes intervalos, van a originarse las arteriolas aferentes, cada una de las cuales irrigan un solo glomérulo.

Al entrar en el corpúsculo renal, la arteriola aferente se puede dividir de cinco a ocho ramas cortas, cada una de las cuales origina un segmento capilar independiente. Los capilares glomerulares drenan hacia la arteriola eferente, a través de la cual, la sangre abandona el glomérulo. La mayor partes de las veces, esta arteriola eferente, nada más abandonar el corpúsculo renal, se ramifica en otra red de capilares que discurre por el intersticio en íntimo contacto con los túbulos renales, circunstancia que va a permitir un proceso tan importante como el paso a la sangre de sustancias reabsorbidas por las células tubulares.

Es destacable el hecho de que en la circulación cortical del riñón existan dos redes capilares, una glomerular y otra peritubular, consecutivas y unidas entre ellas por una arteriola.

Por otro lado, de las arteriolas eferentes, que proceden de corpúsculos yuxtamedulares, emergen entre 12 y 15 capilares que descienden hacia la médula, siguiendo un largo trayecto entre los componentes tubulares medulares, que se denominan vasos rectos descendentes. Estos capilares se ramifican en forma de malla, radialmente alargada, alrededor de ramas de asas de Henle y túbulos colectores, contribuyendo al intercambio de líquidos e iones que tienen lugar en la médula. Las terminaciones capilares convergen hacia los vasos rectos ascendentes que siguen un trayecto paralelo y opuesto a los descendentes, hasta desembocar en el sistema venoso. No todos los vasos rectos proceden de las arteriolas eferentes, sino que algunos pueden surgir como ramificaciones verticales directas de las arterias arciformes.

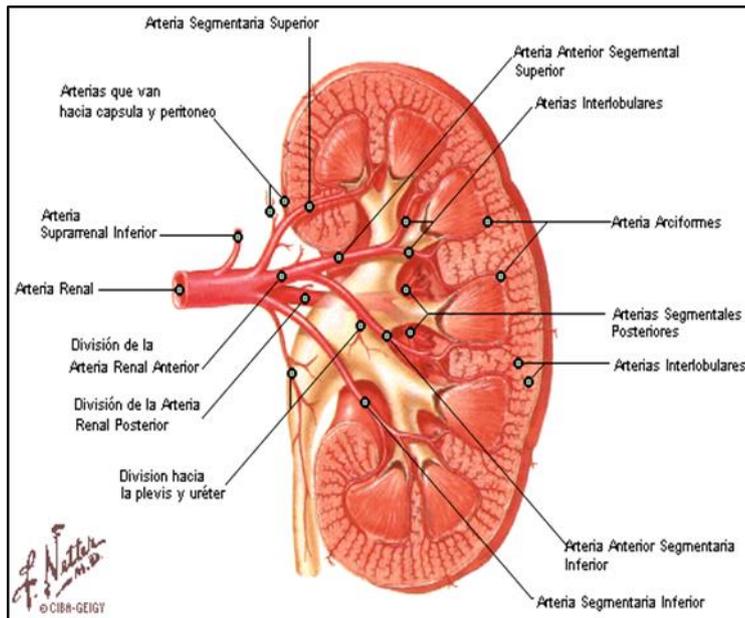


Figura 3. Vascularización renal

El retorno venoso en el riñón sigue, en general, un trayecto opuesto a la circulación arterial. Los plexos capilares subcapsulares drenan hacia un plexo de venas estrelladas que, a su vez, desembocan en venas interlobulillares. Éstas descienden perpendicularmente a la superficie renal y van recibiendo la sangre de las venas tributarias de la red capilar peritubular y, más abajo, de las venas tributarias procedentes de los vasos rectos (Figura 3). Sin embargo, muchos de los vasos medulares desembocan directamente en las venas arciformes, paralelas a sus homónimas arteriales, en las que desembocan, igualmente, en las venas interlobulillares. El riñón posee numerosos vasos linfáticos, que drenan en ganglios hiliares, los cuales comunican con los ganglios periaórticos, craneal y caudalmente a la zona del hilio. Se ha demostrado la existencia de comunicaciones linfáticas cruzadas con el lado contralateral (4).

### 2.3 La nefrona

La nefrona es la unidad funcional del riñón y se encarga de filtrar la sangre y fabricar la orina. Tienen un diámetro entre 20 y 30 milésimas de milímetro y una longitud de hasta 50 milímetros, se caracteriza por tener un extremo cerrado y otro abierto y continúa con un conducto colecto. La estructura de la nefrona se compone principalmente de un corpúsculo renal

constituido por la cápsula de Bowman y el glomérulo; en comunicación con un túbulo renal (Figura 4).

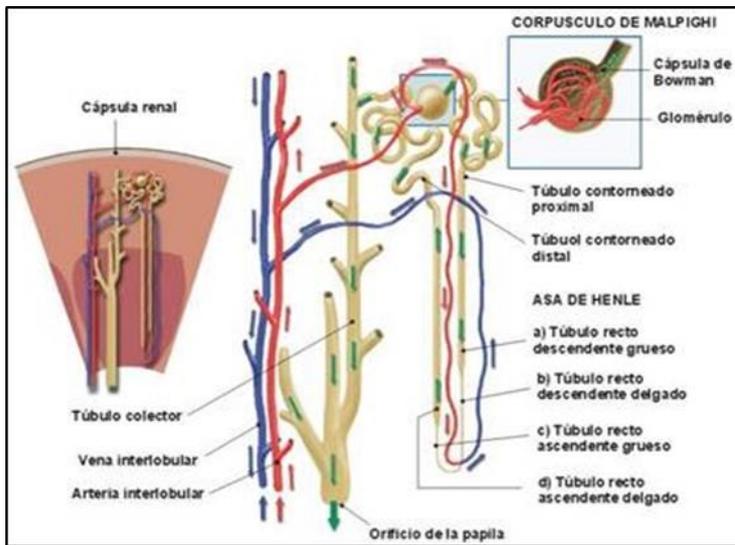


Figura 4. La nefrona

Existen dos grandes tipos de nefronas:

- Nefronas corticales: suponen alrededor del 80% del total y tiene el glomérulo en la parte más superficial de la corteza.

- Nefronas yuxtapasales: Son minoritarias, alrededor del 20% del total, su glomérulo está en la zona de corteza cercano a la médula. En tales nefronas, el asa de Henle es más larga, lo que les permite obtener una orina con grandes variaciones de agua, es decir, muy concentrada o muy diluida y su túbulo penetra profundamente en la médula renal. Son las principales responsables de que el cuerpo fabrique más o menos orina.

### 2.3.1 El glomérulo

La zona de filtrado está situado en la corteza, por donde la nefrona comienza una especie de expansión esferoidal que contiene el llamado glomérulo. El glomérulo está constituido por 4 o 6 capilares sanguíneos y se encuentra en un espacio limitado por una pared que se llama cápsula de Bowman. El glomérulo forma parte del proceso de la formación de orina, o también llamado principio de uropoyesis, en el cual las ramas pequeñas de la arteria renal forman los ovillos capilares (glomérulos) cubiertos por una

membrana muy fina y suspendidos dentro de una cavidad. Las paredes de estos glomérulos están estructuradas de tal modo que el agua, las sales, azúcares simples y sustancias análogas pueden atravesarla, mientras que son impermeables para las proteínas y los elementos formes de la sangre. A través de la presión sanguínea una décima parte, aproximadamente, de la cantidad de líquido que atraviesa el riñón (1.500 litros de sangre por día) se excreta en forma de orina primaria (150-170 litros/día).

La cápsula de Bowman es una estructura de naturaleza epitelial, que se encuentra en la corteza renal, a la que llegan los capilares sanguíneos que constituyen el glomérulo. La sangre de estos capilares sufre un proceso de filtrado y depuración y el líquido, que será precursor de la orina, pasa al interior de la cápsula de Bowman, llegando hasta el túbulo renal (4).

El proceso de filtrado glomerular (FG) consiste en la formación de un ultrafiltrado a partir del plasma que pasa por los capilares glomerulares. Se denomina ultrafiltrado, pues únicamente contiene solutos de pequeño tamaño capaces de atravesar la membrana semipermeable que constituye la pared de los capilares. Ésta permite libremente el paso de agua y de sustancias disueltas, con peso molecular inferior de 15000; es totalmente impermeable, en condiciones normales, a solutos con peso molecular superior a 70000 y deja pasar en cantidad variable los de peso molecular entre 15000 y 70000. La magnitud del filtrado glomerular está determinado por la permeabilidad (depende de la amplitud de los poros y de la tensión de la pared) y la presión hidrostática intracapilar. La presión hidrostática en el espacio de la cápsula de Bowman y la presión coloidosmótica intracapilar determinan la llamada presión de filtración efectiva. Además de estos factores hay otros con acción sobre la filtración glomerular que influyen sobre las resistencias vasculares de las arteriolas. La filtración glomerular normal es de alrededor de 120 ml/min y se modifica con las oscilaciones hemodinámicas habituales.

### 2.3.2 El túbulo renal

El túbulo renal es la zona por la que pasa el líquido de filtrado y se evapora, retirando el exceso de agua y ciertos iones. El túbulo renal tiene tres partes bien diferenciadas:

- El tubo contorneado proximal: en contacto con la cápsula de Bowman.
- El asa de Henle: con forma de horquilla y posterior al túbulo contorneado proximal.
- El tubo contorneado distal: posterior al asa de Henle que comunica con el tubo colector. La unión de los tubos colectores acaba dando lugar a los cálices.

En los túbulos, el epitelio sigue teniendo una sola capa, pero a lo largo de todas las nefronas aparecen con gran regularidad alteraciones histológicas más finas. Las complejas interrelaciones entre el sistema vascular y el epitelio tubular son responsables de la composición final de la orina, que se diferencia de forma significativa del filtrado glomerular original. El sistema tubular consta principalmente de las siguientes partes: por el polo opuesto a la entrada y salida de las arteriolas sale del glomérulo el túbulo contorneado proximal que discurre un trayecto tortuoso por la cortical (Figura 5). Posteriormente el túbulo adopta un trayecto rectilíneo en dirección al seno renal y se introduce en la médula hasta una profundidad variable según el tipo de nefrona (superficial o yuxtamedular); finalmente, se incurva sobre sí mismo y asciende de nuevo a la corteza. A este segmento se le denomina asa de Henle. En una zona próxima al glomérulo sigue nuevamente un trayecto tortuoso, denominado túbulo contorneado distal, antes de desembocar en el túbulo colector que va recogiendo la orina formada por otras nefronas, y que desemboca finalmente en el cáliz a través de la papila (3).

En el proceso de formación y desecho de la orina, cuando llega a los túbulos renales éstos desembocan en el conducto colector. Los túbulos renales están rodeados por una red capilar que facilita el intercambio de líquido y de sustancias entre los túbulos renales y los vasos sanguíneos. Después de la

uropoyesis primaria por “excreción”, la sangre se concentra considerablemente en las arteriolas renales, y por ello reabsorbe en el territorio capilar líquido de los túbulos renales, debido a la presión osmótica, aproximadamente el 99% de la orina primaria. El diferente tratamiento de las sustancias disueltas es esencial. Estas sustancias se reabsorben en parte (como glucosa, cloruro sódico, etc), y también permanecen en la orina primaria. Las células de los túbulos ceden también sustancias a la orina a través de un mecanismo activo (2).

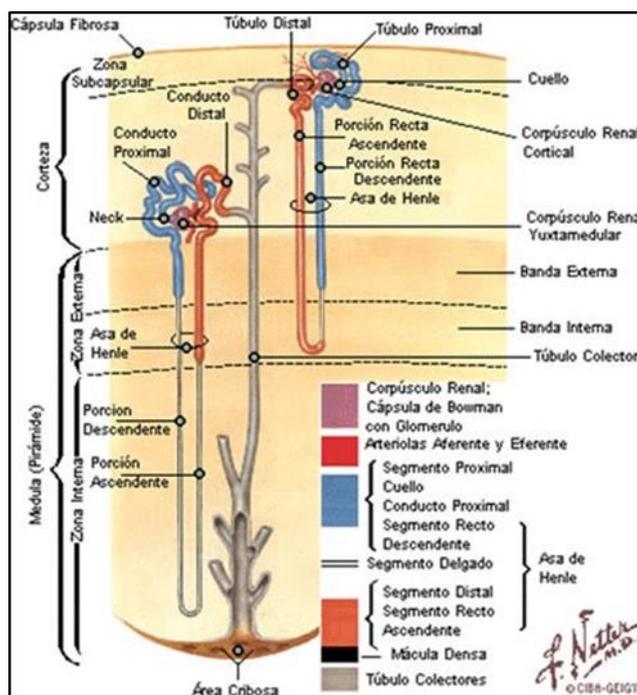


Figura 5. Anatomía del túbulo renal

### 3. La insuficiencia renal

La insuficiencia renal es la pérdida total o parcial de la capacidad del riñón para mantener la homeostasis debido al deterioro en la función de la nefrona, con el resultado de la pérdida de proteínas en la orina. Dependiendo de la duración podemos diferenciar dos tipos de insuficiencia renal: Insuficiencia Renal Aguda (IRA) e Insuficiencia Renal Crónica (IRC).

#### 3.1 Insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda o fracaso renal agudo, se caracteriza por un deterioro brusco de la función renal. Como criterio general para diagnosticar la

IRA se considera el tener unos niveles de creatinina plasmática por encima de 2 mg/100ml(5). Una alteración en la perfusión renal, la integridad del parénquima renal o en la permeabilidad de las vías excretoras puede ocasionar un fracaso renal agudo. Dependiendo del factor afectado la IRA se puede clasificar de la siguiente manera:

- Pre renal: si falla la perfusión y disminuye el filtrado glomerular.
- Renal: si el fallo radica en las estructuras renales (nefrona).
- Post renal: si se produce una interrupción del flujo urinario que impide la evacuación de orina.

Sin un tratamiento adecuado puede dar lugar a alteraciones funcionales en otros órganos. Si el paciente responde adecuadamente al tratamiento la IRA se puede revertir.

### **3.2 Insuficiencia renal crónica**

La insuficiencia renal crónica (IRC) es la pérdida progresiva e irreversible de la función renal durante al menos tres meses y con implicaciones para la salud (6). Se han descrito numerosas causas potenciales de desarrollo de la IRC, aunque la frecuencia de los procesos causantes presentan diferencias destacables tanto geográficas como cronológicas:

- Diabetes mellitus
- Hipertensión arterial que se puede desarrollar en: enfermedad vascular arteriosclerótica, nefroangioesclerosis o nefropatía isquémica
- Enfermedad glomerular primaria o secundaria a la enfermedad sistémica
- Nefropatías congénitas y hereditarias
- Nefropatías intersticiales
- Obstrucción prolongada del tracto urinario (incluyendo litiasis)
- Infecciones urinarias recurrentes

- Enfermedades sistémicas como lupus, mieloma, vasculitis....
- Otras causas desconocidas o no filiadas

Los principales marcadores de daño renal son la proteinuria y diferentes alteraciones a nivel de: sedimento urinario, electrolíticas, estructurales histológicas o estructurales en pruebas de imagen.

### 3.3 Estadios y progresión de la Insuficiencia renal crónica

Las nuevas guías internacionales del consorcio de KDIGO (Kidney Disease: Improving global outcomes) sobre la enfermedad renal crónica (ERC) y sobre el manejo de la presión arterial (PA) en pacientes con ERC constituyen la actualización correspondiente a la guía KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) realizada entre 2002 y 2004. Estos documentos ofrecen una guía actualizada para el diagnóstico, evaluación, manejo y tratamiento del paciente con ERC. El sistema GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) se utilizó para evaluar la calidad de la evidencia diagnóstica y emitir el grado de recomendación. Para definir los grados de la enfermedad renal crónica, previamente se ha de confirmar el diagnóstico. Una vez confirmado, la ERC se clasifica según las categorías de FG, albuminuria y según la etiología (7).

Los grados de FG (G1 a G5) y de albuminuria (A1 a A3) se exponen en la siguiente Figura 6:

La clasificación de la ERC se basa en la causa <sup>a</sup> y en las categorías del FG y de la albuminuria		
Categorías del FG		
Categoría	FG <sup>b</sup>	Descripción
G1	≥ 90	Normal o elevado
G2	60-89	Ligeramente disminuido
G3a	45-59	Ligera a moderadamente disminuido
G3b	30-44	Moderada a gravemente disminuido
G4	15-29	Gravemente disminuido
G5	< 15	Fallo renal
Categorías de albuminuria		
Categoría	Cociente A/C <sup>c</sup>	Descripción
A1	< 30	Normal a ligeramente elevada
A2	30-300	Moderadamente elevada
A3	> 300	Muy elevada <sup>d</sup>

Figura 6. Clasificación de la enfermedad renal crónica según la categorías de filtrado glomerular y albuminuria

Entre los sujetos que padecen una ERC la progresión y la evaluación es muy variable, por ello se ha de evaluar de forma simultánea y sistemáticamente el FG estimado y la albuminuria. Una reducción en el FG y en el grado de albuminuria condiciona el pronóstico y además, ejercen un factor sinérgico.

Por otro lado, la progresión de la ERC se define por un descenso sostenido del  $FG > 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  al año o por el cambio de categoría (de G1 a G2, de G2 a G3a, de G3a a G3b, de G3b a G4 o de G4 a G5), siempre que este se acompañe de una pérdida de  $FG \geq 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  (GR, sin grado) (8).

## **4. Tratamiento sustitutivo renal**

En la etapa final de la IRC los riñones ya no pueden realizar la mínima función necesaria para mantener un estado óptimo del paciente. Llegados a este punto se plantean los dos métodos disponibles de terapia sustitutiva renal: la diálisis y el trasplante renal (9).

### **4.1 Diálisis**

El término diálisis se puede definir como la separación de partículas en solución mediante el método de difusión, a través de una membrana semipermeable. El método de difusión permite que iones y moléculas se distribuyan homogéneamente a través de una solución mediante la separación por una membrana semipermeable (de celofán o cuprofán) de dos compartimentos líquidos. El movimiento de las partículas continuará su curso hasta que la concentración sea igual a ambos lados de la membrana.

Se han desarrollado dos tipos de diálisis: la hemodiálisis que hace circular la sangre del paciente por una membrana artificial con la ayuda de aparatos externos y la diálisis peritoneal. La principal diferencia en la diálisis peritoneal es que el peritoneo hace la función de membrana. Estos métodos sustitutivos de la función renal permiten realizar la función excretora del riñón. Pero no consiguen realizar la función reguladora en el tiempo que lo realiza el riñón ni las funciones endocrinas. Además, son numerosas las complicaciones clínicas

(infecciones, náuseas, vómitos, hipotensión, fiebre, etc) que sufren los pacientes que realizan diálisis (10,11).

## 4.2 Trasplante renal

En pacientes con ERC el trasplante renal ha demostrado ser el mejor tratamiento al compararse con las técnicas de terapia renal sustitutiva debido a su asociación con una mejor calidad de vida y mejor supervivencia (12). Desde el 1991 el número de trasplantes por año ha ido aumentando hasta llegar a 3313 de trasplante realizados en 2018, pero ello no ha evitado que en la actualidad todavía hayan 3933 pacientes en lista de espera.



Figura 7. Evolución del número de trasplantes realizados en España y de la lista de espera. España 1991-2018

Para realizar con éxito un trasplante renal debemos partir de un donante idóneo, un receptor sin enfermedades que contraindique dicha técnica y, principalmente, una compatibilidad marcada entre el donante y el receptor. El órgano de un donante debe ser funcional y no estar dañado por procesos patológicos agudos o crónicos, traumatismo o hipoxia.

El trasplante renal debe facilitar la rehabilitación médica y social del receptor. La edad avanzada con mal estado general, los tumores, las enfermedades sistémicas crónicas avanzadas o las infecciones agudas graves constituyen, por lo tanto, contraindicaciones para el trasplante.

A fin de minimizar el riesgo de rechazo debe existir una coincidencia completa de los grupos sanguíneos y una compatibilidad marcada de la tipificación del HLA-A, -B y -DR (antígenos leucocitarios humanos) entre el donante y el receptor, así como del grupo sanguíneo (ABO). Además se ha de realizar la detección de anticuerpos circulantes preformados anti-HLA y contra otras proteínas del donante mediante ensayos de crossmatch (13).

En los últimos datos facilitados por la Organización nacional de trasplante (ONT), en España durante el 2018 de 4482 riñones que eran posibles candidatos para trasplante renal se extrajeron 4015 (89,6%). Pudiendo implantar finalmente 3025, es decir, el 24,6% de los riñones extraídos fueron no implantados. Las causas de no implante de riñones extraídos en 2018 (N=990) fueron muy diversas, pero siempre relacionadas con 3 grandes grupos: características del donante, características del injerto y causas relacionadas con el receptor. Los riñones pueden proceder de donantes en muerte encefálica, en asistolia o de donante vivo. En caso de donación en muerte encefálica (ME), los órganos proceden de pacientes fallecidos a causa de traumatismo craneoencefálicos aislados o de hemorragias cerebrales. En los últimos 18 años, tal y como se muestra en la Figura 8 han ido aumentando las donaciones en asistolia controlada (DAC) y en asistolia no controlada (DANC).

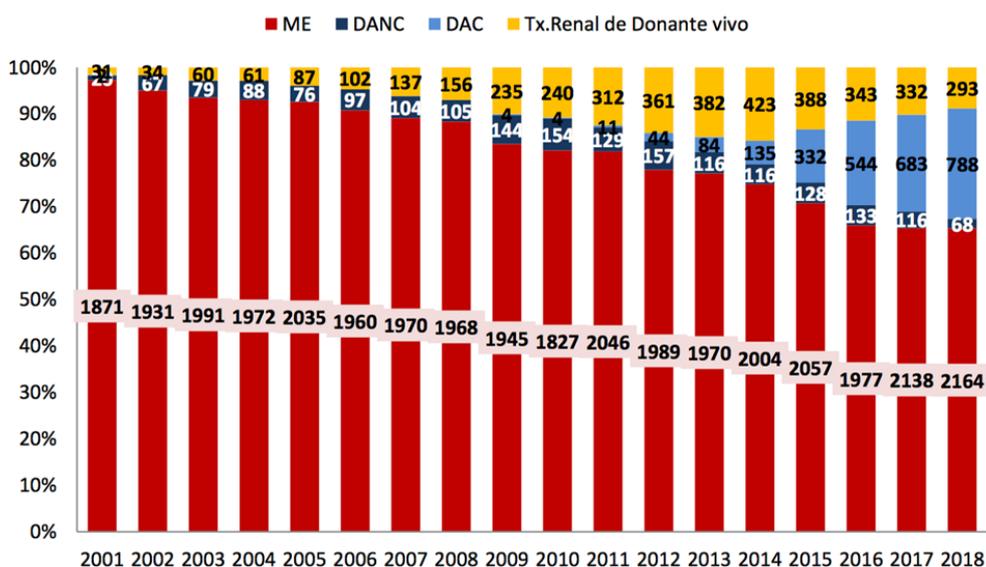


Figura 8. Procedimientos de trasplante renal realizados en España según el tipo de donante. España 2001-2018

Las donaciones de trasplante de vivo aumentaron de forma significativa hasta el 2014, posteriormente año tras año han ido disminuyendo los trasplantes de vivo y aumentando los trasplantes renales de donantes en asistolia controlada.

Para la implantación, el órgano del donante se gira 180° y se coloca en la fosa ilíaca contralateral del receptor. Por lo tanto, el riñón izquierdo de un donante se implanta en el lado derecho de un receptor. En las donaciones, se utilizan ambos riñones. El riñón siempre se implanta en la región extraperitoneal, excepto en niños (14). Para realizar la extracción del órgano se realiza habitualmente el siguiente procedimiento: en la explantación, se extrae todo el órgano, junto con los vasos renales (arterias renales con patch de aorta, venas renales con patch de cava) y los uréteres. Los vasos ureterales deben, por lo tanto, conservarse. Finalmente, se perfunde el órgano con una solución fría y se lavan muy bien los componentes hemáticos del donante, evitando la acidosis mediante la aplicación de un tampón. Mediante perfusión y enfriamiento (alrededor 4°C), un riñón donado puede implantarse con éxito hasta 48h tras su extracción.

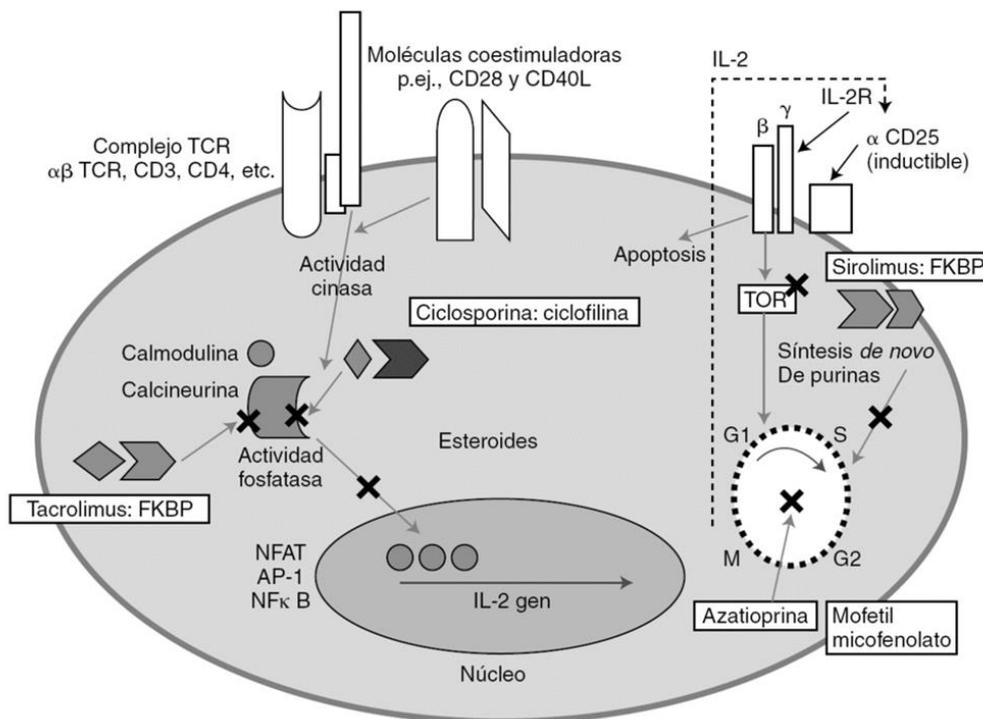
#### **4.2.1 Historia del trasplante renal**

El primer trasplante data en 1936 y se realizó por Yu Voronoy en Rusia, pero fracasó a los pocos días debido a que el injerto sufrió un rechazo agudo. Por ello, para que se pudieran realizar más trasplantes renales con éxito, se tuvo que profundizar en el conocimiento de la inmunología relacionada con el rechazo (15). En 1954 Joseph Murray y John Merrill del Peter Bent Brigham Hospital de Boston realizan el primer trasplante renal entre gemelos univitelinos. Posteriormente, en 1956 se realizaron los primeros trasplantes entre hermanos no idénticos en Boston y en París (16). Estos primeros trasplantes en los años 50 eran de donantes vivos y los primeros trasplantes de donante cadáver procedentes de pacientes en muerte encefálica no se realizaron hasta el año 1963. En España en 1965 se realizó el primer trasplante renal en el Hospital Clínic, gracias a los doctores José María Gil-Vernet, el nefrólogo Antoni Caralps y Jordi Vives (17).

#### 4.2.2 Tratamiento inmunosupresor

De los años 70 a los 90 hubo una evolución muy significativa en el área del trasplante renal a nivel de tratamientos inmunosupresores gracias al conocimiento de los mecanismos inmunosupresores implicados en el rechazo del injerto.

Los linfocitos T tienen un papel principal en los eventos inmunes que ocurren de forma precoz después de la exposición al injerto. La activación y proliferación de la célula T requiere al menos tres señales mediadas por la interacción con los aloantígenos. Estas señales activan las tres vías de transducción de señal: vía calcio-calcineurina, vía de la MAP cinasa (proteína quinasa activada por mitógeno) y la vía de la cinasa NFκB (factor nuclear potenciados de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Figura 9).



Adaptado de American Society of Transplantation Web page

Figura 9. Lugares de acción de los agentes inmunosupresores de mantenimiento. Imagen adaptada del American Society of Trasplantation Web page.

En la clínica actualmente se siguen dos fases de pautas de inmunosupresión: inducción y mantenimiento. La inmunosupresión de

inducción es una profilaxis del rechazo que se utiliza en el momento del trasplante y que no se puede mantener en el tiempo por sus efectos tóxicos. Principalmente son dos los factores que contribuyen a los requerimientos de la inmunosupresión de inducción: la alta proporción de precursores de células T donante-específico presente en la mayoría de receptores y la asociación del trasplante con el daño tisular (18). En las terapias de inducción se puede actuar a diferentes niveles de la respuesta inmunitaria inicial tras el trasplante:

- Disminuyendo la proporción de precursores de células T mediante preparaciones policlonales de antilinfocitos T y antimiocitos (timoglobulina) y las preparaciones monoclonales específicos frente a determinantes comunes linfocitarios como CD3 (OKT3), CD52 (alentuzumab) y CD25 (daclizumab y basiliximab)(19).

- Modificando el umbral de activación mediante los inhibidores de la calcineurina, los inhibidores de TOR, los antagonistas de receptores de interleucina 2 (IL-2), los glucocorticoides y los antagonistas de la coestimulación (disminuyen la unión a CD28).

La terapia de mantenimiento consiste en la utilización de inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto e intervienen a diferentes niveles de la cascada de activación de los linfocitos T y B (LT y LB):

- La ciclosporina (CSA) y tacrolimus (TAC) inhibe la transcripción de citocinas: El mecanismo de acción de los inhibidores de la calcineurina es bloquear a nivel intracelular en los linfocitos T las señales responsables de la producción de citocinas, reduciendo de esta forma su producción. Tanto la CSA como el TAC dependen de diferentes mediadores intracelulares para conseguir su acción, aunque la diana es la misma, la calcineurina. Ambos fármacos deben unirse a unas proteínas intermediarias para realizar su acción (20).

- La azatioprina (AZA) y el mofetil micofenolato (MMF) inhiben la síntesis de nucleótidos: la azatioprina, descubierta en 1968, es una antagonista de las purinas que interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos durante la expansión clonal de las células produciendo una disminución de la síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) y de las moléculas precursoras. El MMF es un

antimetabolito que inhibe de manera reversible la enzima IMPDH (inosina-5'-monofosfato dehidrogenasa), una enzima que limita la síntesis de novo de purinas, evita la proliferación de células T y B e inhibe la producción de anticuerpos (21).

- Los inhibidores de serina-treonina cinasa (TOR): sirolimus o rapamicina y everolimus, que inhiben la transducción de la señal de factores de crecimiento inhibiendo la TOR de mamíferos (mTOR). Estos fármacos son complemento de los inhibidores de la calcineurina, ya que no la bloquean y no tienen efectos vasomotores a nivel renal (22,23).

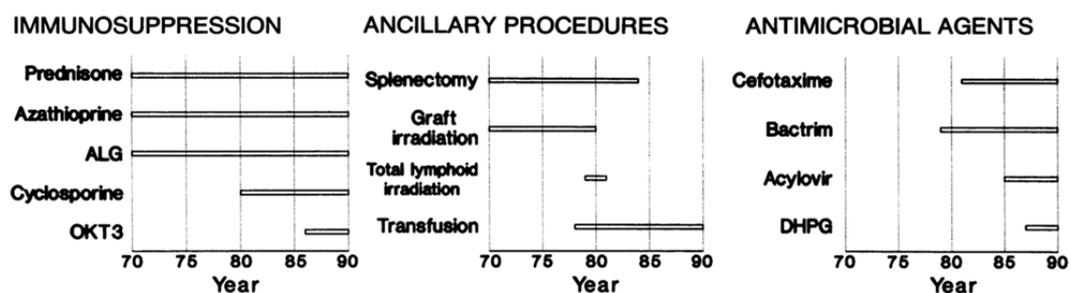


Figura 10. Evolución de los cambios significativos en el tratamiento de los receptores de riñón a lo largo de las décadas.

En 1985 se introdujo en la práctica clínica la CSA gracias a un ensayo clínico prospectivo y randomizado de Najarian JS et al., en el que comparó el efecto de la inmunosupresión en trasplantes renales de la ciclosporina versus la azatioprina (24). En ese ensayo la Ciclosporina obtuvo menos episodios de rechazo, menos infecciones y menores tiempos de hospitalización. Por ello este fármaco se unió a la terapia de inducción inmune postoperatoria convencional del momento, junto con la prednisona y la azatioprina (Figura 10). En la década de los 90 se introdujo el MMF y el TAC que permitió mejorar los resultados del trasplante renal obtenidos hasta la fecha (25,26). En diferentes estudios realizados a principios del 2000 confirmaron la mejora obtenida con el tratamiento inmunosupresor basado en TAC+MMF gracias a un menor ratio de pérdidas de injerto por rechazo respecto al tratamiento con Ciclosporina (27,28). Se ha de tener en cuenta que el ratio de pérdidas de injertos renales con el tratamiento inmunosupresor de Ciclosporina+Azatioprina era del 50% versus el 10% con el tratamiento de TAC+MMF.

Toda esta mejora en el mundo farmacológico del trasplante renal se pudo llevar a cabo gracias al mayor conocimiento histológico del riñón, derivado de la necesidad clínica de entender el motivo de los múltiples episodios de rechazo del injerto renal en los trasplantados renales y poder encontrar un tratamiento adecuado. La monitorización histológica del riñón llevado a cabo con el descubrimiento de las biopsias de protocolo permitió entender qué grado de efecto protector establecía la medicación inmunosupresora y cómo ello podía evitar desarrollar episodios de disfunción del injerto.

## **5. Monitorización histológica**

Las biopsias de protocolo o de seguimiento se empezaron a realizar a finales de los años 70 con el objetivo de caracterizar la presencia de lesiones subclínicas (rechazo celular y cambios borderline) en injertos renales con función renal estable, así como, fibrosis intersticial/atrofia tubular, hialinosis arteriolar o vasculopatía del injerto. En general, en la mayoría de los centros realizan dos biopsias de control, una biopsia precoz, aproximadamente a los tres meses de seguimiento y una biopsia tardía entre el primer y segundo año de seguimiento (29).

En 1997 se demostró que la presencia de fibrosis túbulo intersticial en biopsias de protocolo se asociaba a la supervivencia del injerto de forma independiente a la función renal (30). A partir de éste y otros artículos, como Isoniemi H et al. en 1994 y Dimény E et al. en 1995, se caracterizó la relación entre la inflamación subclínica, fibrosis subclínica y evolución del injerto (31,32).

### **5.1 Biopsias de protocolo**

Las biopsias renales permiten monitorizar el injerto renal tras el trasplante, así como, diagnosticar y establecer el mejor tratamiento posible dependiendo del grado de lesión objetivado (33).

Para poder estandarizar el diagnóstico histológico del aloinjerto renal en 1991 se reunieron un grupo de expertos en la ciudad canadiense de Banff (34).

A partir de los estudios llevados a cabo por investigadores en todo el mundo, el grupo de BANFF propuso un sistema de clasificación internacional, consensuado y estructurado para el diagnóstico y caracterización de la patología de la biopsia renal. A partir de esta primera reunión se realizaron reuniones cada 2 años con el fin de actualizar la clasificación.

La clasificación de Banff en 1993 consistió en cuatro categorías histológicas que representan el rechazo mediado por células: inflamación intersticial (i), tubulitis (t), endoarteritis (v) y glomerulitis del trasplante (g). Además de glomerulopatía del trasplante (cg), hiliariosis arteriolar (ah), engrosamiento intimal fibroso vascular (cv), fibrosis intersticial (ci) y atrofia tubular (ct) (34). En el documento de 1997 se propuso que el tamaño muestral mínimo para el diagnóstico histológico era de 10 glomérulos y 2 arterias para muestras adecuadas y 7 glomérulos y 1 arteria en caso de muestras marginales (35). Por otro lado, también se estableció el método de procesamiento adecuado con 3 laminillas de hematoxilina y eosina, 3 laminillas de PAS (periodic acid Schiff) y 1 laminilla con tricómico. En 1998 se añadió la categoría de expansión de la matriz mesangial (mm) y en la reunión de 2001 se definió el rechazo humoral agudo y se incorporó la tinción con CD4 en tejido parafinado o congelado (36). En 2003 se propuso un nuevo método para evaluar la capilaritis peritubular (ptc) (35). Además ese mismo año se definió el rechazo humoral crónico (37). Ambas entidades se definen a partir de lesiones histológicas a nivel de microscopía óptica, electrónica, presencia de C4d y anticuerpos donante específicos.

La clasificación revisada en 2007 agregó una categoría más referente al total de inflamación (ti) en áreas de cicatrices y sin cicatrices basadas en interpretaciones evolutivas de infiltrados intersticiales (38). En 2013 se definieron los criterios para diagnosticar el rechazo humoral (39). Se modificaron los criterios y se aceptó la existencia de casos de rechazo humoral C4d negativos (39). En este documento se consideró que la tinción positiva para C4d podía ser reemplazada por la presencia de lesiones que reflejan la interacción entre los anticuerpos donante específicos y el endotelio. A parte de la positividad para C4d, la presencia de inflamación en la microcirculación o la presencia de marcadores moleculares de rechazo humoral permitían aumentar

la sensibilidad en el diagnóstico de esta entidad. La reevaluación de la inflamación intersticial mediada por células, en la reunión de Banff 2017, supuso la definición y los criterios de evaluación de la inflamación en las áreas de fibrosis intersticial y atrofia tubular, denominada i-IF/TA. Posteriormente, esta lesión se utilizó para definir el rechazo crónico mediado por células T (TCMR). Además, se definieron criterios histológicos que incluyen características con el rechazo agudo mediado por anticuerpos (ABMR) (36). En 2017 los criterios fueron revisados y uno de los temas principales fue si i-IFTA es un indicador potencial de enfermedad crónica del TCMR (40).

Finalmente en 2018, se definió el rechazo celular crónico como la presencia de inflamación en las áreas de fibrosis y la presencia de tubulitis en túbulos atróficos o la presencia de inflamación en las arterias con una íntima engrosada.

En la actualidad se distinguen las siguientes formas de rechazo: a.) rechazo celular agudo, b.) rechazo celular crónico, c.) cambios Borderline, d.) rechazo humoral agudo o activo, e.) rechazo humoral crónico activo (40).

## **5.2 Inflamación subclínica en injertos renales estables**

A principios de los años 90, en estudios realizados en biopsias de seguimiento, investigadores como Solez K et al. en 1993 y Rush D et al. en 1996 describieron la presencia de lesiones indistinguibles del rechazo en pacientes con función renal estable. Se describió que el rechazo subclínico se asocia a la progresión de la fibrosis intersticial (41,42) y a una menor supervivencia (43,44).

Rush et al., en un ensayo clínico prospectivo y randomizado describieron que el tratamiento del rechazo subclínico en biopsias de seguimiento realizados al mes, 2 y 3 meses postrasplante se asociaba a una mejor función renal y menos progresión de la fibrosis intersticial (43). Posteriormente, se observó que la prevalencia de rechazo subclínico dependía del tipo de tratamiento inmunosupresor, siendo menor en los pacientes tratados con tacrolimus, mofetil micofenolato y prednisona que en los pacientes tratados con ciclosporina,

mofetil micofenolato y prednisona (45,46). En otros estudios, se observó que el tacrolimus reduce la infiltración aguda intersticial por los linfocitos y el MMF reduce la tubulitis. Y la combinación de TAC+MMF reduce considerablemente el rechazo a los 3 meses y mantiene una inmunosupresión efectiva; tal y como sugiere el estudio de Tippner C et al. en 2001 (26).

Se pudo confirmar que la actividad inmunológica continuada resulta en un daño histológico crónico. Se siguieron buscando qué factores inmunológicos podrían estar relacionados con el rechazo subclínico y Choi BS et al. en 2005, en su estudio con 304 biopsias de protocolo a los 14 días post trasplante en pacientes trasplantados de vivo, concluyó la importancia de reducir el número de mismatch HLA DR para disminuir la incidencia de rechazo agudo (27).

Más recientemente, se ha descrito que la presencia de rechazo humoral subclínicos en biopsias realizadas al año de seguimiento se asocia a una peor supervivencia del injerto (47).

## **6. Monitorización inmunológica**

### **6.1 Anticuerpos anti HLA**

El tratamiento inmunosupresor tiene como objetivo que el organismo del receptor acepte el órgano implantado del donante, manteniendo una actividad inmunológica basal para poder hacer frente a infecciones o neoplasias. Cuando el organismo del receptor no acepta el injerto renal se produce una respuesta del sistema inmune en la que participan tanto la inmunidad innata, como la inmunidad adquirida mediada por los linfocitos T y por los anticuerpos. En la práctica clínica actualmente la monitorización de anticuerpos anti-HLA es la técnica elegida para monitorizar el estado tanto del injerto renal como del sistema inmunológico del receptor. La monitorización de anticuerpos anti-HLA se realiza previo al trasplante y post-trasplante (48).

Las moléculas HLA son glucoproteínas de membrana implicadas en la presentación de antígenos a las células T y se dividen en dos grandes grupos:

- Moléculas HLA de clase I: se expresan en todas las células nucleadas y presentan antígenos procedentes de las células T CD8+ o citotóxicas. Los genes que codifican las moléculas HLA de clase I se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 e incluyen los loci HLA-A, -B y -C.
- Moléculas HLA de clase II: presentan péptidos captados por vía endosomal a las células T CD4+ o colaboradoras y se expresan en las CPA (células presentadoras de antígeno). Los genes que codifican las moléculas HLA de clase II se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 e incluyen los loci HLA-DR, -DQ y -DP. (49)

Una de las principales características de las moléculas HLA es su elevado polimorfismo, esta variabilidad constituye la base molecular del rechazo. Por ello, se disponen de diferentes métodos para identificar este polimorfismo HLA (tipificación HLA)

El método más sencillo y rápido es el serológico, que se basa en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y se desarrolló en la década de los años 60. Su principal limitación es su baja sensibilidad. La prueba cruzada (crossmatch, XM) se realiza para descartar la presencia de DSA preformados. La primera que se desarrolló se basó en la capacidad de algunos anticuerpos para activar la cascada del complemento (XM-CDC). En 1969, Patel R et al. describieron la fuerte asociación entre el fallo renal temprano y un resultado positivo de esta prueba (48).

En los años 80 se introdujo la citometría de flujo y se mejoró la sensibilidad para la detección de aloanticuerpos anti-HLA mediante el empleo de anticuerpos monoclonales secundarios (anti-IgG) conjugados con fluorocromos. En la década de los 90 surgieron los primeros ensayos en fase sólida que solubilizan e inmovilizan las moléculas HLA sobre un soporte sólido (50). A partir del año 2003 la tecnología Luminex revoluciona el área de la histocompatibilidad y actualmente es el método de referencia debido a su gran sensibilidad y reproducibilidad (51). Esta técnica utiliza moléculas HLA purificadas a partir de líneas celulares linfoblásticas e inmovilizadas sobre microesferas de poliestireno, que contienen una mezcla determinada de fluorocromos. Cada microesfera está cargada, o con un conjunto de antígenos

HLA (lo que permite detectar la ausencia o presencia de anticuerpos frente a las moléculas de clase I y/o II) o bien con una única especificidad HLA (single antigen bead, SAB) lo que permite definir individualmente las especificidades antigénicas frente a las que el suero presenta anticuerpos.

En la práctica clínica se han evaluado algunas estrategias para tratar de definir el riesgo inmunológico de un anticuerpo detectado en fase sólida (SAB). La primera de estas estrategias cuantifica el anticuerpo (mediante su valor de MFI, intensidad media de fluorescencia) asumiendo que dicho valor es una medida de su concentración. Bajo esta premisa, únicamente los anticuerpos anti-HLA cuyo valor de MFI supere un umbral (suele estar entre 3.000-5.000 MFI) se consideran de alto riesgo. Aunque valores altos en los niveles de MFI no siempre indican un alto título de anticuerpo, por ello la dilución del suero parece ser la estrategia más fiable para definir un MFI más real (52). No obstante, la relación de este ajuste con el resultado del trasplante está todavía por confirmarse. La segunda estrategia pretende definir el riesgo patológico de un anticuerpo sobre su capacidad para fijar el complemento. Esta capacidad de activar el complemento se puede evaluar in vitro a través de diversas modificaciones del ensayo SAB original, que permiten la detección de C1q, C4d o C3d (53) unidos a los complejos antígeno-anticuerpo.

La utilidad clínica de estos ensayos ha sido discutida y en algunos trabajos publicados no encuentran asociación entre la capacidad de fijar el complemento de un anticuerpo y el riesgo de fallo prematuro (54) en cambio otros sugieren que esta capacidad define mejor el riesgo de AMR (55) y mejora la predicción de fallo renal (56).

## **6.2 Subpoblaciones linfocitarias**

Unas de las complicaciones habituales del trasplante renal son los episodios de rechazo agudo o infecciones. Ambas complicaciones se han asociado con diferentes subpoblaciones linfocitarias, gracias a la monitorización de las mismas (57). Como antes se ha comentado, el tratamiento inmunosupresor tiene el objetivo de modular la respuesta inmune. Este proceso de modulación lo realiza modificando la diferenciación y

proliferación de distintos subtipos de linfocitos circulantes. Cuando se produce el rechazo agudo se activa la respuesta inmune contra el injerto. Esta activación la inician las células presentadora de antígeno (CPAs) cuando a través de las moléculas HLA de clase I y de clase II presentan los aloantígenos del donante. Esta respuesta inmune contra el injerto produce la activación de las células T naïve que, posteriormente, se diferenciarán en las diferentes subpoblaciones linfocitarias que actualmente conocemos:

- Linfocitos T cooperadores (CD4): Th1, Th2 y Th17
- Linfocitos T citotóxicos (CD8)
- Células inmunoregulatoras Treg: capacidad protectora frente a la respuesta inmune

El efecto protector de las células Treg frente a los linfocitos CD4 y CD8 es de vital importancia para mantener la supervivencia del injerto renal. La modulación de estas subpoblaciones linfocitarias se lleva a cabo por el tratamiento inmunosupresor con la combinación de Tacrolimus y con Mofetil Micofenolato. Ambos fármacos modifican la transcripción de genes Th1 y preservan los fenotipos moleculares de la respuesta mediada por las células Th2 reguladoras. Este tratamiento farmacológico permite una protección óptima del injerto al modular la respuesta inmune(58).

## **7. Biomarcadores**

Después de un trasplante la función renal es controlada mediante la monitorizada clínica incluyendo parámetros en analíticas de sangre y orina como la creatinina, proteinuria, filtrado glomerular y mediante la monitorización histológica con las biopsias tanto de seguimiento como de causa. Pero tanto los parámetros en suero como las biopsias tienen limitaciones. Los parámetros en suero incrementan o varían sus estados basales de forma inespecífica por cualquier daño producido en el riñón. Únicamente por los niveles de creatinina no se puede ni predecir ni evaluar la progresión de un daño crónico en el injerto dada su inespecificidad y capacidad predictiva (59). Varios estudios han proporcionado evidencia para apoyar la orina como método de monitorización

del rechazo en el trasplante renal (12). Se descubrió que las quimiocinas CXCL10 y CXCL9 estaban elevadas en la orinas hasta 30 días previos al rechazo agudo. Asimismo, las transcripciones urinarias de productos de células citotóxicas como la perforina y la granzima B aumentan en pacientes con rechazo versus lo no rechazo. Además, se comprobó que el tratamiento antirechazo proporcionó una disminución en los niveles de estas quimiocinas (60,61).

### **7.1 Microarrays en sangre periférica**

El uso de perfiles de expresión de genes en sangre periférica como medio mínimamente invasivo para evitar la necesidad de una biopsia se ha estudiado en varios grupos de investigación. Los primeros estudios se centraron en encontrar genes diferencialmente expresados en pacientes con diagnóstico de rechazo, para poder diferenciar a pacientes con rechazo de pacientes con ausencia de rechazo. Fruto de estas investigaciones han sido varios los set de genes que se han patentado para poderse utilizar como herramienta para la detección de pacientes con rechazo sin necesidad de realizar una biopsias, como pueden ser el TruGraf (38) o el kSort (62).

En el estudio de Kurian SM et al. seleccionaron 148 muestras de biopsia renal y de sangre periférica pareadas de pacientes trasplantados renales. Las biopsias fueron tanto de seguimiento como de causa y se clasificaron según los criterios de Banff 2007. De las 148 muestras de biopsia renal 46 tenían un diagnóstico histológico normal, 63 tenían un diagnóstico de rechazo agudo y 39 pacientes presentaban disfunción aguda del injerto pero sin evidencia de rechazo. Dividieron las muestras en dos cohortes, una exploratoria y una de validación. En este estudio validaron el TruGraf como un set de 200 genes que mide los niveles de expresión diferencial de genes de rechazo de los pacientes trasplantados renales con el fin de poder monitorizar injertos estables y proporcionar una detección temprana de los injertos que pueden desarrollar rechazo (59).

Por otro lado, en el estudio de Roedder S et al. presentaron los resultados del estudio multicéntrico AART (Valoración del rechazo agudo en el trasplante

renal) en el que mediante la técnica de kSort “Transcriptional kidney solid organ response test” (test transcripcional de respuesta de órganos sólidos renales) validaron un set de 17 genes específicos de rechazo agudo (62). Estos grupos de genes diferencialmente expresados en pacientes con y sin rechazo no permiten sustituir a la biopsia ya que su sensibilidad y especificidad son relativamente bajas.

Otros estudios habían enfocado el uso de sangre periférica como herramienta para encontrar genes diferencialmente expresados en pacientes con diagnóstico de rechazo subclínico. En 2017 Crespo et al. evaluaron la capacidad predictiva del test kSort y del ensayo ELISPOT (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos) en 75 pacientes trasplantados renales a los que les realizaron una biopsia de seguimiento a los 6 meses. Ambas técnicas se realizaron individualmente y en combinación para optimizar el uso de predecir el riesgo de padecer un rechazo agudo subclínico. Concluyeron la necesidad de realizar ambas técnicas para aumentar la capacidad de predecir a pacientes con un alto riesgo de padecer un rechazo agudo subclínico (63). El mismo año, Kurian SM et al. describieron los resultados obtenidos al comparar los resultados diagnósticos en 69 pacientes tanto de sangre periférica como de tejido renal. Los pacientes se dividieron en tres grupos diagnósticos: biopsias normales con una función renal estable, biopsias con rechazo agudo subclínico y biopsias con rechazo agudo. Al comparar los resultados de los microarrays se comprobó una fuerte correlación entre la expresión diferencial de genes tanto en tejido como en sangre (64).

Un estudio internacional relevante en 2016 fue el GoCar (Genómica del rechazo crónico del aloinjerto) que tenía el propósito de identificar genes correlacionados con el índice de daño crónico del injerto (CADI) a los 12 meses en pacientes con una biopsia normal a los 3 meses. Descubrieron 13 genes en biopsias de aloinjertos renales con un funcionamiento estable que predicen el desarrollo y progresión del daño crónico del injerto y su posterior pérdida (65). En 2019 Zhang W et al. realizaron un estudio en el que examinaron los cambios histológicos y subclínicos en los receptores de trasplante renal del estudio prospectivo GoCar a los que les realizaron una monitorización con biopsias a los 3,6,12 y 24 meses. Con estas biopsias pudieron identificar a los

pacientes con riesgo a padecer un rechazo celular agudo subclínico o borderline a los 3 meses. A partir de 88 muestras de sangre periférica obtenidos de pacientes trasplantados renales desarrollaron un set de 17 genes asociados a rechazo celular agudo subclínico en biopsias de 3 meses (ACR-3) (66).

En este mismo año, Van Loon E et al. han presentado los resultados del estudio multicéntrico prospectivo BIOMARGIN (Biomarcadores de lesiones del injerto renal). A todos los pacientes incluidos en el estudio en el momento que se les realizaba una biopsia renal, ya sea de seguimiento o de causa, también se les recogía una muestra de sangre periférica. En las dos primeras fases del estudio identificaron un set de 8 genes (CXCL10, FCGR1A, FCGR1B, GBP1, GBP4, IL15, KLRC1, TIMP1) que discriminaba entre casos de pacientes diagnosticados con y sin rechazo mediado por anticuerpos. Además, identificaron que la expresión diferencial de estos genes está correlacionada con la inflamación microvascular y glomerulopatía del trasplante, pero no con el rechazo mediado por células T. En la cohorte de validación del estudio Biomargin confirmaron estos 8 genes como un método diagnóstico no invasivo para el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos (67).

Todos estos estudios han permitido el desarrollo de un prototipo diagnóstico que se podría utilizar como herramienta clínica para monitorizar a los injertos renales y poder controlar la inflamación subclínica, así como para detectar episodios de rechazo. Pero, hasta la fecha, de todos los estudios que han presentado listados de genes diferencialmente expresados en el rechazo evaluados en sangre periférica no existe una paridad en los resultados, y han sido múltiples los genes descritos.

El desarrollo de biomarcadores no invasivos, fiables y predictivos para el diagnóstico temprano y el seguimiento de cualquier afección clínica después del trasplante de riñón es esencial para un tratamiento personalizado e individualizado (68,69). La estrategia de realizar perfiles moleculares mediante los microarrays en tejido ha demostrado ser una herramienta que podría mejorar los resultados obtenidos con los listados de genes asociados a rechazo en sangre periférica para evaluar biopsias de trasplante renal.

## 7.2 Microarrays en biopsias renales

La Biología Molecular a través de los microarrays quería ser una herramienta de apoyo para poder diagnosticar y clasificar el rechazo de los aloinjertos renales. En los primeros estudios con microarrays se llevaban a cabo con biopsias renales de indicación.

. En 2003 Sarwal et al. analizaron los perfiles de expresión génica en 67 biopsias renales con diferentes diagnósticos histológicos y encontraron genes diferencialmente expresados asociados a todos los grupos: rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto, biopsias normales y biopsias con efectos nefrotóxicos por fármacos. Encontraron genes asociados a rechazo por no pudieron diferenciar los tipos de rechazo.

Flechner et al., al año siguiente publicaron un artículo donde compararon biopsias con TCMR y Borderline con biopsias sin rechazo. Encontraron un set de genes específicos de rechazo que incluían transcritos relacionados con la inflamación y la inmunidad. Su clasificación diferenciaba las biopsias con rechazo de las biopsias normales, pero no diferenciaban el rechazo de otros tipos de diagnóstico (70). Al tener el TCMR del ABMR perfiles moleculares parecidos (71), Reeve J et al. en 2009 realizaron un clasificador basado en genes para diagnosticar el rechazo, independientemente de su tipo (72).

Habían sido muchos los estudios que se habían centrado en el perfil molecular renal en los últimos años, pero todavía faltaba una prueba clínica molecular que fuera capaz de caracterizar y predecir el rechazo en el trasplante de riñón.

El Centro de Genómica Aplicada de Trasplantes de Alberta (ATAGC) dirigido por el Dr. Philip Halloran comenzó el desarrollo de un sistema integral que llamaron el Microscopio Molecular (MMDx) que utiliza algoritmos informáticos basados en datos de expresión génica para analizar el rechazo y lesiones en las biopsias renales. El desarrollo del sistema MMDx requirió inicialmente la investigación de genes de interés en diferentes sistemas experimentales, como líneas celulares, y biopsias humanas. De estas investigaciones resultaron listas de conjuntos de genes denominados conjuntos

de transcripciones basadas en patogénesis (PBT) (71,73). Aunque los PBT no se utilizan para proporcionar un diagnóstico, sí proporcionan una comprensión de las vías biológicas afectadas por el estado del injerto renal dañado (74).

ATAGC obtuvo los conjuntos de sondas de los microarrays relacionadas con el rechazo y las diferentes lesiones mediante el análisis de asociación. A partir de las asociaciones se crearon clasificaciones para predecir los diagnósticos de enfermedades y la gravedad de varias variables clínicas e histológicas. Hasta la fecha, los datos de los pacientes comprenden un total de 1208 biopsias de trasplantes de riñón completamente fenotipadas. A medida que se cartografiaba el tipaje molecular del riñón post trasplantado, se agregaron clasificadores que diferenciaban el ABMR(75) y TCMR (76), que predicen la pérdida del injerto (77), cuantifican el daño agudo del injerto renal (78,79) y también cuantifican la atrofia por fibrosis (80).

El refinamiento continuo de los algoritmos ha permitido definir un conjunto de fenotipos de rechazo puros que además de permitir diferenciar el no rechazo, TCMR y rechazo mixto, también diferencia el ABMR en etapas tempranas, completamente desarrolladas y en etapas tardías (81). En el estudio de Sellares et al. describieron los resultados de las primeras 403 biopsias de trasplante de riñón utilizadas como conjunto de referencia para diseñar los clasificadores del ABMR para el sistema MMDx, que permitían diferenciar entre las anomalías de la microcirculación y la fibrosis general (76). Para validar todavía más esta clasificación y evaluar su impacto potencial en la práctica clínica, se realizó el estudio internacional colaborativo de microarrays (INTERCOM). La puntuación obtenida de los resultados para el diagnóstico de ABMR tuvo mucha correlación con las lesiones histológicas de ABMR y DSA, pero no con las lesiones de TCMR (74). Se confirmó en este estudio y otro del mismo grupo la existencia de un conjunto de genes que se expresan en el ABMR y en el TCMR (82).

En 2017 por el mismo grupo se realizó una extensión del ensayo INTERCOM, denominado INTERCOMEX, con el objetivo de evaluar la viabilidad de la técnica del microscopio molecular (MMDx) utilizándolo para evaluar biopsias con diagnósticos de TCMR y de ABMR. Los diagnósticos

ofrecidos por MMDx de estas biopsias fueron comparados, posteriormente, con los diagnósticos revisados por el propio Dr. Philip Halloran. En el estudio confirmaron que la evaluación en tiempo real con la técnica de MMDx es factible y útil para la práctica clínica habitual(83).

Todos los estudios descritos se habían centrado en el perfil molecular con los microarrays en tejido para encontrar una expresión diferencial de genes específicos de rechazo, así como para diferenciar entre el TCMR y el ABMR del resto de diagnósticos. Pero el mismo grupo de Halloran se centraron también en el diagnóstico de cambios Borderline para comprobar si existía una expresión diferencial de genes de rechazo. En 2012, De Freitas DG et al. presentaron los resultados del estudio en el que compararon biopsias con cambios borderline, biopsias con TCMR y biopsias sin rechazo. Estudiaron la expresión génica en todos los grupos y observaron que un 33% de los casos diagnosticados como cambios borderline por la histología se podrían rediagnosticar como TCMR y un 67% como biopsias sin rechazo. Concluyeron que los diagnósticos con histología y con microarrays no son excluyentes y que utilizando ambos se puede obtener un diagnóstico más preciso para estos casos clínicos. Hasta la fecha se siguen publicando artículos relacionados con el diagnóstico de cambios Borderline como el de Nankivell BJ et al., en el que confirman que el diagnóstico de cambios Borderline es un grupo diagnóstico muy heterogéneo, que va desde una inflamación muy leve hasta un diagnóstico que deriva en TCMR (84).

Respecto al diagnóstico IFTA, varios estudios han confirmado su asociación al deterioro de la función renal y pérdida del injerto (85). Así como, se han identificado una expresión diferencial de genes de rechazo en pacientes diagnosticados de IFTA, ya sea en biopsias de seguimiento como de causa (86).

## **7.2 Citocinas**

La medición de los niveles de los fármacos inmunosupresores en sangre es la herramienta más utilizada para controlar la propia inmunosupresión del trasplante renal. La inmunosupresión excesiva genera infecciones o neoplasias

malignas y la sub inmunosupresión está asociada a un mayor riesgo de rechazo o una lesión crónica del injerto. Conocer los niveles del medicamento inmunosupresor es útil pero ,generalmente, para poder diferenciar el rechazo de la toxicidad es necesaria una biopsia (87). El rechazo agudo es una complicación común después del trasplante y se asocia con una reducción de la supervivencia del injerto (88). Las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares son las principales causas de muerte después del trasplante renal (89); en todas ellas el nexo común es la inflamación.

En 2009 Abedini S et al. presentaron los resultados del estudio ALERT en el que confirmaron la interleucina 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (PCR) como marcadores de inflamación que estaban asociados de forma independiente a un mayor riesgo de padecer eventos cardiovasculares y de mortalidad (90) . Tres años más tarde, el mismo grupo confirmó que la IL-6 y la PCR están asociados con una menor supervivencia del aloinjerto a largo plazo (91). Actualmente, en la práctica clínica, para poder medir el grado de inflamación en los pacientes se monitoriza la PCR (92). Así mismo, la medición de otras moléculas, como son las citocinas y quimiocinas, también permite monitorizar la inflamación en los pacientes trasplantados renales (93).

Las citocinas son generalmente responsables de la respuesta de las células T CD4+ efectoras: TH1 y TH2. Los linfocitos TH1 son activados gracias al INF gamma y producen IL-2, TNF-alpha y IFN-alpha. Mediante la activación de los macrófagos estos linfocitos participan en la hipersensibilidad retardada y la actividad citotóxica (94). Los linfocitos TH2 son activados gracias a la IL-4 y producen IL-5, IL-6, IL-4, IL-10, IL-13. Estos linfocitos participan en la producción de anticuerpos. La activación desregulada de citocinas proinflamatorias o reguladoras juega un papel importante en la susceptibilidad a la enfermedad y a la progresión del trasplante renal (95). Por ello la inducción a la tolerancia inmunológica específica con la supresión de IL-6, IL-12, TNF-alpha y otras citocinas pro inflamatorias sigue siendo un objetivo importante del trasplante de órganos (96).

Las células reguladoras T CD25+ son un linaje separado de las células CD4+, y tienen un papel importante en la tolerancia inmune. Las células T

reguladoras (Treg) inducen la tolerancia aloantígeno y previenen el rechazo de trasplantes de órganos a través de células T proinflamatorias que tienen la función de suprimir la respuesta y modifican la función de las células presentadoras de antígenos (97). Las células Treg ejercen su función supresora indirectamente mediante la secreción de citocinas antiinflamatorias, principalmente el factor de crecimiento transformante (TGF-beta 1) y la IL-10 (98).

Por otro lado, las células Th17 que expresan el receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico (ROR $\gamma$ t) han sido reconocidos como mediadores tempranos vitales en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y el rechazo del aloinjerto por sus citocinas efectoras: IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (99). La liberación de IL-17 contribuye en las células efectoras (linfocitos y neutrófilos) y a la posterior secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-23, TNF-alpha) y quimioquinas (CXCL1 y CXCL2), provocando un estado proinflamatorio (100).

El equilibrio entre citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias además del equilibrio entre Treg/Th17 es crucial para mantener una respuesta inmune normal y preservar la función del injerto renal. Tal y como lo confirmaron en un estudio reciente Mortazavi H et al. a principios de este año (94). Otros estudios recientes han confirmado la relación existente entre la expresión de IL-2 en células T CD4+ y episodios de rechazo(101). Así como, la utilidad de la IL-6 como marcador de riesgo inmunológico para poder evaluar el grado de inflamación en pacientes trasplantados renales (102).

El objetivo de todos los estudios es poder encontrar un biomarcador, como las citocinas, que se pueda trasladar a la práctica clínica habitual para poder monitorizar de una forma no invasiva a los pacientes trasplantados renales



# **Hipótesis y objetivos**



## **Hipótesis**

La inflamación del aloinjerto renal se asocia a un aumento de la inflamación sistémica.

## **Objetivo principal**

Caracterizar la contribución de la inflamación del injerto renal a la inflamación sistémica.

## Objetivos secundarios

- Evaluar la severidad de la inflamación en biopsias del injerto renal y su relación con las citocinas en sangre periférica.
- Caracterizar los genes asociados a rechazo mediante microarrays en tejido y en sangre periférica.



# **Material y métodos**



El diseño del estudio ha sido el siguiente:

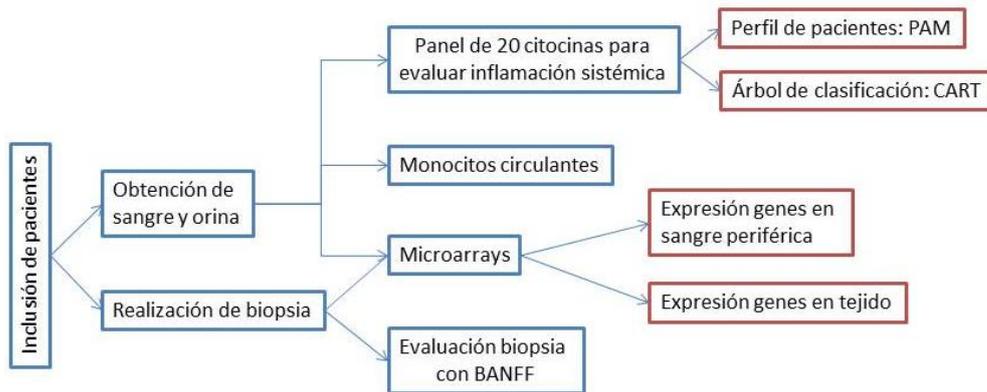


Figura 11. Esquema del diseño experimental del estudio

Se han incluido 236 pacientes consecutivos a los que se les ha realizado una biopsia renal, ya sea de seguimiento o por causa, y se ha obtenido muestra de sangre periférica para la medición de un panel de citocinas, entre julio de 2015 y abril de 2019.

**Diseño del estudio:** Se trata de un estudio observacional, de un solo centro, transversal, con seguimiento prospectivo a 5 años. Se han incluido pacientes consecutivos a los que se ha realizado una biopsia del injerto ya sea de seguimiento o de causa. En el momento de la biopsia se ha obtenido un cilindro de tejido adicional para realizar un microarray y se han obtenido alícuotas de suero y de células mononucleares periféricas para realizar también un microarray.

**Criterios de inclusión:** Pacientes  $\geq$  de 18 años, trasplantados en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón a los que se realice una biopsia renal y firmen el consentimiento informado para participar en el estudio y reciban tratamiento inmunosupresor basado en tacrolimus.

**Criterios de exclusión:**

- Infección sistémica activa
- Neoplasia excepto carcinoma escamoso y basocelular cutáneo

### **Variables del estudio :**

- Variables clínicas: Se obtienen las variables demográficas (fecha de nacimiento, género, raza), antecedentes patológicos (evento cardiovascular, hipertensión, diabetes mellitus o dislipemia), enfermedad renal primaria glomerular, nefropatía diabética, nefroangioesclerosis, no filiada, otras, poliquistosis renal, tubulointersticial), tiempo de diagnóstico de la enfermedad renal (meses), tratamiento sustitutivo renal (si/ no), tipo (diálisis peritoneal, hemodiálisis o prediálisis) y duración (meses), número de incompatibilidades HLA (0 a 6), anticuerpos anti HLA pretrasplante (si/no), número de trasplante, características del donante (edad, sexo, tipo de donante (asistolia controlada, asistolia no controlada, muerte encefálica o vivo)), tiempo de isquemia fría, tratamiento inmunosupresor de inducción (Basiliximab, Daclizumab, No inducción, Timoglobulina), fecha del trasplante, función retardada del injerto (si/no), rechazo agudo (si/no), fecha del rechazo agudo, fecha de la biopsia, motivo de la biopsia (biopsia de seguimiento o biopsia por causa), indicación biopsia causa (Bk positivo, deterioro crónico, función renal subóptima, indicación, lenta recuperación de la función renal, proteinuria, retraso de la función del injerto), diabetes pre y post trasplante (si/no). Se determinó el peso (Kg) y la talla (cm) y se calculó el índice de masa corporal (IMC, kg/cm<sup>2</sup>). Además se recogieron las siguientes variables de seguimiento hasta abril de 2019: pérdida de injerto (si/no), exitus (si/no), enfermedad cardiovascular (si/no).

Previo a la realización de la biopsia renal al paciente se le realiza una analítica y se obtienen muestras de sangre:

- Muestra de suero (analítica convencional): Hemoglobina (Hb g/dl), Ferritina ( Ferr0 ng/dl), glucemia basal (Glu0 mg/dl), insulinemia (Ins0 UI/ml), índice HOMA (insulina\* glucemia/22.5), Hb glicosilada (HbAC0 %), perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, LDL, VLDL (mg/dl), creatinina sérica (mg/dl), cociente proteinuria/creatinina (mg/g), cociente microalbuminuria/creatinina (mg/g), cociente sodio/creatinina (mg/g), cociente potasio/creatinina (mg/g), Ca (mg/dl),

P (mg/dl), 25 vitamina D3 (25vitD0 pg/ml), Paratrina (PTH-i pg/ml), lipoproteína (Lpa0 mg/dl), Proteína C reactiva (PCRus0 mg/L), linfocitos T (%), leucocitos (%), monocitos (%). En aquellos individuos no diabéticos se ha realizado una prueba de tolerancia oral de glucosa (TTOG).

- Panel de 20 citocinas en suero: Se-Selectina; GM-CSF; ICAM-1/CD54; IFN alpha; IFN gamma; IL-1 alpha; IL-1 beta; IL-4; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12p70; IL-13; IL-17A/CTLA-8 ; IP-10/CXCL10; MCP-1/CCL2; MIP-1alpha/CCL3; MIP-1 beta/CCL4; Sp-Selectina; TNF alpha, mediante técnica de luminex.
- Monocitos circulantes: caracterización del número total de monocitos circulantes y de las subpoblaciones CD14+ +CD16-, CD14++CD16+. CD14+CD16+ mediante citometría de flujo.

La biopsia del injerto renal fue realizada mediante guía ecográfica. En cada biopsia se obtuvieron, 3 cilindros mediante pistola de 18G. Uno de los cilindros se utilizó para la histología (hematoxilina-eosina, PAS y tricómico de Masson, el segundo cilindro para el C4d y el tercer cilindro para el estudio con microarrays. Cada biopsia para ser válida tenía que tener al menos un glomérulo, una arteria y con suficiente material túbulo-intersticial para evaluar inflamación, tubulitis, fibrosis intersticial y atrofia tubular. El depósito de C4d se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta en congelado. Las muestras de biopsias analizadas fueron de muestras de seguimiento (de 3 meses como de 1 año), así como de causa.

El resto de muestras de sangre y de tejido fueron enviadas al Biobanco donde se procesaron y almacenaron para su posterior análisis.

## **8. Obtención de suero para medición de un panel de 20 citocinas**

En este estudio se han obtenido 236 muestras de suero de pacientes entre junio de 2015 y abril de 2019. Con estas muestras se ha medido los niveles circulantes de 20 citocinas asociadas con la inflamación sistémica mediante inmunoensayo utilizando la tecnología LUMINEX xMAP (Luminex

Corporation). Se utilizó el panel pre-configurado Human Inflammation 20-plex ProcartaPlex Panel (Thermofisher Scientific)

### Principio de la técnica

El inmunoensayo se basa en el principio de los enzimoimmunoensayos de tipo sandwich, que utilizan dos anticuerpos específicos que se unirán a diferentes epítomos del analito a estudiar (Figura 12). La tecnología LUMINEX xMAP permite la detección simultánea de 20 analitos mediante el uso de microesferas magnéticas. Estas microesferas están cubiertas con el anticuerpo específico frente a un analito. Para discriminar una microesfera de otra, estas contienen en su interior un fluorocromo capaz de emitir fluorescencia a una longitud de onda única, lo que permite la detección simultánea de todos los analitos.

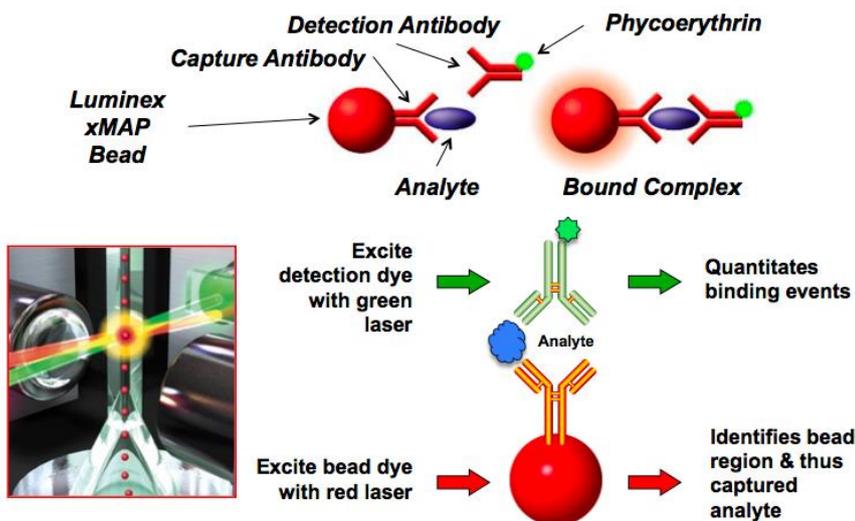


Figura 12. Esquema del procedimiento llevado a cabo con la tecnología LUMINEX xMAP (Luminex Corporation)

### Procedimiento

El procedimiento que se siguió para todas las placas fue el indicado en el insert de la técnica. Brevemente, las muestras de suero se descongelaron en frío, se homogenizaron con un vórtex y se centrifugaron a 300g durante 5min para eliminar impurezas que puedan interferir en la técnica. Se añadieron 25uL de muestra a la placa que contiene ya las microesferas, y se incubó durante 2h en agitación (500rpm). Alternativamente se puede dejar incubando 18h en

nevera. Posteriormente y tras realizar los correspondientes lavados situando la placa en el soporte magnético, se incubó durante 60min en agitación (500rpm) con el anticuerpo secundario biotinilado. Para poder leer la fluorescencia se añade la estreptavidina conjugada con ficoeritrina.

Para poder cuantificar la concentración exacta de cada analito en cada placa se realiza una curva patrón con standards incluidos en el kit. Para asegurar la robustez de los resultados obtenidos, cada muestra y estándar se realizó por duplicado y se descartaron aquellas muestras con coeficientes de variación superiores a 30.

## **9. Obtención de células mononucleares periféricas en sangre periférica**

En un subgrupo de 94 pacientes trasplantados renales se les recogieron muestras tanto de sangre periférica como de tejido renal entre junio de 2015 y agosto del 2018. Estas muestras de sangre periférica y de tejido fueron procesadas para poder realizar el estudio con microarrays.

A partir de la sangre del paciente recogida en un tubo EDTA se separaron las células mononucleadas mediante el método Ficoll. El procedimiento fue el siguiente:

### Material:

- Ficoll Plaque Plus
- PBS estéril (Phosphate Buffered Saline)
- Tubos cónicos de 15ml, tipo Falcon, estériles
- Puntas de micropipeta estériles
- Pipetas serológicas o pipetas Pasteur estériles
- Criopreservación: DMSO (Sigma, referencia: D2650)
- Trypan blue
- Cámara de contaje celular
- Microscopio

- Extracción de ARN: solución de RNALATER

#### Operaciones previas:

1. La muestra de sangre periférica se debe recoger en presencia del anticoagulante más apropiado en función de los estudios a los que se destina la muestra:
  1. EDTA: extracción de ADN
2. Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la extracción sanguínea y la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  sea de máximo 1,5 horas tras la extracción.
3. Mantener los tubos con la sangre a  $T^{\text{a}}$  ambiente ( $18-22^{\circ}\text{C}$ ) hasta 24 horas desde su extracción. El tiempo tras la extracción no debe exceder de dos días si se realiza en heparina, para que la viabilidad de los PBMCs (células mononucleares periféricas en sangre periférica) no se vea comprometida.
4. Hay que trabajar en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.
5. Se han de preparar etiquetas para marcar los tubos necesarios.

#### Descripción del procedimiento

1. Se centrifugan los tubos de sangre a 1500g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utiliza una centrífuga 5810R.
2. En la cabina de seguridad se aspira el plasma sin coger las células mononucleadas, que forman una capa blanca por encima de los eritrocitos y granulocitos. El plasma se desecha o se alícuota.
3. Se aspiran 2 ml de la capa de células mononucleadas y se depositan en un tubo Falcon de 15 que contenga 4 ml de PBS (volumen final aprox de 6 ml).
4. Invertir el tubo para mezclar bien la solución y/o utilizar una pipeta de 10 ml para homogeneizar.
5. Añadir Ficoll a un tubo Falcon de 15ml. Añadir un volumen de Ficoll (3 ml) por cada dos volúmenes de sangre (aprox 6ml).
6. Añadir sobre el Ficoll la solución de células con PBS del paso 4. Para ello tener el tubo lo más horizontal posible y depositar suavemente el volumen sobre la fase de Ficoll.
7. Centrifugar el tubo a 500 g durante 15 min a  $18-25^{\circ}\text{C}$  sin aceleración y sin freno.

8. Extraer el halo blanco de PBMCs (CMSPs) transferirlo a un tubo Falcon estéril. Completar el volumen con PBS. La interfase celular debe de estar claramente definida como una nube blanquecina sin agregados ni cúmulos celulares grandes. Si por inspección visual no se ven las células, se centrifugan otra vez.
9. Centrifugar el tubo a 500g durante 10 min a 18-25°C.
10. Eliminar el sobrenadante de los tubos por decantación procurando no romper el pellet celular. Resuspender el pellet obtenido en PBS. Mezclar con suavidad para no formar burbujas.
11. Centrifugar el tubo a 500g durante 10 min a 18-25°C.

## **10. Extracción de ARN de las células mononucleadas periféricas**

Una vez separadas las células mononucleadas se extrajo el ARN total mediante el kit RNA tissue SII (RT-S2) de Fujifilm. El procedimiento fue el siguiente:

### Material

- 2-Mercaptoetanol
- Espectrofotómetro (Nanodrop u otros)
- Etanol >99%
- Guantes
- Hielo
- Kit QuickGene RNA tissue SII (RT-S2) que incluye:
  - LRT: Lysis Buffer
  - WRT: Wash Buffer
  - CRT: Elution Buffer
  - CA: Cartuchos
  - CT: Tubos de recogida
  - WT: Tubos de desecho
- Microcentrífuga

- Micropipetas y puntas con filtro
- QuickGene 810
- RNase-free DNase set (QIAGEN)
- Tubos eppendorf de 1,5ml
- Tubos centrífuga: tubos cónicos para tampones de lavado (50ml) y elución (15ml)
- Vórtex

### Operaciones previas

12. Si las muestras de células están almacenadas a -80°C, mantenerlas en el congelador o en nieve carbónica hasta que se vaya a comenzar con la extracción de ARN.
13. Preparar etiquetas para marcar los tubos.
14. Preparación de los reactivos:
  1. RLT 85 ml: Si hay precipitados en RLT, incubar al baño maría a 37°C e invertir la botella de vez en cuando hasta que se disuelvan. Dejar enfriar a RT. Dispensar el volumen requerido y añadir 2-ME.
  2. WRT 120ml: Solución concentrada. Añadir 280ml de etanol >99% y mezclar suavemente antes de usar.
  3. Requerimientos de WRT con etanol y CRT: preparar la cantidad adecuada de acuerdo con el número de muestras a utilizar en el QuickGene.
4. Preparación de la DNasa siguiendo las instrucciones que contiene el kit.
5. Preparación del QuickGene 810.

### Descripción del procedimiento

#### **Lisis celular**

15. Lisis celular (<math>1 \times 10^6</math> céls)
16. Partir de un pellet de <math>1 \times 10^6</math> células
17. Añadir 520 microlitros de LRT y suplementar con 2-ME
18. Vortear a máxima velocidad durante 1 min
19. Centrifugar brevemente
20. Añadir 100 microlitros de etanol >99%

21. Vortear a máxima velocidad 5-15 segundos
22. Centrifugar brevemente
23. Añadir 180 microlitros de etanol >99%
24. Mezclar con pipeta o vortear a máxima velocidad 5-15 segundos

### **Purificación de RNA con QuickGene**

25. Transferir todo el lisado al cartucho del QuickGene
26. Poner las muestras en el cartucho y colocar el Holder Carriage en el quipo y cerrar la tapa frontal
27. Seleccionar el modo de extracción pulsando repetidamente el botón “mode” hasta que aparezca el modo “RNA cell” o “RNA cell plus”
28. El proceso habrá finalizado cuando el equipo emita dos pitidos y los tres indicadores de Binding, Washing y Elution estén encendidos.
29. Coger los tubos donde se encuentran las muestras (CT) y taparlos. El volumen final ha de ser de 100 microlitos. Si es de 50 microlitos, el rendimiento podría bajar (70-90%)
30. Proceder a la eliminación de desechos y limpieza del equipo con la operación “Discharge” del equipo

### **Cuantificación del ARN**

31. Medir en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm.
32. Analizar la integridad del ARN con el Bioanalyzer (Agilent Technologies).  
En función del RIN (RNA integrity Number) el ARN se puede clasificar en:
  1. RIN < 5 no fiable
  2. 5 < RIN < 6 adecuado para RT-qPCR
  3. 6 < RIN < 8 adecuado para el análisis de los arrays
  4. RIN > 8 adecuado para todo tipo de técnicas

## **11. Extracción del ARN a partir de tejido**

Las biopsias renales se obtuvieron en presencia de RNA later y se congelaron a -80°C. El ARN total de estas biopsias se obtuvo siguiendo el PNT-026 que utiliza el kit RNeasy Mini kit de QIAGEN.

## Materiales

- 2-Mercaptoetanol
- Bolas de acero inoxidable
- Dispensador de bolas
- Eppendor Safe-lock micro test tubes de 2 ml y tapa con cierre
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Espectrofotómetro (Nanodrop u otros)
- Etanol > 99%
- Guantes
- Hielo (para mantener el ARN una vez extraído)
- Hielo seco (para mantener congeladas las muestras de tejido hasta que se inicia la lisis)
- RNeasy Mini Kit
- Microcentrífuga
- Micropipetas y puntas con filtro
- Tissue Lyser II
- Muestras de tejido entre 15 hasta 30 mg

## Operaciones previas

33. Si se realiza la extracción a partir de muestras congeladas, éstas deben mantenerse congeladas y proceder lo más rápidamente con la extracción para evitar degradación del ARN.
34. Si se trabaja con muestras congeladas con estabilizadores (RNAlater o similar), descongelar y pasar el tejido a un tubo de microcentrífuga de 2 ml y proceder lo más rápido posible con la extracción para evitar la degradación de ARN.
35. Preparar etiquetas para marcar los tubos.
36. Los adaptadores Tissuelyser II de 24 muestras han de estar a -80°C durante dos horas antes de comenzar.
37. Colocar las bolas de acero inoxidable de 3-7mm en el dispensador.
38. Preparación de los reactivos del kit (RNeasy Mini Kit).

## Descripción del procedimiento

### **Lisis celular**

39. Agitar durante 2-3 min los adaptadores de 2 x 24 en el equipo. La agitación permite que pierdan algo de temperatura los adaptadores y así se evita que se congelen las muestras en el paso 1.3 de lisis
40. Dispensar 1 bola con sumo cuidado en cada tubo de la microcentrífuga de 2 ml que contiene el tejido a lisar (15-30mg)
41. Añadir 500 microlitros RLT y 5 microlitros de 2-ME. Proceder a homogeneizar inmediatamente
42. Colocar los tubos de la muestra en los adaptadores 2x24
43. Homogeneizar a 30 Hz 3 min
44. Centrifugar 3 min a 13000 rpm y a T<sup>a</sup> ambiente para eliminar los tejidos residuales
45. Transferir 350 microlitros del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5ml
46. Añadir 350 microlitros de Etanol 70%
47. Mezclar con pipeta

### **Unión al filtro/columna**

48. Transferir 700 microlitros de la mezcla a la columna RNeasy Mini Spin que se encuentra en un tubo de recogida de 2 ml
49. Cerrar el tubo y centrifugar durante 15-30 seg a 10000 rpm
50. Descartar el eluido y colocar la columna en el mismo tubo

### **Eliminación de las sales**

51. Añadir 700 microlitros de RW1 y centrifugar durante 15-30 seg a 10000 rpm
52. Descartar el eluido y colocar la columna en el mismo tubo

### **Lavados**

53. Primer lavado: Añadir 500 microlitros de buffer RPE y centrifugar durante 15-30 seg a 10000 rpm
54. Descartar el eluido y colocar la columna en el mismo tubo
55. Segundo lavado: Añadir 500 microlitros de buffer RPE y centrifugar durante 2 min a 10000 rpm
56. Transferir la columna a un tubo de 1,5 ml

## **Elución**

57. Añadir entre 30 y 50 microlitros de RNase-free water a la columna
58. Centrifugar durante 1 min a 10000 rpm para eluir el ARN
59. Mantener el eluido (ARN) en hielo hasta que se almacene definitivamente a  $-80^{\circ}\text{C}$

## **Cuantificación del ARN**

60. Medir en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm
  1. Calcular la concentración del ARN: A260
  2. Pureza: el ARN puro tiene un coeficiente de A260/ A280 entre 1,9-2,1 en 10 nM Tris Cl, pH 7.5. Valores hasta 2,3 son normalmente obtenidos para ARN puro (en 10 nM Tris Cl, pH 7.5)
61. Analizar la integridad del ARN con el Bioanalyzer (Agilent Technologies). En función del RIN (RNA integrity Number) el ARN se puede clasificar en:
  1. RIN < 5 no fiable
  2.  $5 < \text{RIN} < 6$  adecuado para RT-qPCR
  3.  $6 < \text{RIN} < 8$  adecuado para análisis de los arrays
  4. RIN > 8 adecuado para todo tipo de técnicas

## **12. Realización de microarrays**

Una vez obtenido el RNA tanto de las biopsias renales como de las células mononucleares periféricas se realizaron los microarrays con ambas muestras de RNA.

El estudio de microarrays se ha realizado a un subgrupo de pacientes de los cuales se había obtenido muestra de tejido renal y de sangre periférica entre junio de 2015 y agosto del 2018.

El servicio de microarrays fue llevado a cabo por la Unidad de Alta Tecnología (UAT) en el Instituto de Investigación Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona (España), utilizando un Sistema GeneTitan (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific).

Se utilizaron dos placas, que contenían cada una 94 matrices de Clariom S para este experimento en particular. Estas matrices proporcionan una

medición precisa del transcriptoma humano a nivel genético, mediante el uso de sondas que cubren más de 20.000 genes bien anotados, distribuidos a través de exones constitutivos.

En resumen, se utilizaron 70 ng de ARN total de cada muestra como material de partida. La calidad del ARN aislado se midió previamente mediante electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100, Agilent). Se generó ADNc monocatenario adecuado para el etiquetado a partir del ARN total utilizando el kit de reactivos WT Plus (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de la cadena de sentido purificada se fragmentó, marcó e hibridó con las matrices utilizando el kit de hibridación, lavado y tinción GeneTitan para placas WT (Thermo Fisher Scientific). La placa se cargó en el GeneTitan y, después del escaneo de la matriz, se realizó un control de calidad de los datos sin procesar para verificar el rendimiento de todo el procesamiento (Figura 13).

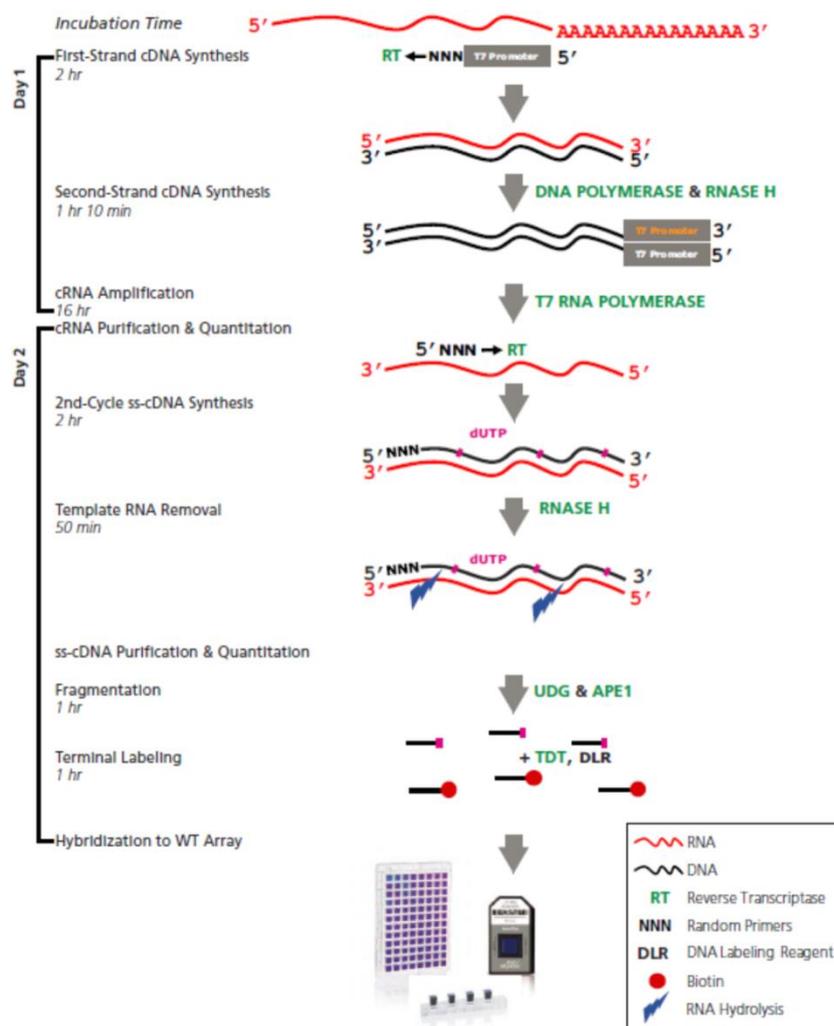


Figura 13. Esquema de la técnica realizada para el estudio de microarrays

### 13. Análisis estadístico microarrays

El análisis estadístico inicial incluye cuatro pasos principales. 1) Control de calidad y pre-procesamiento de los arrays utilizados. 2) Selección de genes expresados diferencialmente. 3) Creación de heatmaps y Diagramas de Venn y 4) análisis de la significación biológica. Estos análisis se llevan a cabo con el programa estadístico R (Copyright (C) 2019 The R Foundation for Statistical Computing) y los paquetes específicos desarrollados para el análisis de microarrays que se encuentran en el repositorio Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)).

Se realiza un control de calidad inicial de los arrays (PMID: 19106121) y se realiza un pre-procesamiento de los arrays para su ajuste y normalización (PMID: 12925520) aplicando el Robust Multi-array Average algorithm. Posteriormente, se aplica un filtro no específico para eliminar aquellos elementos que tengan menos variabilidad, tomando para el análisis el 35% de los elementos con una desviación estándar más alta a lo largo de todas las muestras. Esto es mucho más que el máximo del 1-5% del total de genes que se espera que se exprese de manera diferencial. El análisis considera los efectos por lotes y la exploración de los cofactores, a fin de detectar y controlar cualquier fuente no deseada de variabilidad.

La selección de genes expresados de manera diferencial entre los dos grupos se basa en el análisis con un modelo lineal con la modificación empírica de Bayes para la estimación de la varianza (PMID: 16646809). Este método es similar al uso de un test de t con mejora de la estimación de la varianza. Para tener en cuenta las comparaciones múltiples, los valores de p se ajustan para obtener un mayor control de la presencia de falsos positivos, siguiendo el método Benjamini-Hochberg (103). Los genes se considerarán diferencialmente expresados a un determinado valor de p ajustado y un determinado log Fold Change absoluto.

El análisis de la significación biológica se basa en el análisis de enriquecimiento sobre conjuntos de genes (del inglés Gene Set Enrichment

Analysis - GSEA) frente a la Gene Ontology (PMID: 25428369) y la base de datos de Reactome ([PMID: 29145629](#)) (104).

### **13.1 Gráficas con genes seleccionados de la toptable RechazovsNormal**

Para realizar la gráfica se han seleccionado aquellos genes que cumplían las siguientes condiciones según la toptable generada de la comparación Rechazo vs Normal:

- En el caso del estudio en sangre periférica, un p valor sin ajustar inferior a 0.1 y un logFC superior a 0.3. Utilizando estos criterios se han seleccionado 112 genes.
- En el caso del estudio en tejido, un p valor sin ajustar inferior a 0.01 y un logFC superior a 1.75. Utilizando estos criterios se han seleccionado 109 genes.

En ambos casos se han calculado la media geométrica de las expresiones de los genes seleccionados, en cada grupo de pacientes. Los grupos de pacientes que se han utilizado son los siguientes: cambios Borderline en una biopsia por causa (BLC), cambios Borderline en una biopsia de seguimiento (BLS), fibrosis intersticial y atrofia tubular en una biopsia por causa (IFTAC), fibrosis intersticial y atrofia tubular en una biopsia de seguimiento (IFTAS), rechazo (REB), biopsia normal de seguimiento (NOR).

Para valorar si existían diferencias de expresión media de los genes seleccionados, entre los diferentes grupos de pacientes se realizó un análisis de la varianza. En el caso que se observaran diferencias, se realizó el test estadístico de comparaciones múltiples de Tukey para valorar entre qué grupos se daban las diferencias.

### **13.2 Gráficas con genes seleccionados de las listas**

Para realizar las gráficas se seleccionaron los genes de las listas de Zhang et al., Roedder et al. y Van Loon et al. en el caso de la sangre periférica, y de Venner et al., Kathri et al. y Wang E et al. en el caso del estudio en tejido. Se utilizó la expresión de los genes seleccionados para calcular la media

geométrica para cada grupo de pacientes (los mismos que en caso de las gráficas anteriores).

Para valorar si existían diferencias de expresión media de los genes seleccionados, entre los diferentes grupos de pacientes se realizó un análisis de la varianza. En el caso que se observaran diferencias, se realizó el test estadístico de comparaciones múltiples de Tukey para valorar entre qué grupos se daban las diferencias.

## **14. Análisis estadístico citocinas**

El análisis estadístico ha sido llevado a cabo en la Unidad de Estadística y Bioinformática (UEB) del Instituto de Investigación del Hospital de Vall Hebrón (VHIR). Todos los análisis han sido realizado con el programa estadístico R (R versión 3.6.1 (2019-07-05), Copyright © 2015 The R Foundation for Statistical Computing).

El análisis estadístico de estos datos se puede resumir en los siguientes puntos principales: 1) Análisis exploratorio de los datos, 2) Reducción de la dimensión, 3) Obtención de perfiles de pacientes, 4) Evaluación clasificación CART, 5) Concordancia entre diagnósticos clínicos y grupos generados.

Los 236 pacientes se han agrupado en los siguientes diagnósticos: Normal (n=51), IFTA (n=78), Borderline (n=41), Pielonefritis (n=7), Recidiva (n=28), Nefropatía Bk (n=5), Rechazo celular (n=15), Rechazo humoral + mixto (n= 11). A los pacientes con diagnósticos de rechazo humoral (n=9) se han añadido dos pacientes con diagnóstico de rechazo mixto.

### **14.1 Análisis exploratorio de los datos**

En el análisis exploratorio para las variables categóricas se han calculado las frecuencias (totales y en porcentaje entre paréntesis) y el intervalo de confianza exacto al 95%. Para las variables continuas se ha calculado la media y la desviación típica junto al intervalo de confianza para la media al 95% -IC[,]- y la mediana y el rango intercuartílico. El p valor se ha calculado para las

variables normales con el test de Fisher y las variables no normales con el test de Kruskal-Wallis.

## **14.2 Reducción de la dimensión**

Para reducir la dimensión del conjunto de datos se ha realizado mediante un análisis de componentes principales (PCA). Previamente, para aumentar la robustez de los análisis, se ha procedido a escalar las variables después de haber aplicado a los datos una transformación logarítmica. Para observar cómo se comportan las citocinas en las dos primeras dimensiones del PCA, se realizó un gráfico llamado círculo de correlación. Dada la naturaleza de los análisis de PCA, la separación entre las muestras a lo largo del eje de coordenadas X suele ser más significativo que a lo largo del eje Y debido a que el primer componente está construido de tal manera que explica más que el segundo componente, que explica más que el tercero y, así, sucesivamente.

## **14.3 Obtención de perfiles de pacientes**

Para la obtención de perfiles de pacientes se ha realizado un análisis de clústers utilizando las 10 componentes seleccionadas en el PCA. Para llevar a cabo este análisis se ha calculado la distancia euclidiana de las componentes. Una vez obtenida la correspondiente matriz de distancias se ha procedido a estimar los grupos a partir del método PAM (Partición Alrededor de Medoides). Existe una variedad de métodos para elegir la cantidad de grupos óptimos que se usarán para el análisis de conglomerados. En este caso se ha usado el ancho de silueta, una métrica de validación interna que es una medida agregada de cuán similar es una observación a su propio conglomerado en comparación con su conglomerado vecino más cercano. La métrica puede variar de -1 a 1, donde los valores más altos son mejores.

## **14.4 Evaluación y clasificación CART**

El árbol de clasificación (CART) pretende a partir de las variables de las citocinas establecer la mejor combinación de las mismas generando reglas de clasificación en forma de ramas de árbol. Las ramificaciones se generan de

forma recursiva hasta que se cumplen ciertos criterios de parada. Es decir, para cada una de las particiones se busca aquella variable y correspondiente punto de corte que mejor clasifica nuestros pacientes en los tres grupos previamente generados. Como resultado final se dispone de un algoritmo que clasifica a los pacientes en los grupos obtenidos a partir de todas las citocinas con menos información (menos citocinas con sus puntos de corte e interacción si la hay).

#### **14.4.1 Heatmap**

El gráfico Heatmap representa los valores transformados logarítmicamente y escalados (las columnas representan los pacientes y las filas las variables) donde las intensidades están codificadas por colores con el fin de resaltar posibles patrones entre grupos. Se realiza una agrupación jerárquica de las muestras y los genes para facilitar su interpretación.

#### **14.5 Concordancia entre diagnósticos clínicos y grupos generados**

La comparación entre grupos se ha realizado con el test de Fisher para los grupos diagnósticos agrupados: cambios Borderline (Borderline), agrupación de los diagnósticos recidiva, nefropatía Bk, pielonefritis (InfecRecidiva), agrupación de los diagnósticos normal e IFTA (No infla) y la agrupación del rechazo celular y el rechazo humoral (Rechazo). Las comparaciones también se realizaron con el test de chi cuadrado de Pearson para el listado general de diagnósticos sin agrupar. En las tablas de frecuencias se indica el número total de casos, los porcentajes por filas y por columnas.

# Resultados



## 15. Caracterización de genes asociados a rechazo

**Objetivo:** El objetivo de este estudio es caracterizar genes asociados a rechazo mediante Biología Molecular tanto en tejido como en sangre periférica.

**Pacientes:** Se han incluido un total de 94 biopsias de pacientes consecutivas realizadas entre junio de 2015 y agosto del 2018. Durante este período se realizaron un total de 220 biopsias. En 32 pacientes no se habían extraído muestras suficientes para poder realizar el estudio de microarrays tanto en tejido como en sangre periférica. Por otro lado a 7 pacientes la muestra extraída no tenía la suficiente calidad para realizar el microarray y se descartaron. Finalmente, de los 181 casos, se descartaron los pacientes con los siguientes diagnósticos: 1 paciente con Pielonefritis, 5 con glomeruloesclerosis focal y segmentaria, 2 pacientes con glomerulonefritis membranosa, 6 pacientes con recidiva IgA, 1 paciente con glomerulopatía C3, 4 con nefropatía BK y 1 con nefropatía diabética. Los 161 casos con muestras biológicas tanto de tejido renal como de sangre periférica tenían los siguientes diagnósticos (Tabla 1):

	Seguimiento	Causa
<b>Normal</b>	39	
<b>IFTA 1</b>	28	17
<b>IFTA 2</b>	7	11
<b>IFTA 3</b>		4
<b>Borderline</b>	18	17
<b>TCMR</b>	6	5
<b>ABMR</b>	2	7

Tabla 1. Resumen de los diagnósticos de los 161 casos disponibles para el estudio de microarrays

Con el objetivo de obtener grupos lo más pareados posibles se escogieron 12 pacientes con diagnóstico de cambios Borderline, tanto de seguimiento como de causa. Del grupo diagnóstico IFTA se escogieron 16 muestras de biopsias seguimiento y 20 biopsias de causa. En este grupo hay 4 biopsias más de causa, porque se escogieron las 4 biopsias de IFTA de grado 3 del grupo de causa y de la cual no había ninguna en el grupo de seguimiento. Teniendo en cuenta el bajo número de casos tanto de grupo diagnóstico TCMR y ABMR, se escogieron todas las muestras disponibles. 1 muestra de TCMR de causa y otra de ABMR de causa no se pudieron incorporar finalmente al estudio con microarrays por la baja calidad de la muestra de tejido. Por último, del diagnóstico Normal se escogieron a 16 pacientes con biopsia de seguimiento.

Los diagnósticos histológicos de los 94 pacientes escogidos para realizar el estudio de microarray tanto en tejido renal como en sangre periférica se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2):

	Seguimiento	Causa
<b>Normal</b>	16	
<b>Borderline</b>	12	12
<b>IFTA</b>	16	20
<b>TCMR</b>	6	4
<b>ABMR</b>	2	6
<b>Total</b>	52	42

Tabla 2. Diagnósticos histológicos del microarray

Se han agrupado las diferentes categorías de IFTA para poder obtener un número adecuado de casos tanto en el grupo de seguimiento como de causa.

En primer lugar se realizó un análisis para comprobar si los grupos de rechazo celular (TCMR) o rechazo humoral (ABMR) comparten o no genes propios del rechazo (Figura 14) comparando la expresión génica de cada uno de los grupos versus el grupo con diagnóstico Normal.

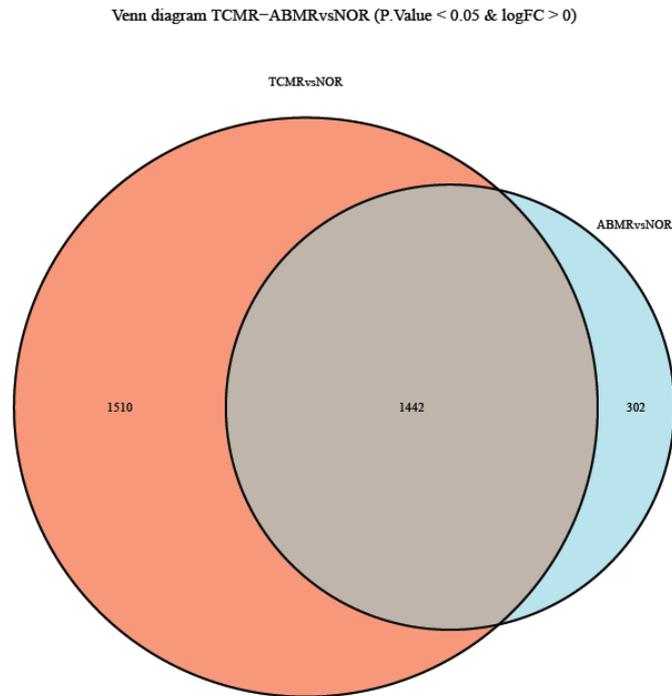


Figura 14. Diagrama de Venn

Tal y como se puede ver en la Figura 14 comparando ambos grupos versus el grupo con diagnóstico Normal, con un p valor <0,05 y un logFC >0, se pudo observar que ambos grupos de rechazo comparten 1442 genes, encontrando únicamente 302 propios del grupo de ABMR y 1510 en el grupo de TCRM. Observando la gran cantidad de genes que comparten se decidió agrupar ambos diagnósticos y de esta forma poder aumentar el número de casos total.

Seguidamente se realizó un análisis para comprobar si entre el grupo de rechazo por biopsias de seguimiento y el grupo de biopsias por causa había una expresión de genes diferencialmente expresados Figura 15.

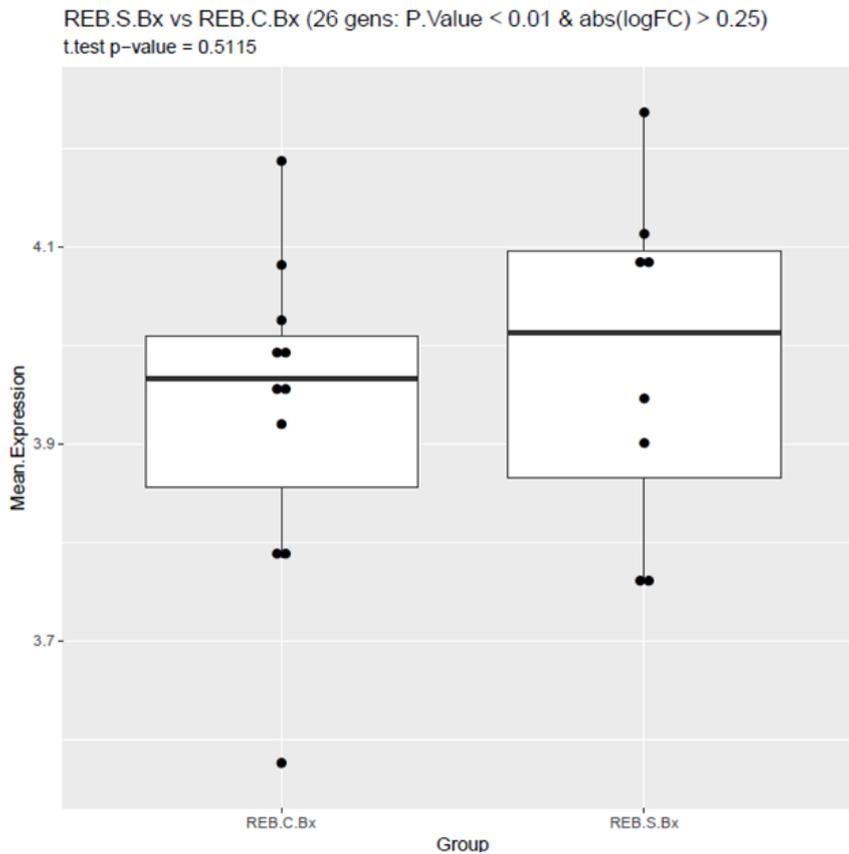


Figura 15. Comparación de genes diferencialmente expresados entre los grupos de rechazo diagnosticado en biopsias por causa y biopsias por seguimiento versus el grupo Normal. REB.C.Bx, rechazo en biopsias por causa; REB.S.Bx, rechazo en biopsias de seguimiento.

Con un p valor < 0,01 y un logFC > 0,25 se obtuvieron un total de 26 genes diferencialmente expresados entre los grupos de rechazo versus el grupo de Normal. La expresión de estos 26 genes no era distinta en biopsia por causa y biopsias de seguimiento. Estos datos confirman que podemos agrupar los diagnósticos de rechazo en biopsias por causa y seguimiento.

Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) considerando los 4 diagnósticos histológicos: biopsias de seguimiento normal, cambios Borderline, IFTA y rechazo (Figura 16).

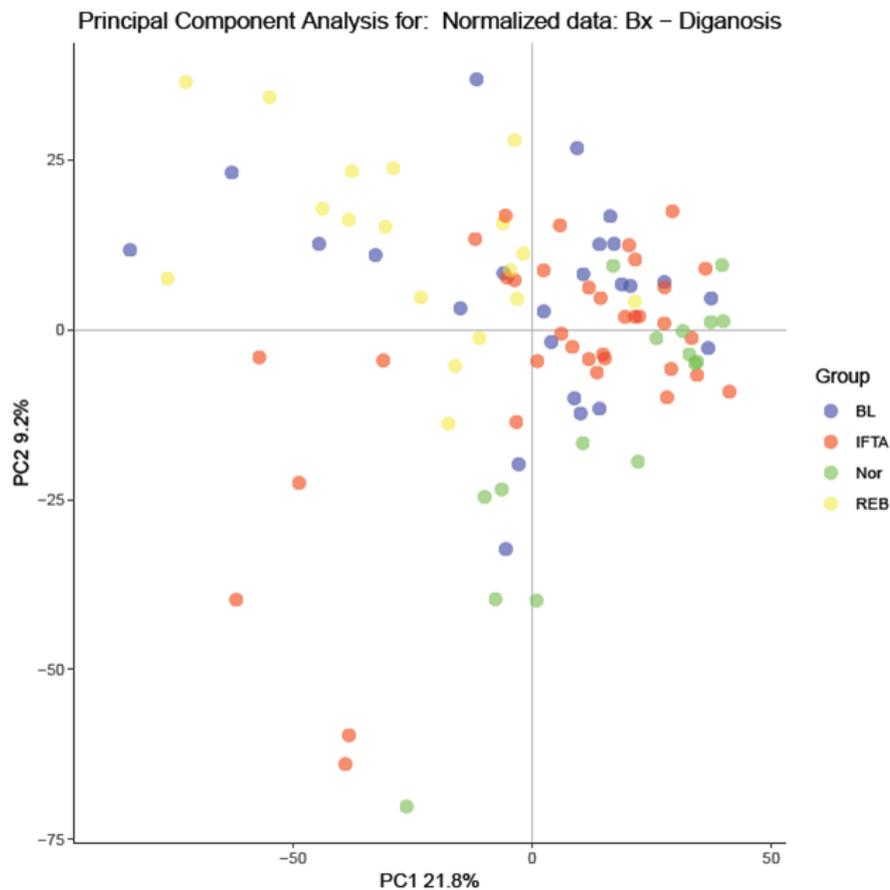


Figura 16. Análisis de componentes principales de los grupos diagnósticos histológicos: BL, Borderline; IFTA, fibrosis y atrofia tubular; Nor, Normal; REB, Rechazo.

Al realizar el PCA la primera componente explica un 21,8% de la variabilidad y la componente 2 un 9,2%, es decir, un 31% de la variabilidad total. En la figura 15 se puede apreciar que los pacientes con diagnóstico de rechazo se agrupan prácticamente todos en el cuadrante superior izquierdo, diferenciándose claramente del resto de grupos diagnósticos. Por otro lado, el grupo con diagnóstico Normal se encuentran situados en la parte inferior y derecha de los cuadrantes. Los grupos diagnósticos IFTA y Borderline quedan repartidos indistintamente entre los pacientes con rechazo y el grupo Normal.

Una vez comprobado la expresión diferencial entre grupos con diagnósticos histológicos diferentes, se realiza un nuevo análisis de PCA esta vez teniendo en cuenta su indicación, es decir, si es de seguimiento o de causa Figura 17.

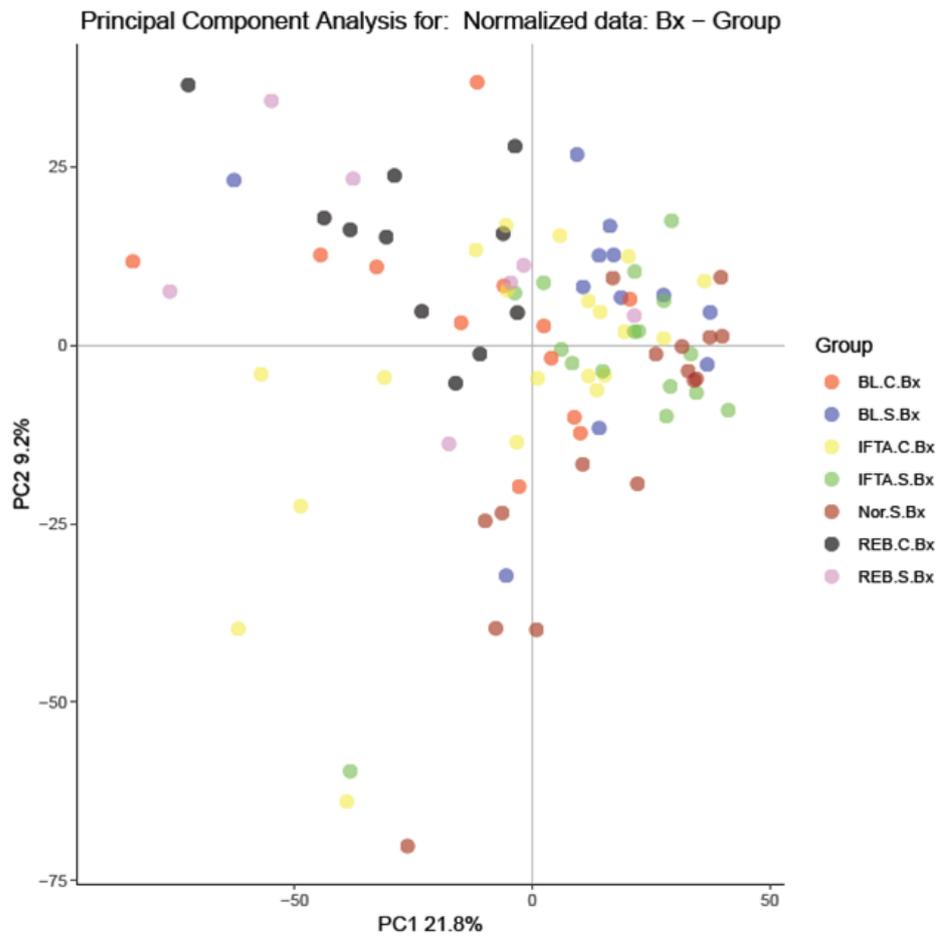


Figura 17. Análisis de componentes principales de los grupos diagnósticos histológicos ya sea de seguimiento (s) o causa (c): BL, Borderline; IFTA, fibrosis y atrofia tubular; Nor, Normal; REB, Rechazo.

Este análisis nos aporta información relevante al observar que los diagnósticos de Borderline o IFTA, tanto si son de seguimiento como de causa, están repartidos de forma aleatoria delimitados por el grupo de rechazo, en el cuadrante superior izquierdo y por el grupo diagnóstico Normal, en el cuadrante inferior derecho.

Estos resultados nos indican que el grupo de rechazo tiene un patrón de expresión de genes claramente diferenciado del resto de grupos diagnóstico independientemente de si la biopsia es de seguimiento o por causa. Por otro lado, en el grupo con diagnóstico Normal la gran mayoría de sus casos están situados en el cuadrante inferior derecho, en situación opuesta al grupo de rechazo. Viendo cómo se han distribuido los pacientes con diagnósticos Borderline e IFTA, tanto de seguimiento como de causa, el siguiente objetivo es conocer mejor como se expresan los genes de rechazo en los pacientes con

cambios Borderline e IFTA tanto en biopsias de seguimiento como en biopsias por causa.

### 15.1 Caracterización de genes asociados a rechazo en tejido

Los grupos de estudio finalmente se han distribuido tal y como se representa en la siguiente Tabla 3 :

DIAGNÓSTICOS	NÚMERO DE PACIENTES
Normal	16
Rechazo	18
Borderline Seguimiento	12
Borderline Causa	12
IFTA Seguimiento	16
IFTA Causa	20
<b>TOTAL</b>	<b>94</b>

Tabla 3. Grupos diagnósticos histológicos utilizados para la caracterización de genes asociados a rechazo en tejido

Se comparó el grupo de biopsias con diagnóstico de rechazo versus el grupo de biopsias con diagnóstico normal para obtener los genes diferencialmente expresados en los pacientes con rechazo. Se seleccionaron aquellos genes con un p valor  $< 0,01$  (t-test) y un logFC  $> 1,75$ . Se obtuvieron un total de 109 genes ordenados de mayor a menor expresión teniendo en cuenta el adj p value (p valor ajustado).

A continuación se describe el listado de los 109 genes con una mayor expresión diferencial respecto a las biopsias normales:

GeneSymbol	logFC	t	adj.P.Val	B
<b>DRAM2</b>	0,472650027	4,11224092	0,394020755	-1,763697838
<b>AKR1A1</b>	0,426129397	3,795968171	0,416991379	-2,173454256
<b>ST6GALNAC4</b>	0,479065324	3,727519959	0,423406484	-2,259689728
<b>HMGN3</b>	0,44058831	3,521437279	0,711115494	-2,513587353
<b>ACYP2</b>	0,39080876	3,441331547	0,794769367	-2,609834917
<b>NDUFB11</b>	0,361643487	3,385575358	0,826216872	-2,675980874
<b>REXO2</b>	0,489084079	3,099343662	0,986673829	-3,004022381
<b>NAPSA</b>	0,524312827	3,00568675	0,986673829	-3,106945254
<b>PIEZO1</b>	0,393846445	2,961219551	0,986673829	-3,15501226
<b>HEBP1</b>	0,413063257	2,942841665	0,986673829	-3,174724982
<b>APIP</b>	0,301817888	2,926467398	0,986673829	-3,192212569
<b>EIF4EBP1</b>	0,452724566	2,925158161	0,986673829	-3,193607721
<b>RAD51C</b>	0,458658329	2,922905402	0,986673829	-3,196007231
<b>PIGW</b>	0,399816224	2,875957333	0,986673829	-3,245701708
<b>MORN2</b>	0,344690386	2,864490325	0,986673829	-3,257748489
<b>BEX4</b>	0,36054004	2,828423588	0,986673829	-3,295403502
<b>ATP1B1</b>	0,52819306	2,826118337	0,986673829	-3,297798069
<b>NGLY1</b>	0,334629027	2,82477148	0,986673829	-3,299196429
<b>MRPS36</b>	0,416808946	2,823517295	0,986673829	-3,30049812
<b>MRPL23</b>	0,436861472	2,805219195	0,986673829	-3,319439647
<b>RTL1</b>	0,32009138	2,804056389	0,986673829	-3,320640194
<b>RPIA</b>	0,455511554	2,739674187	0,986673829	-3,386519904
<b>CYB5A</b>	0,380599574	2,73693767	0,986673829	-3,389294126
<b>TOP1MT</b>	0,4034549	2,714712704	0,986673829	-3,41174628
<b>SLC19A2</b>	0,48235302	2,712805258	0,986673829	-3,413666649
<b>LGALS3</b>	0,446820277	2,705729387	0,986673829	-3,420781348
<b>TMEM159</b>	0,340719839	2,691231955	0,986673829	-3,435313417
<b>C12orf45</b>	0,394045457	2,685698268	0,986673829	-3,440844364
<b>BPHL</b>	0,385184309	2,682625595	0,986673829	-3,4439117
<b>SNRPF</b>	0,376669018	2,659984656	0,986673829	-3,466429052
<b>PRDX6</b>	0,354294382	2,615962668	0,986673829	-3,509783209
<b>LOC100506142</b>	0,322438206	2,578930705	0,986673829	-3,545811861

<b>FHL2</b>	0,472734162	2,577446007	0,986673829	-3,547247858
<b>DUSP12</b>	0,307214818	2,555448891	0,986673829	-3,568446448
<b>PUDP</b>	0,369247756	2,54280664	0,986673829	-3,580564293
<b>GPX4</b>	0,33827016	2,529178123	0,986673829	-3,59357373
<b>THAP7-AS1</b>	0,319976193	2,526836009	0,986673829	-3,595803821
<b>SAT2</b>	0,306763958	2,526070627	0,986673829	-3,596532236
<b>ITPRIPL2</b>	0,342024125	2,524347466	0,986673829	-3,598171524
<b>VSIG4</b>	0,659408935	2,507017723	0,986673829	-3,614607878
<b>SH3RF2</b>	0,344503349	2,501191572	0,986673829	-3,620113247
<b>ZNF773</b>	0,416265601	2,501012844	0,986673829	-3,620281971
<b>ETFB</b>	0,300047395	2,50027554	0,986673829	-3,620977906
<b>AFG1L</b>	0,445706588	2,491909826	0,986673829	-3,628862654
<b>SVBP</b>	0,445623052	2,479391157	0,986673829	-3,640621793
<b>BEND4</b>	0,30080936	2,46863014	0,986673829	-3,650691675
<b>APOO</b>	0,30620273	2,462385211	0,986673829	-3,656519266
<b>EMC3</b>	0,304077996	2,448653695	0,986673829	-3,669291032
<b>ST8SIA1</b>	0,470387747	2,44006631	0,986673829	-3,677248728
<b>RPL26L1</b>	0,326952229	2,410488797	0,986673829	-3,704482988
<b>MRPL58</b>	0,313058404	2,400868265	0,986673829	-3,71328284
<b>DSTN</b>	0,306253384	2,386073977	0,986673829	-3,72675881
<b>ATP5F1EP2</b>	0,301007997	2,373918063	0,986673829	-3,737780302
<b>SWI5</b>	0,341558033	2,360077794	0,986673829	-3,75027253
<b>NUDT2</b>	0,383579587	2,339016284	0,986673829	-3,769166911
<b>CRIP1</b>	0,415570191	2,338110012	0,986673829	-3,769976788
<b>COMMD6</b>	0,31446541	2,337650753	0,986673829	-3,770387099
<b>GTF3C6</b>	0,309908404	2,336136543	0,986673829	-3,771739452
<b>HMBS</b>	0,322222644	2,331104932	0,986673829	-3,776228007
<b>COX7B</b>	0,362805752	2,319925098	0,986673829	-3,786172478
<b>SMIM24</b>	0,363511157	2,311759798	0,986673829	-3,793410425
<b>CLEC10A</b>	0,416291875	2,310588338	0,986673829	-3,794447099
<b>NAT8B</b>	0,348958552	2,309006897	0,986673829	-3,79584589
<b>ARNTL2</b>	0,409034191	2,304765973	0,986673829	-3,799593066
<b>CRY1</b>	0,375859788	2,304169234	0,986673829	-3,80011987

<b>ATP5MC1</b>	0,348086097	2,291298666	0,986673829	-3,811454389
<b>NDUFB6</b>	0,305920953	2,252827919	0,986673829	-3,84501716
<b>ZBTB48</b>	0,322039005	2,246649077	0,986673829	-3,850363295
<b>YBEY</b>	0,436612156	2,23598683	0,986673829	-3,859559577
<b>ZNF32</b>	0,310195975	2,226382337	0,986673829	-3,867811988
<b>PDCD5</b>	0,388039007	2,208544387	0,986673829	-3,883059215
<b>MPHOSPH6</b>	0,357214898	2,186025742	0,986673829	-3,902159047
<b>TRIM16</b>	0,342362651	2,18358679	0,986673829	-3,90421775
<b>TMEM176B</b>	1,302011949	2,182221287	0,986673829	-3,905369509
<b>LONRF1</b>	0,342714705	2,161187988	0,986673829	-3,923033028
<b>TMEM176A</b>	1,306650723	2,155436759	0,986673829	-3,927837477
<b>MAP3K7CL</b>	0,521623983	2,152439227	0,986673829	-3,93033722
<b>RPS26</b>	0,702591073	2,146322926	0,986673829	-3,935428599
<b>KCNJ16</b>	0,320925341	2,135516973	0,986673829	-3,944393521
<b>ADI1</b>	0,331067599	2,133645346	0,986673829	-3,945942343
<b>DUSP5</b>	0,350362361	2,108826828	0,986673829	-3,96637029
<b>PVALB</b>	0,473900517	2,0816144	0,986673829	-3,98853248
<b>C2orf74</b>	0,331145879	2,080981746	0,986673829	-3,989044773
<b>PUS7</b>	0,31292781	2,069693364	0,986673829	-3,998162971
<b>PEBP1</b>	0,316995176	2,068100813	0,986673829	-3,999445907
<b>COX6C</b>	0,321633427	2,03827354	0,986673829	-4,023316358
<b>LOC730183</b>	0,303669515	2,02858754	0,986673829	-4,031003259
<b>RHAG</b>	0,338101638	2,006330126	0,986673829	-4,048546241
<b>ALDOB</b>	0,49401121	1,97038284	0,986673829	-4,076522487
<b>CDC42BPA</b>	0,306260823	1,964543352	0,986673829	-4,081025308
<b>BEX3</b>	0,436441996	1,963538843	0,986673829	-4,081798702
<b>PSMG1</b>	0,316349422	1,959473568	0,986673829	-4,084925106
<b>NUF2</b>	0,369079689	1,944309999	0,986673829	-4,09653646
<b>MRAS</b>	0,386130737	1,94342655	0,986673829	-4,097210508
<b>GMPR</b>	0,492222269	1,938027677	0,986673829	-4,10132385
<b>GPX3</b>	0,486680691	1,918091621	0,986673829	-4,116425559
<b>BBOF1</b>	0,415910805	1,897945095	0,986673829	-4,131546623
<b>COX8A</b>	0,320896234	1,887854454	0,986673829	-4,1390671

<b>SSPN</b>	0,468461684	1,860750889	0,986673829	-4,159091087
<b>IGFBP7</b>	0,359198488	1,855736475	0,986673829	-4,162767505
<b>KYNU</b>	0,303227492	1,813004017	0,986673829	-4,193738622
<b>YBX3</b>	0,344086087	1,811342378	0,986673829	-4,194929903
<b>PDZK1IP1</b>	0,537322066	1,800888388	0,986673829	-4,202402269
<b>MSC</b>	0,406640462	1,791399561	0,986673829	-4,209151189
<b>BOLA3</b>	0,3646016	1,743697474	0,986673829	-4,242593452
<b>CTLA4</b>	0,322169214	1,736702173	0,986673829	-4,247429214
<b>MSRB2</b>	0,327868074	1,72442649	0,986673829	-4,255872782
<b>SLC46A2</b>	0,38021556	1,721510275	0,986673829	-4,257870678
<b>GLRX5</b>	0,418714428	1,720161143	0,986673829	-4,258793931
<b>ERRFI1</b>	0,349566568	1,692888437	0,986673829	-4,277316837
<b>SPTA1</b>	0,308255305	1,69241455	0,986673829	-4,277636315
<b>ARL4A</b>	0,335463317	1,661390505	0,986673829	-4,298374666

Tabla 4. Listado de 109 genes

Con estos 109 genes se realizó una media geométrica con la finalidad de resumir en un solo parámetro la expresión de los genes con expresión diferencial en el rechazo. Por ello se calcula para cada paciente la media geométrica de estos 109 genes. Además, este cálculo permite disminuir la variabilidad entre grupos respecto al análisis de los genes por separado.

Se comparó la expresión de los genes de rechazo en los 6 grupos de estudio (Normal, Rechazo, Borderline Seguimiento, Borderline Causa, IFTA Seguimiento, IFTA Causa) mediante Anova tal como se puede observar en la Figura 18.

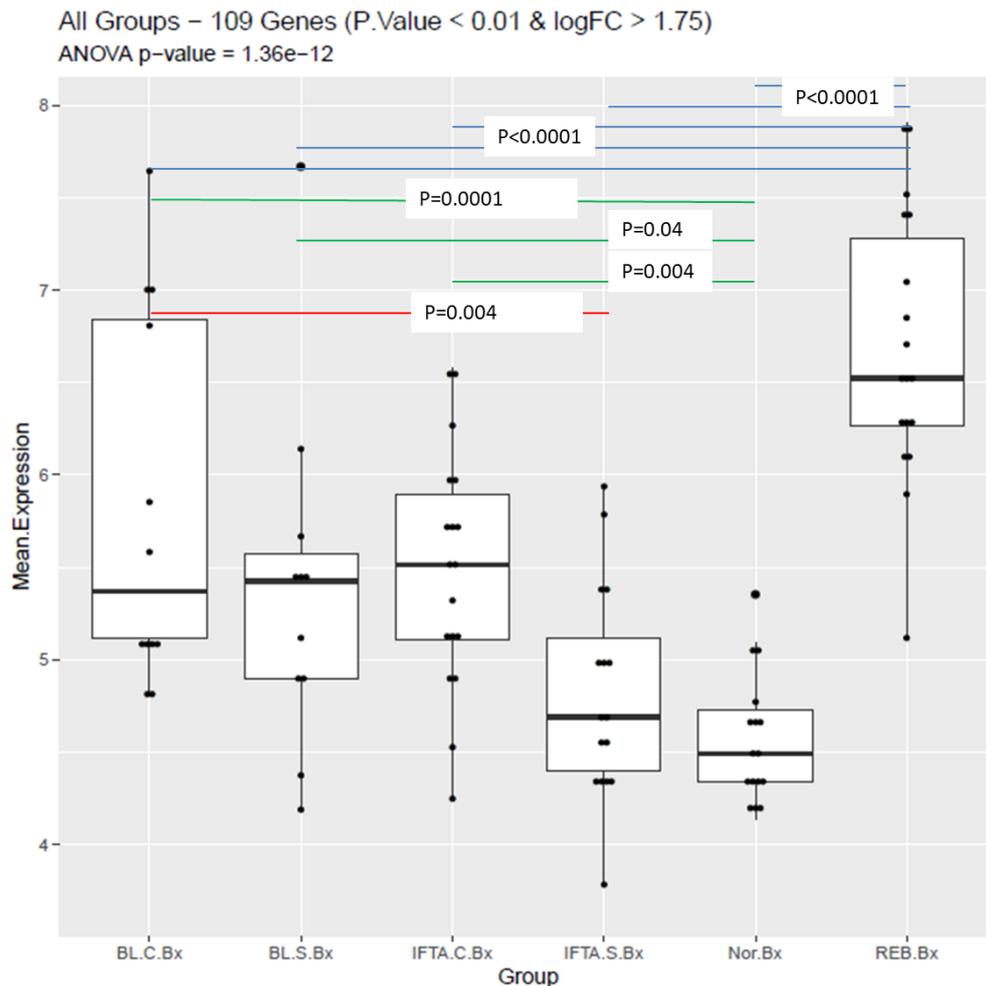


Figura 18. Comparación de la expresión de los genes de rechazo en los 6 grupos de estudio: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Al observar las comparaciones entre grupos se puede ver que el grupo de rechazo es diferente al resto de grupos problema con unos  $p < 0,0001$ . El grupo Normal es diferente al grupo Borderline Causa con un  $p < 0,0001$ , al grupo Borderline Seguimiento con un  $p < 0,04$  y al grupo IFTA Causa con un  $p < 0,004$ . No se encuentran diferencias significativas entre el grupo IFTA Seguimiento versus el Normal. Además, el grupo de IFTA Seguimiento tiene una expresión diferencial de genes de rechazo versus el grupo de Borderline Causa. Estos resultados indican que el grupo de IFTA Seguimiento parece tener una expresión de genes de rechazo muy parecida al grupo de Normal, es decir, ambos grupos representan diagnósticos sin inflamación.

Para confirmar estos resultados se quiso realizar el mismo análisis utilizando listado de genes de rechazo previamente descritos en la literatura por

otros grupos. Se consideraron los listados de genes de rechazo publicados en el documento de consenso de Banff del 2018 (105). En este documento de consenso se consideran como genes altamente asociados a rechazo los publicados en los artículos Venner JM et al., (106) ,Kathri P et al., (107) y Wang E et al. (108). Con la finalidad de corroborar que los genes de rechazo están diferencialmente expresados en nuestros grupos de estudio, se consideraron el listado de genes de cada uno de estos autores. Se comprobó la expresión génica de estos genes en nuestro microarrays y se calculó la media geométrica para cada una de las publicaciones.

En la siguiente figura se muestra la expresión diferencial de los genes de rechazo según Venner et al. en nuestros grupos de estudio. Con el listado de genes de Venner (Figura 19) el grupo de Rechazo tiene una expresión de genes diferencialmente expresados del resto de grupos. El grupo Normal versus el resto de grupos únicamente sale un p significativa de 0,01 respecto al grupo de Borderline Causa; respecto al grupo IFTA C el p valor es de 0,09. El grupo de IFTA Seguimiento versus el Borderline Causa la p es de 0,06.

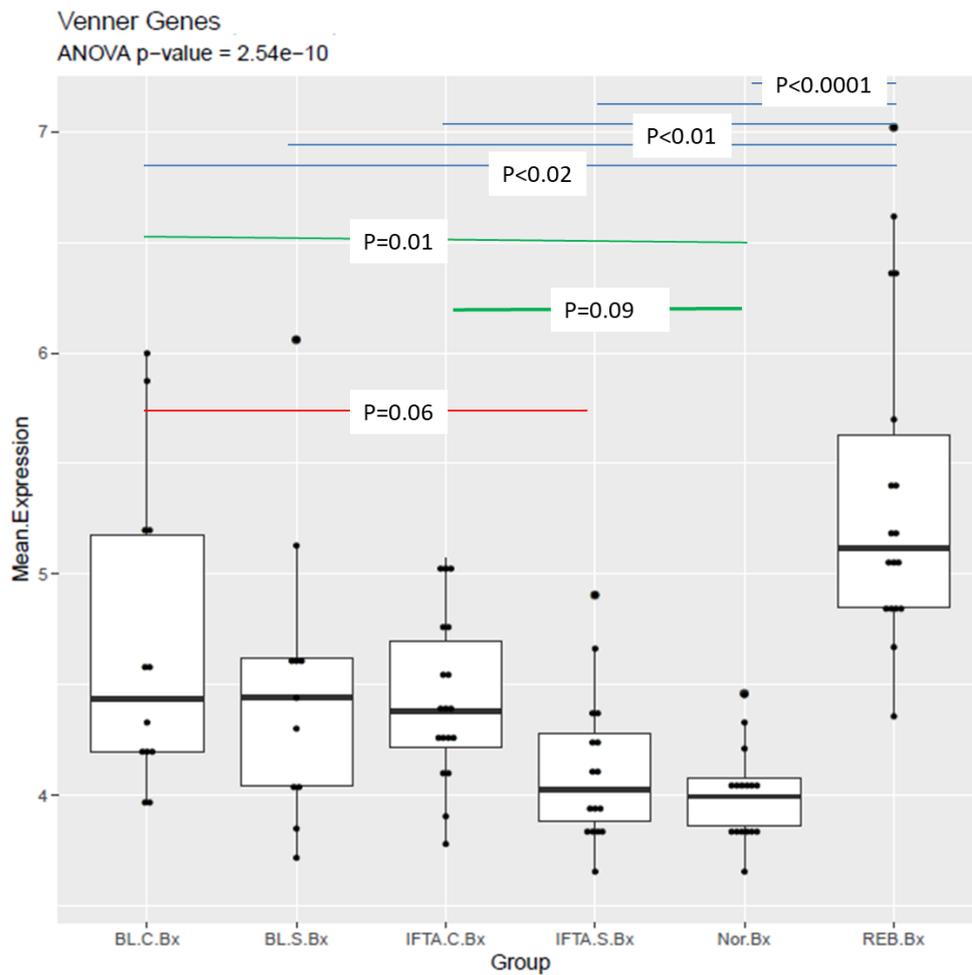


Figura 19. Comparación de los genes publicados por Venner JM et al. en los 6 grupos de estudio: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Con el listado de genes de NIH (National Institutes of Health) de Wang E et al., el grupo de rechazo tiene una expresión de genes diferencialmente expresados del resto de grupos (Figura 22). El grupo Normal únicamente se diferencia del grupo Borderline Causa con una  $p < 0,001$ . Además el grupo de IFTA Seguimiento versus el Borderline Causa también se diferencian con una  $p$  es de 0,011.

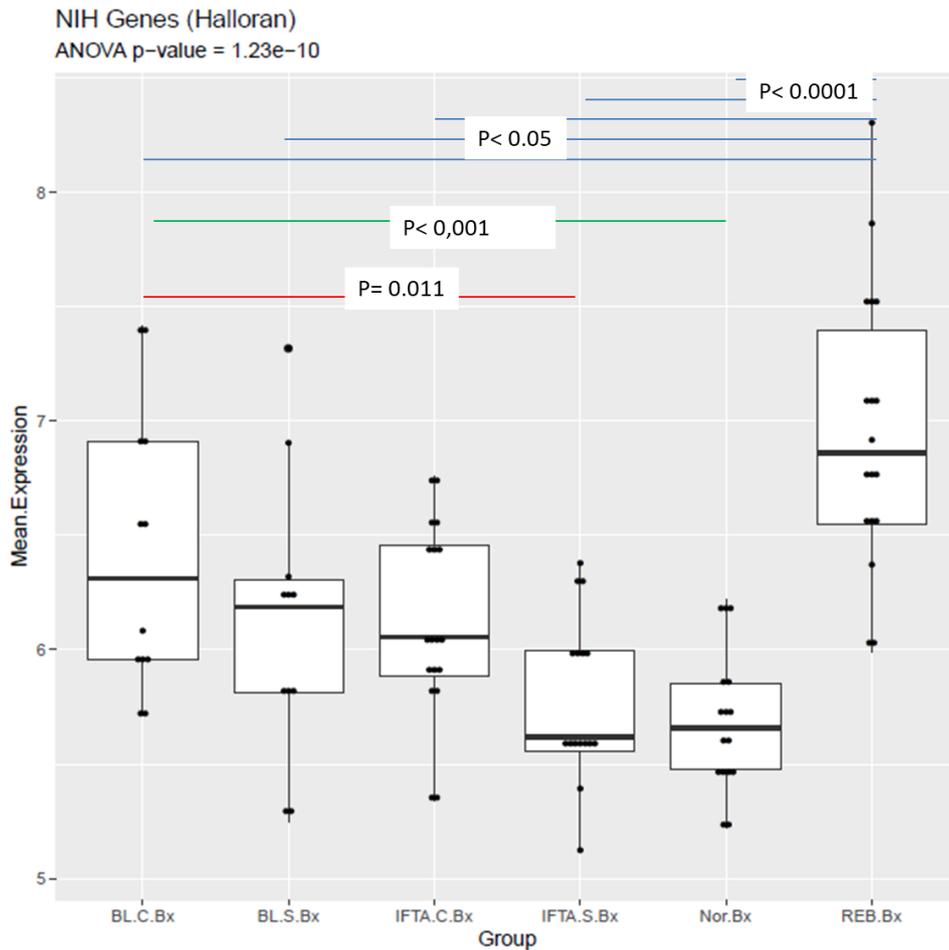


Figura 20. Comparación de los genes de rechazo publicados en el artículo de Wang E et al. en los 6 grupos de estudio: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Por último, con el listado de genes de Kathri P et al., el grupo de rechazo también tiene una expresión de genes de rechazo diferencialmente expresados del resto de grupos (Figura 21). El grupo Normal se diferencia del grupo Borderline Causa con una  $p= 0,01$  y el grupo de IFTA Seguimiento versus el Borderline Causa se diferencian con una  $p$  de 0,029.

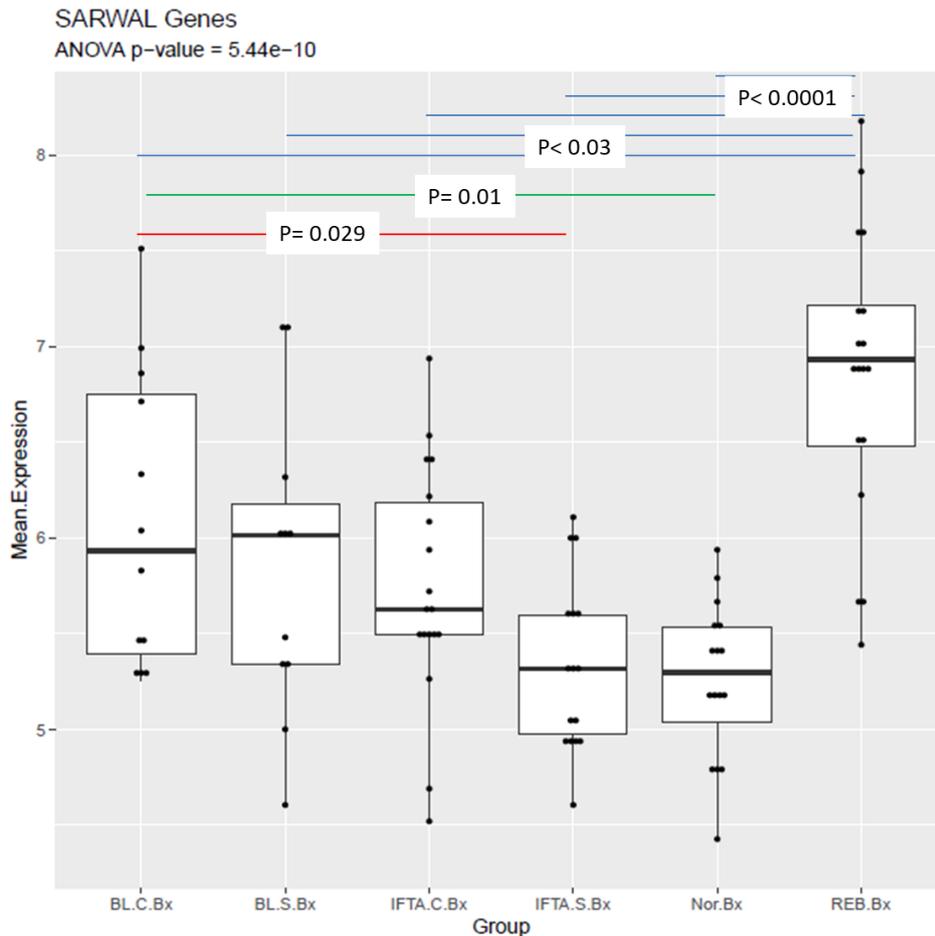


Figura 21. Comparación de los genes de rechazo publicados en el artículo de Kathri P et al. en los 6 grupos de estudio: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Con los 3 listados de genes tanto de Venner JM et al, Wang E et al, como de Kathri P et al., se obtienen unos resultados parecidos al de nuestro listado con los 109 genes. El grupo de rechazo se diferencia de todos los grupos y el grupo Normal y el grupo IFTA Seguimiento, no son diferentes entre sí. Además, estos dos grupos tienen una expresión génica menor al resto de grupos, sin llegar a ser significativos en todos, únicamente con el Borderline Causa.

Teniendo en cuenta estos resultados se agruparon los pacientes con una biopsia Normal e IFTA Seguimiento. Al ser ambos grupos diagnósticos de baja inflamación y habiendo tenido una expresión de genes de rechazo en ambos grupos muy parecida en todas las comparaciones que se han mostrado anteriormente.

Al agrupar el grupo de IFTA Seguimiento + Normal y aumentar la número de casos total, la comparaciones respecto a todos los grupos diagnósticos problema son significativas. Respecto al grupo Borderline Causa y IFTA causa las p son inferiores a 0,02 así como con el grupo Borderline Seguimiento que tiene una p de 0,04 (Figura 22).

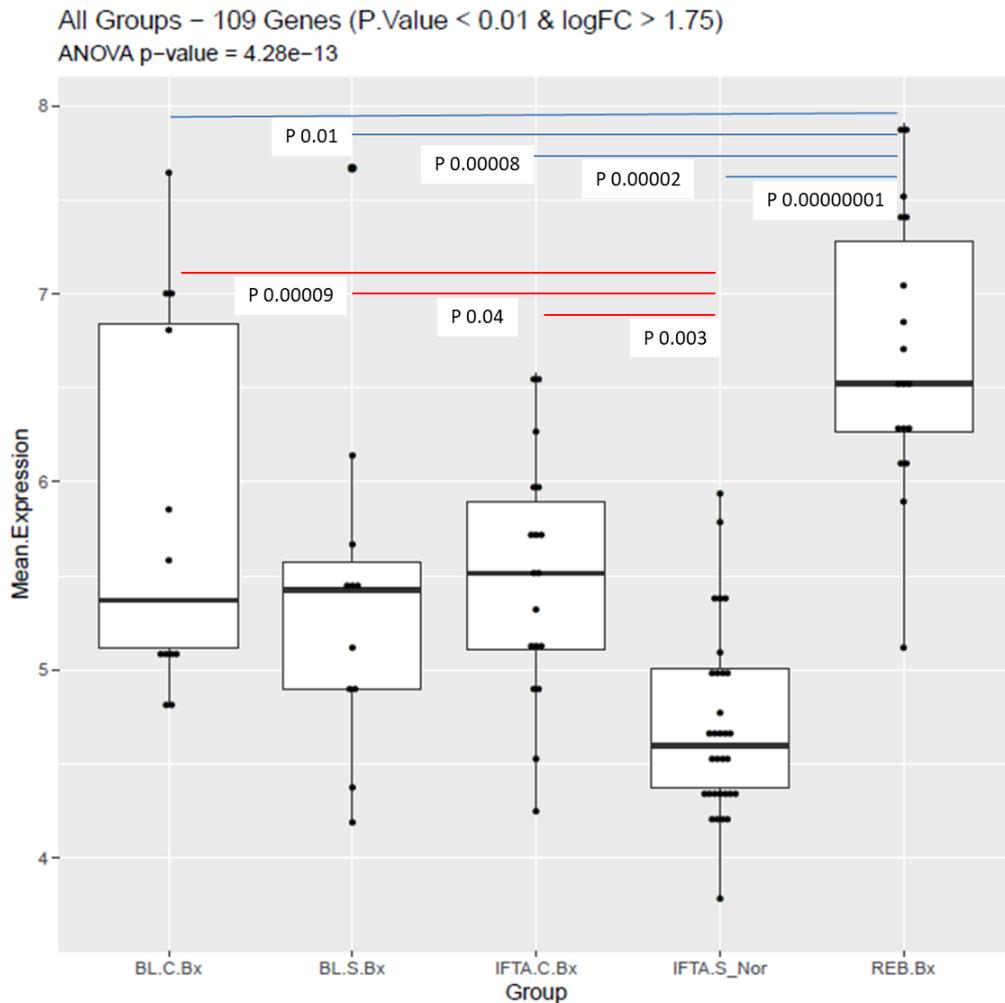


Figura 22. Comparación de la expresión media de los 109 genes de rechazo en los 5 grupos de estudio: IFTAS\_Norm, IFTA Seguimiento+Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA.C, IFTA Causa.

Para confirmar estos resultados se quiso realizar el mismo análisis utilizando listado de genes de rechazo previamente descritos en la literatura en los artículos de Venner JM et al., (106) ,Kathri P et al., (107) y Wang E et al. (108). Con la finalidad de corroborar que los genes de rechazo están diferencialmente expresados en nuestros grupos de estudio, se consideraron el listado de genes de cada uno de estos autores. Se comprobó la expresión

génica de estos genes en nuestro microarrays y se calculó la media geométrica para cada una de las publicaciones.

En la siguiente Figura 23 se muestra la expresión diferencial de los genes de rechazo según Venner et al. en nuestros grupos de estudio.

Con el listado de genes de Venner et al. el grupo de Rechazo tiene una expresión de genes diferencialmente expresados del resto de grupos. El grupo IFTAS\_Nor versus el resto de grupos únicamente sale un p significativa de 0,007 respecto al grupo de Borderline Causa y un p con un valor inferior a 0,06 respecto al grupo IFTA Causa.

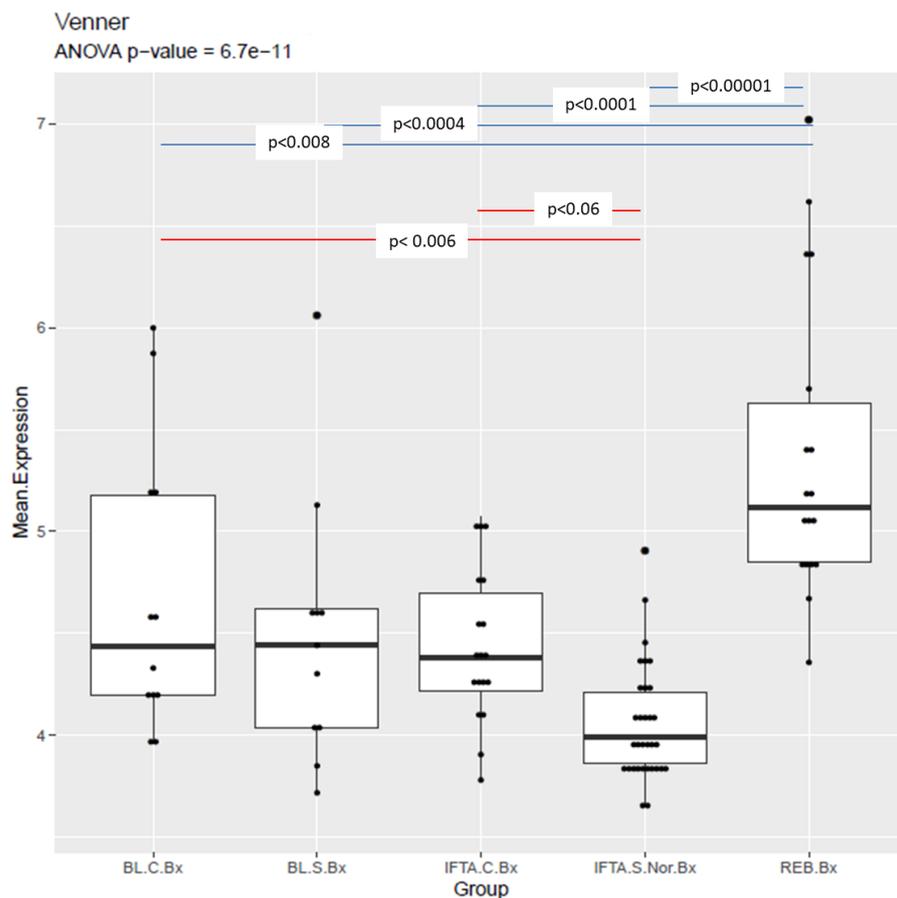


Figura 23. Comparación de la expresión media de los genes publicados por Venner JM et al. en los 5 grupos de estudio: IFTAS\_Norm, IFTA Seguimiento+Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA.C, IFTA Causa.

Con el listado de genes publicados en el artículo de Wang et al. el grupo de Rechazo tiene una expresión de genes diferencialmente expresados del resto de grupos (Figura 24). El grupo IFTAS\_Nor versus el resto de grupos

únicamente se obtiene un p valor inferior a 0,001 respecto al grupo de Borderline Causa y un p con un valor igual a 0,06 respecto al grupo IFTA Causa.

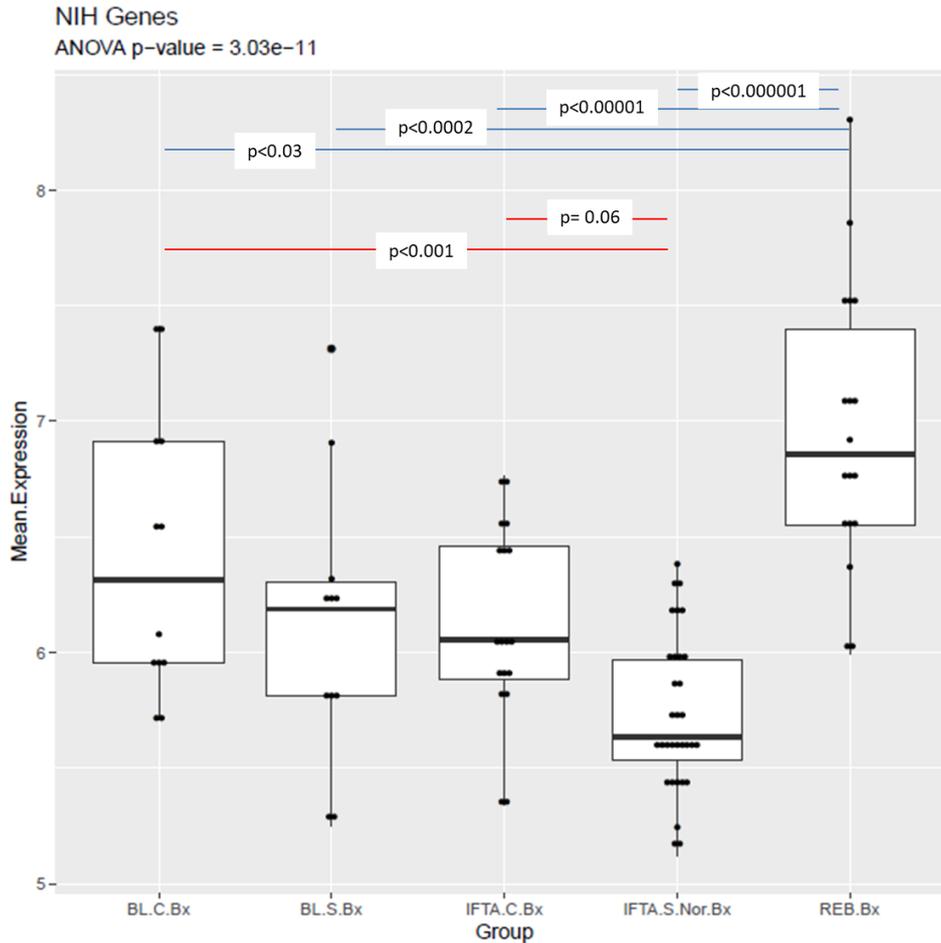


Figura 24. Comparación de los genes de rechazo publicados en el artículo de Wang E et al. en los 5 grupos de estudio: IFTAS\_Norm, IFTA Seguimiento+Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA.C, IFTA Causa.

Con el listado de genes publicados en el artículo de Kathri et al. el grupo de Rechazo tiene una expresión de genes diferencialmente expresados del resto de grupos. El grupo IFTAS\_Nor versus el resto de grupos únicamente se obtiene un p valor inferior a 0,004 respecto al grupo de Borderline Causa (Figura 25).

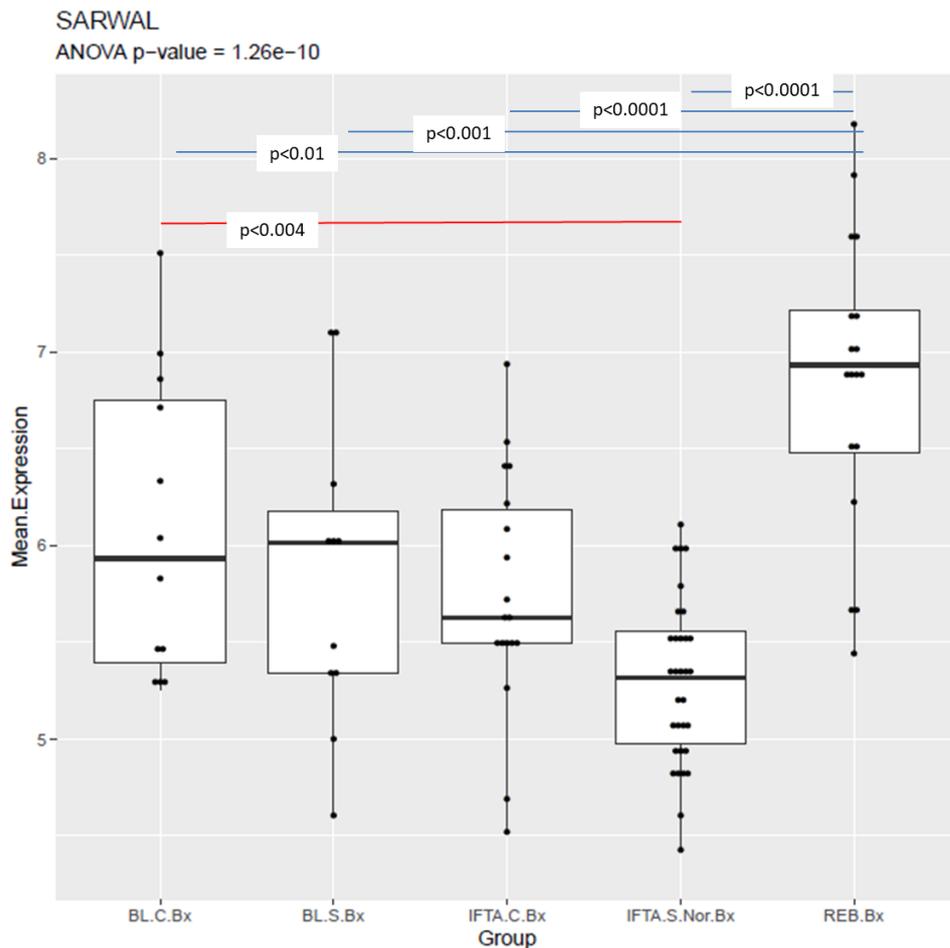


Figura 25. Comparación de los genes de rechazo publicados en el artículo de Kathri P et al. en los 5 grupos de estudio: IFTAS\_Norm, IFTA Seguimiento+Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA.C, IFTA Causa.

Como se puede comprobar, con los tres listados de genes se obtiene un resultado muy parecido.

## 15.2 Caracterización de genes asociados a rechazo en sangre periférica

Para poder caracterizar los genes asociados a rechazo en sangre periférica en primer lugar se realizó una comparativa entre el grupos con diagnóstico Normal versus el grupo de rechazo, para obtener los genes diferencialmente expresados. Como la diferencia entre genes en los pacientes con rechazo respecto a las pacientes con una biopsia normal era menor en sangre periférica que en tejido, se utilizó un criterio menos estricto para seleccionar los genes con una mayor expresión diferencial: p valor < 0,1 y un logFC > 0,3 se obtuvieron un total de 112 genes.

El listado de los 112 genes obtenidos es el siguiente:

Gene.Symbol	logFC	t	adj.P.Val	B
<b>SEPTIN1</b>	2,027653	8,542565	4,25E-10	20,10438
<b>SH2D1A</b>	1,804933	8,500085	4,25E-10	19,90322
<b>CD48</b>	2,023448	8,425619	4,64E-10	19,55087
<b>UBD</b>	2,170981	8,39179	4,64E-10	19,39092
<b>PLEK</b>	2,435351	8,367491	4,64E-10	19,27608
<b>PLAC8</b>	2,293712	8,312044	5,25E-10	19,01418
<b>IKZF1</b>	1,959028	8,279786	5,25E-10	18,86193
<b>CD3E</b>	2,354676	8,201219	6,09E-10	18,49144
<b>EMB</b>	1,876135	8,179152	6,26E-10	18,38747
<b>IRF8</b>	2,197298	8,137241	6,52E-10	18,19013
<b>ITGAL</b>	1,932935	8,12082	6,52E-10	18,11285
<b>SLAMF7</b>	2,579325	8,115901	6,52E-10	18,08971
<b>GZMK</b>	2,741027	8,102022	6,58E-10	18,02442
<b>BIN2</b>	2,103201	8,059828	7,27E-10	17,82605
<b>PTPRC</b>	2,296755	8,03678	7,4E-10	17,71775
<b>CST7</b>	1,893661	8,036008	7,4E-10	17,71413
<b>CYTIP</b>	2,005742	8,027562	7,4E-10	17,67446
<b>LCP1</b>	2,329858	8,004741	7,92E-10	17,56731
<b>BCL2A1</b>	1,994165	7,986924	8,05E-10	17,48369
<b>SELPLG</b>	1,913769	7,984876	8,05E-10	17,47408
<b>IL2RG</b>	2,620933	7,970126	8,33E-10	17,40488
<b>DOCK2</b>	2,009244	7,905306	1,02E-09	17,10106
<b>RASSF5</b>	1,788394	7,902368	1,02E-09	17,0873
<b>SLAMF6</b>	2,536109	7,887079	1,02E-09	17,01571
<b>SELL</b>	2,503343	7,834405	1,24E-09	16,76926
<b>LCK</b>	2,088183	7,802471	1,38E-09	16,62
<b>NCKAP1L</b>	1,947082	7,800526	1,38E-09	16,61092
<b>CCL5</b>	2,22858	7,791203	1,38E-09	16,56737
<b>GBP5</b>	2,96124	7,787049	1,38E-09	16,54797
<b>CD52</b>	2,275887	7,779188	1,38E-09	16,51126
<b>SLAMF1</b>	1,938848	7,734187	1,64E-09	16,30126

<b>CD3D</b>	2,138855	7,723946	1,64E-09	16,2535
<b>IL7R</b>	3,069941	7,647748	2,3E-09	15,8986
<b>TNFRSF9</b>	2,015957	7,645177	2,3E-09	15,88664
<b>CD2</b>	2,705821	7,608323	2,69E-09	15,71528
<b>TESPA1</b>	2,087153	7,602602	2,7E-09	15,6887
<b>CD96</b>	2,704493	7,589266	2,7E-09	15,62674
<b>FYB1</b>	2,061197	7,5425	3,2E-09	15,40967
<b>THEMIS</b>	2,152281	7,542075	3,2E-09	15,4077
<b>ST8SIA4</b>	1,885015	7,536342	3,2E-09	15,38111
<b>CD37</b>	2,018382	7,536212	3,2E-09	15,38051
<b>LAX1</b>	2,532648	7,530706	3,21E-09	15,35498
<b>RHOH</b>	1,778911	7,528537	3,21E-09	15,34492
<b>TLR8</b>	2,287992	7,477828	3,96E-09	15,11001
<b>CD27</b>	2,09753	7,446558	4,45E-09	14,96534
<b>GRAP2</b>	1,855938	7,421759	4,93E-09	14,85071
<b>LCP2</b>	1,799278	7,40528	5,25E-09	14,77459
<b>IKZF3</b>	1,798864	7,390117	5,56E-09	14,70459
<b>FCRL3</b>	1,875893	7,358618	6,24E-09	14,55928
<b>TRAT1</b>	1,987952	7,356677	6,24E-09	14,55033
<b>LAPTM5</b>	1,870762	7,350695	6,33E-09	14,52276
<b>CD3G</b>	2,044952	7,342593	6,48E-09	14,48542
<b>BIRC3</b>	1,87118	7,335307	6,62E-09	14,45185
<b>RAC2</b>	1,90889	7,306763	7,28E-09	14,32042
<b>TLR6</b>	1,911656	7,294679	7,52E-09	14,26482
<b>ARHGAP30</b>	1,951576	7,294456	7,52E-09	14,26379
<b>AOAH</b>	2,022829	7,283496	7,82E-09	14,21339
<b>GPR18</b>	1,906552	7,247948	8,9E-09	14,05004
<b>FCMR</b>	2,345243	7,245281	8,9E-09	14,03779
<b>CTSS</b>	1,85886	7,212286	9,8E-09	13,88638
<b>JAML</b>	2,005078	7,208323	9,8E-09	13,8682
<b>IDO1</b>	2,427764	7,18152	1,08E-08	13,74536
<b>IL10RA</b>	1,93838	7,167815	1,1E-08	13,6826
<b>CD180</b>	2,442512	7,155234	1,12E-08	13,62502

<b>BTK</b>	1,822653	7,133944	1,2E-08	13,52763
<b>CD53</b>	1,963203	7,121967	1,26E-08	13,47289
<b>DOK2</b>	1,952355	7,098064	1,38E-08	13,36371
<b>KLRB1</b>	1,867088	7,052678	1,64E-08	13,15669
<b>KCNA3</b>	1,843083	7,041004	1,68E-08	13,1035
<b>CD4</b>	1,767599	7,037579	1,68E-08	13,08791
<b>ITGB2</b>	1,846472	7,036282	1,68E-08	13,082
<b>GZMA</b>	2,132991	7,018763	1,77E-08	13,00225
<b>PRKCB</b>	1,981633	6,982665	2,03E-08	12,83811
<b>LYZ</b>	2,4763	6,937362	2,39E-08	12,63249
<b>ICOS</b>	1,818348	6,91292	2,62E-08	12,52172
<b>CCR7</b>	2,171186	6,852893	3,22E-08	12,25021
<b>SLAMF8</b>	1,857127	6,851186	3,22E-08	12,24251
<b>LAIR1</b>	1,751385	6,792389	3,96E-08	11,97732
<b>FCER1G</b>	1,869446	6,751178	4,54E-08	11,79191
<b>CCR2</b>	2,182519	6,735151	4,8E-08	11,7199
<b>CLEC7A</b>	2,009526	6,725072	5E-08	11,67465
<b>CD84</b>	1,750667	6,66175	6,49E-08	11,39087
<b>MYO1F</b>	1,78635	6,626769	7,51E-08	11,2345
<b>CCR5</b>	1,797454	6,52755	1,06E-07	10,79258
<b>FCGR3A</b>	2,251171	6,491721	1,21E-07	10,63359
<b>CXCR6</b>	1,972706	6,451916	1,41E-07	10,45734
<b>NCF1</b>	1,955246	6,42561	1,57E-07	10,34109
<b>PARP15</b>	1,750916	6,299638	2,51E-07	9,786924
<b>HLA-DQA1</b>	1,762569	6,24325	3,13E-07	9,54027
<b>ACKR1</b>	1,869911	6,228662	3,31E-07	9,476603
<b>CD38</b>	2,103315	6,220144	3,4E-07	9,439454
<b>SAMSN1</b>	1,753319	6,16897	4,09E-07	9,216727
<b>KLRD1</b>	2,101702	6,144577	4,51E-07	9,110828
<b>CCL19</b>	2,512973	6,132286	4,71E-07	9,057534
<b>CXCL9</b>	2,900973	6,073554	5,9E-07	8,803494
<b>CXCL10</b>	2,915862	5,994318	7,83E-07	8,46243
<b>IL1B</b>	1,905945	5,983085	8,18E-07	8,414238

<b>FCGR1A</b>	1,985466	5,92149	1,03E-06	8,150688
<b>CXCL11</b>	2,076845	5,921365	1,03E-06	8,150157
<b>JCHAIN</b>	3,077459	5,762247	1,83E-06	7,47509
<b>GAPT</b>	2,015482	5,75385	1,88E-06	7,439699
<b>CD79A</b>	1,87785	5,452486	6,03E-06	6,186383
<b>APOC1</b>	1,825951	5,350613	8,83E-06	5,770454
<b>FCGR3B</b>	1,844483	5,300474	1,04E-05	5,567259
<b>DERL3</b>	1,853816	5,094285	2,24E-05	4,742603
<b>CXCL13</b>	1,976654	4,99458	3,2E-05	4,350404
<b>CCL18</b>	1,751486	4,574763	0,000144	2,749844
<b>MZB1</b>	1,897199	4,474213	0,000202	2,379481
<b>HLA-DRB5</b>	1,88303	3,068326	0,012622	-2,17151

Tabla 5. Listado de 112 genes obtenido en muestras de sangre periférica

Con estos 112 genes (Tabla 5) se realizó una media geométrica con la finalidad de resumir en un solo parámetro la expresión de los genes con expresión diferencial en el rechazo. Este cálculo permite disminuir la variabilidad entre grupos respecto al análisis de los genes por separado. Para cada paciente se calculó la media geométrica de los 112 genes.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para comprobar si la expresión génica entre los grupos diagnósticos era diferente, independientemente de si eran biopsias de seguimiento o de causa (Figura 26).

Al realizar el PCA la primera componente explica un 12,1% de la variabilidad y la componente 2 un 6,6%, es decir, un 18,7% de la variabilidad total. En la figura se puede apreciar como los pacientes están distribuidos de forma aleatoria independientemente de su diagnóstico. Es decir, que no hay ningún patrón diferencial de expresión génica dependiente del diagnóstico.

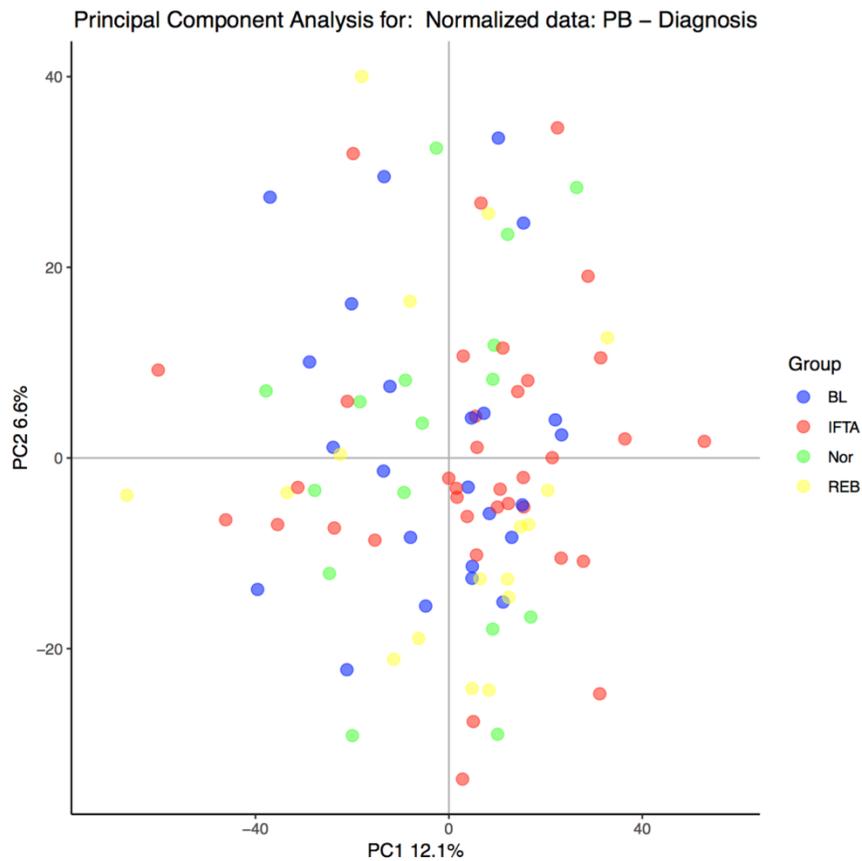


Figura 26. Análisis de componentes principales con los 4 grupos diagnósticos: BL, Borderline; IFTA, atrofia tubular y fibrosis intersticial; Nor, Normal; REB, Rechazo.

Una vez comprobado la distribución de la expresión génica entre grupos con diagnósticos histológicos diferentes, con el mismo PCA se comprueba si existen diferencias en la expresión génica entre las biopsias es de seguimiento o de causa.

Con este PCA (Figura 27) de nuevo se confirma la distribución aleatoria de los diagnósticos, tanto si son biopsias de seguimiento como de causa.

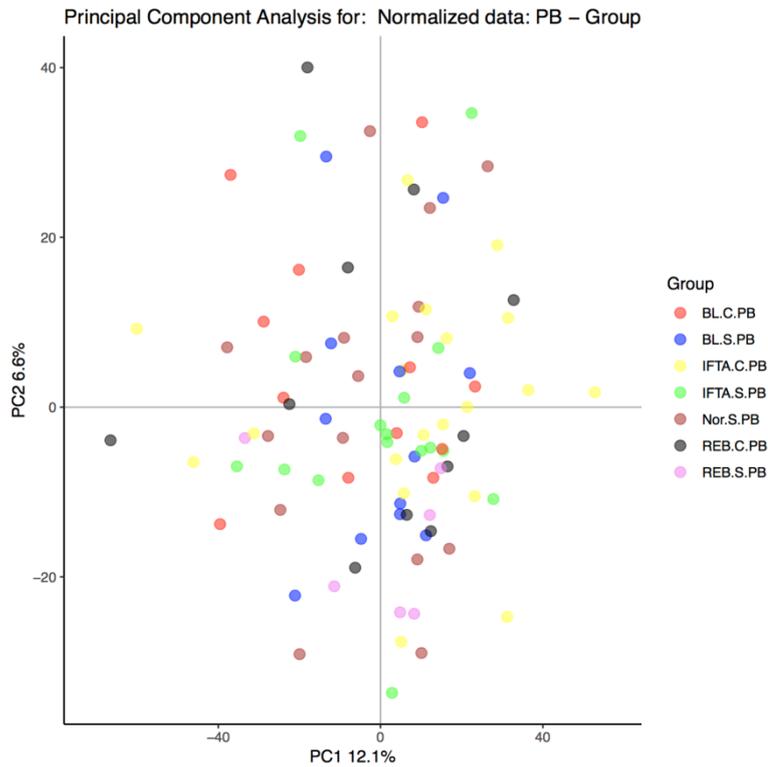


Figura 27. Análisis de componentes principales con los 7 grupos diagnósticos: Nor, Normal; Reb.C, Rechazo Causa; Reb.S, Rechazo Seguimiento; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Una vez observada la distribución de la expresión génica entre los grupos diagnósticos, se comparó la expresión de los 112 genes de rechazo en los 6 grupos de estudio (Normal, Rechazo, Borderline Seguimiento, Borderline Causa, IFTA Seguimiento, IFTA Causa) mediante Anova tal como se puede observar en la Figura 28.

En las comparaciones entre grupos de la Figura 28 se puede ver que el grupo de rechazo es diferente al grupo Borderline Seguimiento con un  $p < 0,03$ , diferente al IFTA Seguimiento con un  $p < 0,002$  y al grupo Normal con un  $p < 0,001$ . En cambio no hay diferencias significativas respecto a los diagnósticos de causa, tanto Borderline como IFTA. El grupo Normal es diferente a todos los grupos con un  $p < 0,001$ .

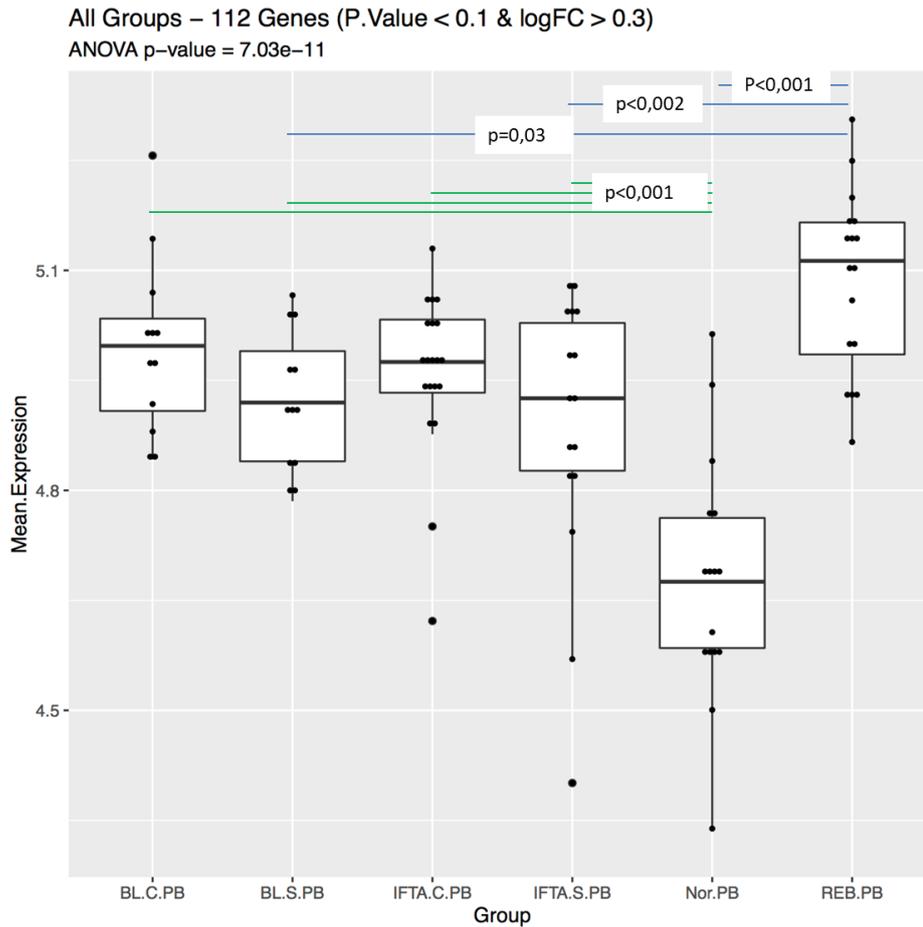


Figura 28. Comparación de nuestros 112 genes de rechazo en sangre periférica en los 6 grupos diagnósticos: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Para confirmar estos resultados se quiso realizar el mismo análisis utilizando listado de genes de rechazo obtenidos en sangre periférica, previamente descritos en la literatura por otros grupos. Con la finalidad de comprobar si en nuestros grupos de estudio los genes de rechazo estaban diferencialmente expresados, se consideraron el listado de genes de cada uno de estos autores: Roedder et al, Zhang et al y Van Loon et al (62,66,67). Se comprobó la expresión génica de estos genes en nuestro microarrays y se calculó la media geométrica para cada una de las publicaciones.

En la Figura 29 con el listado de genes de rechazo publicado en el artículo de Roedder et al. no se encontraron diferencias significativas en la expresión diferencial de genes de rechazo entre ninguno de los grupos de estudio.

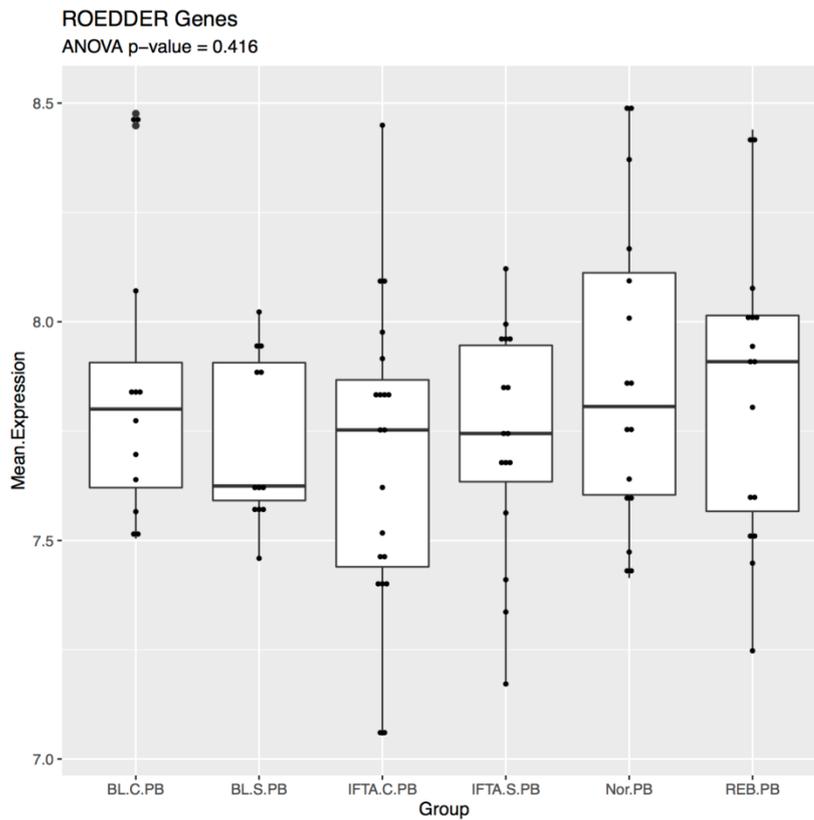


Figura 29. Comparación de genes de rechazo publicado en el artículo de Roedder et al. en los 6 grupos diagnósticos: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

En la Figura 30 con el listado de los genes de rechazo publicados en el artículo de Zhang et al, no se encontraron diferencias significativas en la expresión diferencial de genes de rechazo entre ninguno de los grupos de estudio.

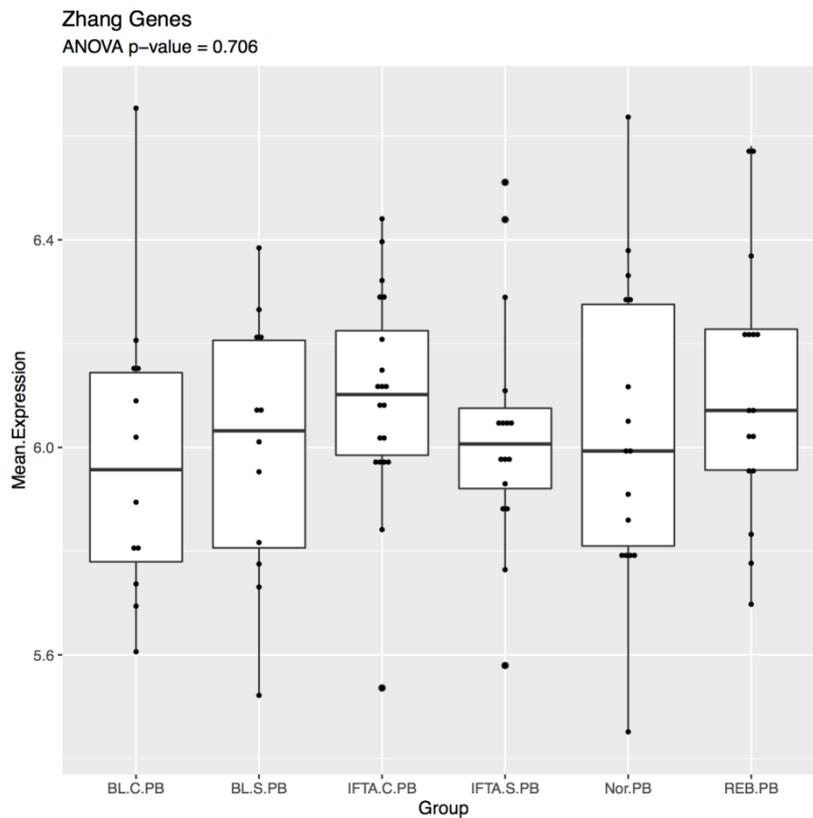


Figura 30. Comparación de genes de rechazo publicado en el artículo de Zhang et al. en los 6 grupos diagnósticos: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

De nuevo, encontramos unos resultados muy parecidos en la Figura 31 con el listado de los genes de rechazo publicados en el artículo de Van Loon et al, en el que no se encontraron diferencias significativas en la expresión diferencial de genes de rechazo entre ninguno de los grupos de estudio.

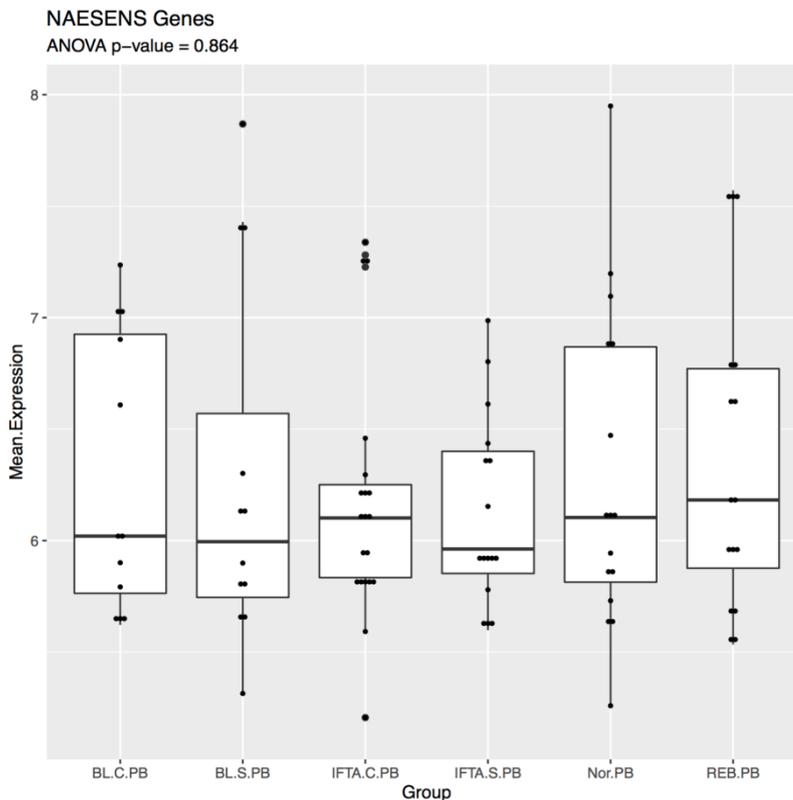


Figura 31. Comparación de genes de rechazo publicado en el artículo de Van Loon et al. en los 6 grupos diagnósticos: Nor, Normal; Reb, Rechazo; BL.S, Borderline Seguimiento, BL.C, Borderline Causa; IFTA.S, IFTA Seguimiento; IFTA.C, IFTA Causa.

Con cada uno de los listados de genes de los diferentes autores se ha podido observar el mismo patrón de expresión génica: no hay una expresión diferencial de genes de rechazo en sangre periférica entre el grupo con diagnóstico Rechazo versus el grupo con diagnóstico Normal y el resto de grupos diagnósticos.

## 16. Caracterización de la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica

Objetivo: El objetivo de este estudio es caracterizar la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica valorada con un panel de 20 citocinas.

Pacientes: Se han incluido un total de 236 pacientes consecutivos a los cuales se les ha realizado una biopsia y se ha obtenido muestra de sangre en suero para el estudio de las citocinas. Las características clínicas de los 236 pacientes como resumen general de los datos se muestra en la siguiente tabla.

Para las variables categóricas se han calculado las frecuencias (totales y en porcentaje entre paréntesis) y el intervalo de confianza exacto al 95%. Para las variables continuas se ha calculado la media y la desviación típica –mean(sd)- junto al intervalo de confianza para la media al 95% -IC[,]-.

Variable	Niveles	Datos
<b>NºTR (n=236)</b>	Primer Tx	204 (86,4%) [81,4;90,5]
	Retrasplante	32 (13,6%) [9,5;18,6]
<b>Edad R (n=236)</b>		51,5 (14,6) [49,7;53,4]
<b>Sexo R (n=236)</b>	Hombre	155 (65,7%) [59,2;71,7]
	Mujer	81 (34,3%) [28,3;40,8]
<b>IMC_R (n=236)</b>		26,3 (4,5) [25,7;26,9]
<b>ER1<sup>a</sup> (n=236)</b>	Glomerular	57 (24,2%) [18,8;30,1]
	Nefropatía diabética	24 (10,2%) [6,6;14,8]
	Nefroangioesclerosis	15 (6,4%) [3,6;10,3]
	No filiada	64 (27,1%) [21,6;33,3]
	Otras	30 (12,7%) [8,7;17,6]
	Poliquistosis	28 (11,9%) [8;16,7]
<b>Modalidad TSR (n=236)</b>	Tubulointersticial	18 (7,6%) [4,6;11,8]
	Dialisis peritoneal	60 (25,4%) [20;31,5]
	Hemodiálisis	153 (64,8%) [58,4;70,9]
	Pre diálisis	23 (9,7%) [6,3;14,3]
<b>CV_Total_PreTx (n=236)</b>		0,2 (0,5) [0,1;0,3]

<b>Inc_Total (n=236)</b>		3,8 (1,2) [3,7;4]
<b>DSA (n=236)</b>	No	215 (91,1%) [86,7;94,4]
	Si	21 (8,9%) [5,6;13,3]
<b>EdadD (n=231)</b>		53,6 (16,1) [51,5;55,7]
<b>SexoD (n=234)</b>	Hombre	141 (60,3%) [53,7;66,6]
	Mujer	93 (39,7%) [33,4;46,3]
<b>TipoD (n=236)</b>	Asistolia controlada	56 (23,7%) [18,5;29,7]
	Asistolia no controlada	2 (0,8%) [0,1;3]
	Muerte encefálica	145 (61,4%) [54,9;67,7]
	Vivo	33 (14%) [9,8;19,1]
<b>Inducción (n=236)</b>	Basiliximab	122 (51,7%) [45,1;58,2]
	Daclizumab	5 (2,1%) [0,7;4,9]
	No inducción	10 (4,2%) [2,1;7,7]
	Timoglobulina	99 (41,9%) [35,6;48,5]
<b>TIF (n=228)</b>		12,8 (7) [11,9;13,8]
<b>RechazoAgudo (n=236)</b>	No	169 (71,6%) [65,4;77,3]
	Si	67 (28,4%) [22,7;34,6]
<b>DGF (n=236)</b>	No	193 (81,8%) [76,3;86,5]
	Si	43 (18,2%) [13,5;23,7]
<b>Exitus (n=236)</b>	No	231 (97,9%) [95,1;99,3]
	Si	5 (2,1%) [0,7;4,9]

<b>Perdida_del_injerto (n=235)</b>	No	211 (89,8%) [85,2;93,3]
	Si	24 (10,2%) [6,7;14,8]
<b>CV_Total_PosTx (n=236)</b>	0	217 (91,9%) [87,7;95,1]
	1 o más	19 (8,1%) [4,9;12,3]
<b>TiempoBxmeses (n=223)</b>		15,8 (38,3) [10,7;20,8]
<b>Indicación_Bx (n=236)</b>	Bk positivo	2 (0,8%) [0,1;3]
	Deterioro crónico	5 (2,1%) [0,7;4,9]
	Función renal subóptima	7 (3%) [1,2;6]
	Deterioro Agudo	15 (7,2%) [4,3;11,3]
	Lenta recuperación función renal	2 (0,8%) [0,1;0,3]
	Proteinuria	51 (21,6%) [16,5;27,4]
	Retraso función injerto	17 (7,2%) [4,3;11,3]
	Seguimiento 12meses	26 (11%) [7,3;15,7]
	Seguimiento 3meses	111 (46,2%) [39,7;52,8]
<b>Infección_Bx</b>	No	215 (91,1%) [86,7;94,4]
	Si	21 (8,9%) [5,6;13,3]
<b>Diabetes</b>	No	132 (55,9%) [49,3; 62,4]
	Si	104 (44,1%) [37,6; 50,7]

Tabla 6. Características clínicas de los 236 pacientes. N°TR, número de trasplante; Edad R, edad receptor; Sexo R, Sexo receptor; IMC, índice de masa corporal; ER1ª, Enfermedad renal primaria; Modalidad TSR, modalidad de tratamiento sustitutivo renal; CV\_Total\_PreTx, sumatorio de enfermedad cardiovascular pre trasplante; Inc Total, número de incompatibilidades HLA totales; DSA, anticuerpos donante específicos pre trasplante (donor specific antibody); Edad D, Edad donante; Sexo D, Sexo donante; Tipo D, Tipo Donante; Inducción, tratamiento de inducción previo al trasplante; TIF, Tiempo de isquemia;

RechazoAgudo, episodio de rechazo agudo previo a la biopsia; DGF, retraso en la función del injerto (delayed graft function); ExitusR, exitus receptor; Pérdida del injerto, episodio de pérdida del injerto; CV Total PostTx, sumatorio de episodio de enfermedad cardiovascular post trasplante; TiempoBxmeses, tiempo pasado entre el trasplante y la biopsia; Indicación Bx, motivo indicación de la biopsia; Infección Bx, episodio de infección en el momento de la biopsia; Diabetes, diabetes mellitus tipo 2 pre y post trasplante renal.

Los diagnósticos histológicos de los 236 pacientes se muestran en la siguiente tabla:

Diagnósticos	Número de pacientes
<b>Normal</b>	51
<b>Borderline</b>	41
<b>IFTA</b>	78
<b>Recidiva</b>	28
<b>Nefropatía Bk</b>	5
<b>Pielonefritis</b>	7
<b>Rechazo Celular</b>	15
<b>Rechazo humoral+Mixto</b>	11

Tabla 7. Número de pacientes de los diferentes grupos diagnósticos

Para cada uno de los grupos diagnósticos se calculó la media y desviación estándar de la expresión de cada una de las 20 citocinas. Para visualizar qué grupos tenían la expresión media más alta de cada una de las citocinas, se ha subrayado en la tabla en color azul el grupo diagnóstico con la expresión media más alta y en color amarillo el grupo diagnóstico con el segundo valor más alto (Tabla 8).

Con los valores subrayados en color se puede observar que el grupo con los valores medios más altos de citocinas a nivel general es el rechazo humoral. El grupo de pacientes con diagnóstico de rechazo celular también tiene una expresión media de citocinas con valores altos respecto a los otros

grupos. Así mismo, el grupo con diagnóstico de Recidiva y Nefropatía BK también tiene una expresión media alta de citocinas. Los grupos con una expresión media de citocinas más baja son los grupos diagnósticos Normal, IFTA y Borderline.

	Normal (n=51)	Borderline (n=41)	IFTA (n=78)	Recidiva (n=28)	Nefro BK (n=5)	Pielonef (n=7)	RC (n=15)	RH (n=11)	p
<b>GMSCF</b>	7,30±1,48	7,73± 1,58	7,82±2,74	8,35±4,24	7,50±0,94	7,00±0,87	7,92±1,41	8,09±1,13	0,35
<b>ICAM1</b>	1870,35±1 844,77	1780,25±1 497,61	1609,95±1 399,51	1715,01±1 407,38	2188,60±1 917,69	1813,68±1 109,71	1595±144 4,55	3350,82±2 434,92	0,45
<b>IFNG</b>	19,30±9,85	18,75±9,50	17,99±8,64	19,60±7,88	19,40±5,97	17,14±5,29	17,10±5,4 7	25,22±8,42	0,22
<b>IL6</b>	6,85±2,61	7,88±9,40	6,60±1,98	7,71±3,93	7,00±0,71	7,14±2,29	6,93±1,22	7,41±1,88	0,19
<b>TNF</b>	49,61±29,8 9	52,57±28,6 2	49,49±25,0 1	55,67±26,9 3	53,30±28,1 4	54,89±29,7 2	46,10±20, 09	74,54±28,6 7	0,23
<b>IL1beta</b>	9,05±2,26	8,99±2,44	8,78±2,18	9,38±3,04	9,85±2,44	8,29±1,52	9±1,51	11,05±3,64	0,22
<b>IL10</b>	10,72±12,0 9	8,95±2,72	8,86±3,39	10,2±6,24	10,40±3,36	9±3,21	15,08±16, 18	14,75±13,2 8	0,12
<b>IL1α</b>	29,22±19,0 3	36,45 ±22,02	32,38±16,0 8	61,14 ±95,79	52,45±25,4 2	52,25±30,1 2	46,69±36, 48	158,61±32 4,77	0,00 01
<b>IL12p70</b>	35,22±18,7 3	36,02±17,4 4	35,40±17,7 3	45,01±16,5 4	35,40±11,9 7	32,89±18,1 3	40,90±13, 75	44,59±16,6 9	0,10
<b>IL13</b>	14,86±6,39	16,27±7,15	15,45±6,86	16,94±7,48	18±7,34	14,96±4,85	15,53±5,2 8	19,36±5,21	0,22
<b>IL17</b>	14,99±7,29	14,41±5,96	14,41±5,87	16,85±8,15	17,60±7,43	13,86±4,32	14,10±4,9 9	19,07±6	0,32
<b>IL4</b>	10,49±3,71	11,07±4,06	10,33±4,17	11,30±4,30	11,40±3,38	10,04±3,39	11,77±4,7 3	14,18 ± 6,71	0,09
<b>IL8</b>	18,46±22,5 5	17,29±14,5 7	17,56±16,6 6	35,19±58,8 5	43,25±26,4 4	30,46±25,7 2	42,55±62, 02	26,77±24,3 4	0,00 4

<b>IP10</b>	119,96±25 4,69	101,69±14 2,20	73,46 ±86,54	88,62 ±93,04	138,10±61, 34	148,32±11 7,54	193,72±24 6,53	150,41±12 0,41	0,01
<b>MCP1</b>	229,78±27 5,45	194,66±18 5,11	263,52±34 1,03	242,48±20 6,19	210,61±14 9,02	186,82±21 7,51	240,37±22 6,69	499,98±44 7,97	0,40
<b>INFα</b>	54,81±28,8 0	51,94 ±25,86	48,51 ±26,22	59,78 ±20,82	57,30 ±19,09	45,68 ±18,54	47,05 ±25,14	64,14 ±20,78	0,23
<b>MIP1α</b>	80,56 ±170,96	48,11 ±37,09	53,46 ±66,03	89,55 ±146,66	67,40 ±61,82	82,79 ±55,76	55,67 ±39,05	81,07 ±72,98	0,16
<b>MIP1β</b>	62,99 ±41,56	66,57 ±45,73	69,38 ±41,89	107,55±13 4,77	79,30 ±38,11	106,04±87, 84	67,30 ±33,86	162,73±20 8,14	0,29
<b>Se_sele ctina</b>	1639,10±1 441,42	1529,02±1 379,32	1528,20±1 446,49	2140,70±1 365,87	1591,55±1 156,17	1581,43±1 790,18	1221,28±7 78,97	2187,40±1 736,79	0,30
<b>SP_sele ctina</b>	691,35±74 2,17	592,42±62 6,31	720,85±92 5,84	762,12±84 8,97	1200,05±7 78,75	965,64±85 8,56	835,43±67 6,92	789,39±69 2,08	0,40

Tabla 8. Representación del nivel de expresión media de cada una de las 20 citocinas en los grupos de pacientes agrupados según diagnóstico de la biopsia renal. En azul se ha resaltado el grupo diagnóstico con un valor medio más alto en la expresión de cada una de las citocinas respecto a los otros grupos y en color amarillo el segundo valor medio más alto. El p valor se ha calculado con la prueba de Kruskal Wallis al ser consideradas las citocinas variables no normales

## 16.1 Obtención de perfiles de pacientes a partir de los grupos histológicos

Teniendo en cuenta el nivel de expresión media de la citocinas se decidieron agrupar los diagnósticos en los siguientes 4 grupos: No INFLA (Normal + IFTA), cambios Borderline, InfecRec (Nefropatía BK, Recidiva, Pielonefritis), Rechazo (rechazo celular + rechazo humoral). El grupo de pacientes con diagnóstico normal se ha agrupado con el grupo diagnóstico IFTA al tener los dos grupos una expresión media de citocinas más baja. El grupo de pacientes con diagnóstico Borderline se mantuvo como grupo único, al ser considerado en la práctica clínica un diagnóstico con un amplio abanico de patrones de inflamación dependiendo del caso clínico. Al mantenerlo como grupo único, quisimos explorar su patrón de inflamación y ver si tenía una expresión diferencial de citocinas respecto al grupo No INFLA y respecto al grupo Rechazo.

### 16.1.1 Caracterización de los grupos histológicos agrupados

Una vez agrupados los diferentes diagnósticos, realizamos un análisis exploratorio con las variables clínicas, de inflamación sistémica y variables histológicas para poder observar si había alguna asociación con los 4 grupos diagnósticos.

La variable Sexo R (Sexo receptor) ha obtenido un p valor de 0,04 al realizar las comparaciones entre grupos; la proporción de hombres ha sido superior en el grupo No INFLA con un 67%, en el grupo de cambios Borderline con un 76% y en el grupo InfecRec (infecciones/glomérulo nefritis) con un 67%. En el grupo diagnóstico de Rechazo ha sido mayor la proporción de mujeres, con un 58%. La variable Sexo d (Sexo donante) en las comparaciones entre grupos ha obtenido un p valor de 0,03; la proporción de hombres ha sido superior en el grupo No INFLA con un 66%, en el grupo de Rechazo con un 54% y en el grupo InfecRec con un 67%. En el grupo diagnóstico de cambios Borderline la proporción de mujeres ha sido superior con un 59% respecto al 41% de hombres. La variable RA (rechazo agudo pre biopsia) ha obtenido un p valor inferior a 0,001 al realizar las comparaciones entre grupos; la proporción de rechazos en el grupo diagnóstico No Infla ha sido del 13%, en el grupos de cambios Borderline de un 59%, en el grupo Rechazo de un 73% y en el grupo de InfecRec de un 18%. La variable creatinina ha obtenido un p valor de 0,01 al realizar las comparaciones entre grupos; el grupo con un valor superior de creatinina ha sido el grupo diagnóstico Rechazo (2,33mg/dl), seguido del grupo InfecRec (1,81 mg/dl). La variable prot/creat (cociente proteína/creatinina) se ha comportado de la misma manera en los grupos diagnósticos, al tener un valor superior en el grupo de Rechazo (1623,96 g/g) seguido del grupo InfecRec (1418,48 g/g). La variable tiempo (tiempo transcurrido del trasplante a la biopsia) ha sido superior en el grupo InfecRec seguido del grupo Rechazo. Por último, la variable Motivo (motivo de la biopsia ya sea de causa o de seguimiento) ha obtenido una proporción de pacientes con biopsia de causa superior en el grupo de Rechazo con un 69% y en el grupo InfecRec con un 70%.

En la Tabla 9 se resumen las características clínicas principales de los pacientes:

	No INFLA n=119	Borderline n=41	Rechazo n=26	InfecRec n=40	p
<b>Edad R (años)</b>	50,72 ±13,64	52,88±16,06	54,07±15,61	51,15±15,63	0,67
<b>Sexo R (M/H)</b>	43/86 33%-67%	10/31 24%-76%	15/11 58%-42%	13/27 33%-67%	<b>0,04</b>
<b>Edad D (años)</b>	53,60±15,25	54,96±17,32	56,70±14,84	49,97±17,97	0,37
<b>Sexo D (M/H)</b>	44/84 34%-66%	24/17 59%-41%	12/14 46%-54%	13/26 33%-67%	<b>0,03</b>
<b>Tipo Donante</b>	77/0/33/19	28/1/7/5	14/1/6/5	26/0/10/4	0,51
<b>Nº HLA</b>	3,73±1,23	3,80±1,17	3,77±1,18	4,1±1,06	0,39
<b>DGF (No/Si)</b>	112/17 87%-13%	29/12 71%-29%	22/4 84%-15%	30/10 75%-25%	0,07
<b>RA (No/Si)</b>	112/17 87%-13%	17/24 41%-59%	7/19 27%-73%	33/7 83%-17%	<b>0,00</b>
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	1,53±0,52	1,75±0,58	2,33±1,45	1,81±1,28	<b>0,01</b>
<b>Prot/creat (g/g)</b>	468,93±668,43	758,20±1092,10	1623,96±2067,84	1418,48±1355,24	<b>0,00</b>
<b>IMC (kg/m2)</b>	26,06±4,23	26,16±4,04	25,93±6,16	27,46±4,79	0,19
<b>DM II (No/Si)</b>	70/59 54%-46%	23/18 56%-44%	14/12 54%-46%	25/15 63%-37%	0,83

<b>Enf Cardiovascular</b>		0,06±0,27	0,15±0,42	0,12±0,33	0,1±0,30	0,47
<b>Infecciones (No/Si)</b>		114/15 88%-12%	36/5 88%-12%	26/0 100%	39/1 98%-2%	0,10
<b>Tiempo (meses)</b>	<b>Bx</b>	19,88±45,09	23,00±50,63	32,53±46,35	43,51±54,91	<b>0,05</b>
<b>Motivo (Cau/Seg)</b>	<b>Bx</b>	35/94 27%-73%	18/23 44%56%	18/8 69%-31%	28/12 70%-30%	<b>0,00</b>
<b>DSA (No/Si)</b>	<b>preTx</b>	117/12 90%-10%	40/1 98%-2%	22/4 85%-15%	36/4 90%-10%	0,32

Tabla 9 Características clínicas de los pacientes. Edad R, edad receptores; Sexo R, Sexo receptores; Edad D, Edad donante; Sexo D, Sexo donante; Tipo Donante (Muerte encefálica/Mastricht 2/Mastricht 3/ Vivo); N° HLA, número de incompatibilidades HLA; DGF, retraso en la función del injerto (delayed graft function); RA, rechazo agudo previo a la biopsia; Prot/creat, ratio proteína/creatinina en orina; IMC, índice de masa corporal; DM II, diabetes mellitus tipo 2 pre y post trasplante renal; Enf cardiovascular, Enfermedad cardiovascular sumatorio; Infecciones, en el momento de la biopsia si el paciente presentaba algún tipo de infección; Tiempo, tiempo del trasplante a la biopsia en meses; Motivo, motivo de la biopsias (Causa o Seguimiento); DSA preTx, anticuerpos donante específicos pre trasplante (donor specific antibody)

Se ha analizado los niveles de proteína C reactiva en los 4 grupos al ser un marcador utilizado en la práctica clínica que mide el grado de inflamación en sangre (Tabla 10). El grupo de infecciones recurrentes y el grupo de rechazo obtuvieron unos niveles más altos respecto a los otros grupos (No INFLA y Borderline) con un p valor de 0,0313.

	No INFLA n=129	Borderline n=41	Rechazo n=26	InfecRec n=40	p
<b>PCR (mg/dl)</b>	0,59±2,05	0,43±0,55	1,47±3,66	1,88±5,78	<b>0,0313</b>

Tabla 10. Niveles de Proteína C Reactiva (PCR) en los 4 grupos diagnósticos. El p valor se ha calculado con la prueba de Kruskal Wallis al ser consideradas estas variables no normales. Valores expresados en media±desviación estándar

Para medir la inflamación sistémica también evaluamos la expresión media de cada una de las citocinas en los 4 grupos (Tabla 11). Los valores mostrados en la tabla representan la media y la desviación estándar de cada una de las 20 citocinas en los 4 grupos. Para visualizar qué grupos tenían la expresión media más alta de cada una de las citocinas, se ha subrayado en la tabla en color azul el grupo diagnóstico con la expresión media más alta y en color amarillo el grupo diagnóstico con el segundo valor más alto.

El panel de 20 citocinas se ha analizado obteniendo IL-6, IL-10, IL1-alpha, IL-12p70, IL-4, IL-8, IP-10, MIP1-alpha valores de p valor inferiores a 0,05 al realizar las comparativas entre grupos para cada citocina. El grupo Rechazo obtuvo los valores medios de citocinas más altos en todas las citocinas con p valores inferiores a 0,05, menos en la IL-6 y MIP1-alpha. En ambas citocinas el grupo de InfecRec supera al valor medio del grupo Rechazo.

	No INFLA n=129	Borderline n=41	Rechazo n=26	InfecRec n=40	p
GM_SCF	7,62±2,33	7,73±1,58	7,99±1,28	8,01±3,60	0,1107
ICAM_1	1712,9±1588,70	1780,25±1497,61	2337,85±2079,11	1791,48±1450,43	0,4339
IFN_G	18,51±9,12	18,75±9,50	20,54±7,87	19,14±7,20	0,2761
IL_6	6,70±2,24	7,88±9,40	7,13±1,52	7,52±3,41	0,0387
TNF- alfa	49,54±26,93	52,57±28,62	58,13±27,58	55,23±26,83	0,3487
IL-1beta	8,89±2,21	8,99±2,44	9,87±2,76	9,24±2,76	0,1743
IL_10	9,60±8,05	8,95±2,72	14,94±14,74	10,06±5,47	0,0161
IL1_alpha	31,13±17,30	36,45±22,02	94,04±214,75	58,5±81,08	0,0002
IL_12p70	35,32±18,06	36,02±17,44	42,46±14,85	41,69±16,78	0,0450

IL_13	15,22±6,66	16,27±7,15	17,15±5,49	16,73±6,98	0,1115
IL_17	14,64±6,45	14,41±5,96	16,20±5,89	16,42±7,48	0,2444
IL_4	10,39±3,98	11,07±4,06	12,79±5,66	11,09±4,00	0,0294
IL_8	17,92±19,12	17,29±14,57	35,88±49,54	35,37±50,83	0,0010
IP_10	91,84±174,26	101,69±142,20	175,39±200,77	105,25±95,78	0,0033
MCP_1	250,18±316,03	194,66±185,11	350,20±355,19	228,75±198,70	0,3385
INF_alpha	51,00±27,33	51,94±25,86	54,28±24,51	57,00±20,47	0,3907
MIP1_alpha	64,18±119,23	48,11±37,09	66,41±56,08	85,60±125,76	0,0475
MIP1_beta	66,86±41,71	66,57±45,73	107,67±142,42	103,76±118,32	0,1611
Se_selectina	1572,04±1439,8 7	1529,02±1379,32	1630,03±1335,41	1974,18±1409,99	0,2285
Sp_selectina	709,17±854,99	592,42±626,31	815,95±669,87	852,48±835,61	0,1948

Tabla 11. Expresión del panel de 20 citocinas en los 4 grupos. Valores expresador en media±desviación estándar. El p valor se ha calculado con la prueba de Kruskal Wallis al ser consideradas estas variables no normales

De la misma manera, se han analizado las variables histológicas en cada uno de los 4 grupos (Tabla 12). Se han obtenido valores de p valor inferiores a 0,05 en las siguientes variables histológicas: g, i, t, ci, ct, cpt, i-IFTA y t-IFTA. El grupo de rechazo presenta niveles medios más altos en todas las variables histológicas que han obtenido una significancia estadística al ser comparadas entre los 4 grupos.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

BANFF	No INFLA n=119	Borderline n=41	Rechazo n=26	InfecRec n=40	p
<b>g</b>	0,18 ± 0,52	0,38 ± 0,70	1,23 ± 1,21	0,33 ± 0,69	<b>0,0011</b>
<b>i</b>	0,11 ± 0,33	0,95 ± 0,50	1,19 ± 0,90	0,55 ± 0,88	<b>0,0001</b>
<b>t</b>	0,12 ± 0,32	1,07 ± 0,47	1,31 ± 0,88	0,45 ± 0,71	<b>0,0001</b>
<b>v</b>	0,06 ± 0,27	0,03 ± 0,16	0,48 ± 0,71	0,03 ± 0,16	0,0743
<b>ah</b>	0,55 ± 0,81	0,71 ± 0,87	0,65 ± 0,94	0,8 ± 0,99	0,5844
<b>cg</b>	0,06 ± 0,30	0,03 ± 0,16	0,46 ± 0,76	0,18 ± 0,50	0,1618
<b>ci</b>	0,81 ± 0,75	1,07 ± 0,72	1,31 ± 0,97	1,13 ± 0,91	<b>0,0231</b>
<b>ct</b>	0,81 ± 0,63	1,15 ± 0,42	1,24 ± 0,72	1,15 ± 0,80	<b>0,0034</b>
<b>cv</b>	0,76 ± 0,88	0,71 ± 0,87	0,88 ± 1,03	0,92 ± 0,98	0,8314
<b>mm</b>	0,07 ± 0,34	0 ± 0	0,32 ± 0,63	0,25 ± 0,54	0,2007
<b>cpt</b>	0,14 ± 0,41	0,61 ± 0,77	1,12 ± 1,03	0,36 ± 0,67	<b>0,0001</b>
<b>i-IFTA</b>	1,10 ± 1,18	1,84 ± 1,13	2,13 ± 1,08	1,61 ± 1,29	<b>0,0002</b>
<b>t-IFTA</b>	0,34 ± 0,48	0,73 ± 0,65	1,17 ± 0,82	0,61 ± 0,69	<b>0,0001</b>

Tabla 12. Expresión de los marcadores de la biopsia renal realizada a los pacientes según su grupo diagnóstico, expresado en media y desviación estándar. g, glomerulitis del trasplante; i, inflamación intersticial; t, tubulitis; v, endoarteritis; ah, hiliariosis arteriolar; cg, glomerulopatía crónica del trasplante; ci, fibrosis intersticial crónica; ct, tubulitis crónica; cv, engrosamiento intimal fibroso vascular crónico; mm, expansión de la matriz mesangial; cpt, capilaritis

peritubular. El p valor se ha calculado con la prueba de Kruskal Wallis al ser consideradas estas variables no normales.

## 16.2 Obtención de perfiles de pacientes a partir de las citocinas

Una vez realizado este análisis, quisimos realizar un nuevo estudio de los datos con el objetivo de obtener perfiles de pacientes a partir de la expresión de las citocinas. En este análisis, a diferencia de los anteriores, no agrupamos a los pacientes según su diagnóstico histológico, sino que agrupamos los pacientes según su perfil de expresión de las citocinas.

Primero de todo se muestra un esquema de los procedimientos realizados:

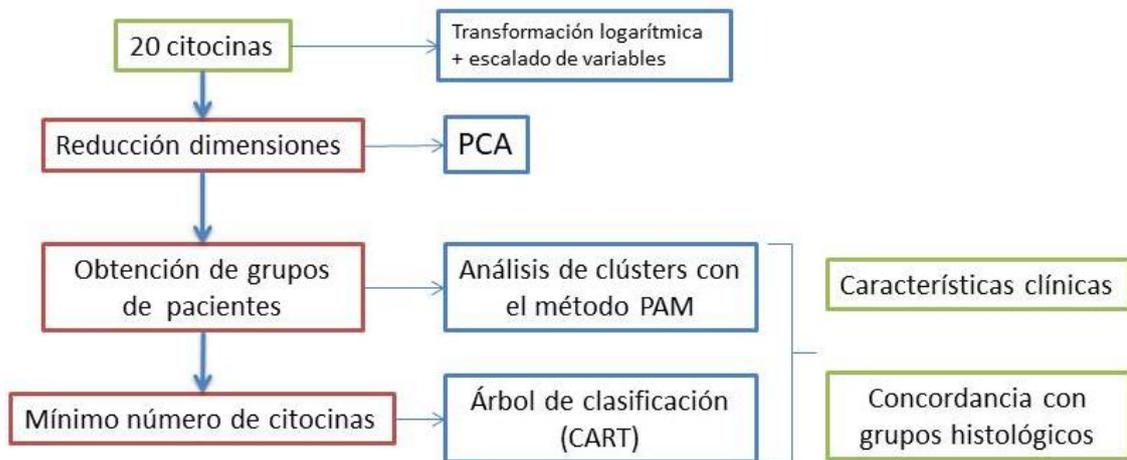


Figura 32. Esquema general del análisis con el panel de 20 citocinas. PCA, análisis de componentes principales; PAM, partición alrededor de medoides; CART, árbol de clasificación.

### 16.2.1 Análisis exploratorio de las citocinas

En primer lugar se ha calculado la matriz de correlaciones para las 20 citocinas. La parte inferior de la diagonal muestra el diagrama de dispersión para cada pareja de variables. La parte superior de la diagonal muestra el coeficiente de correlación de Pearson. En la diagonal se observa la distribución para cada una de las variables (Figura 33).

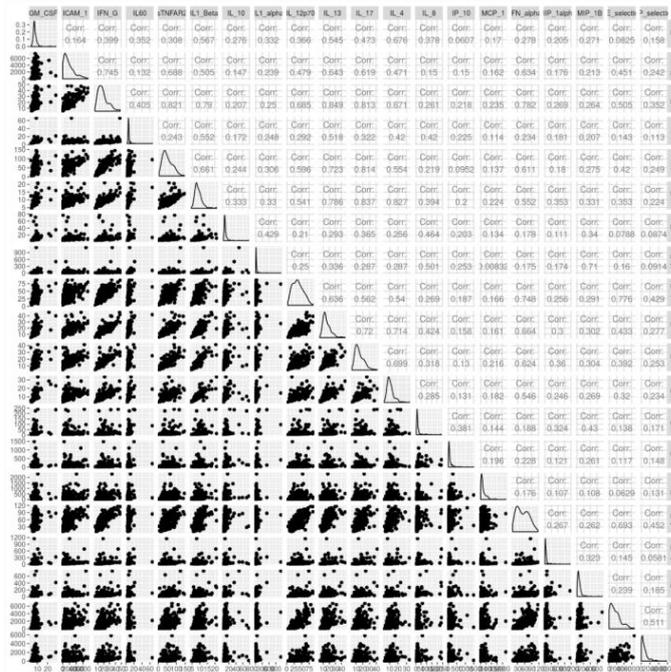


Figura 33. Matriz de correlaciones de las 20 citocinas

Para aumentar la robustez de los análisis se ha procedido a escalar las variables después de haber aplicado a los datos una transformación logarítmica.

### 16.2.2 Reducción de la dimensión

Una vez las citocinas han sido escaladas se ha procedido a reducir la dimensión para el conjunto de datos de citocinas mediante un análisis de componentes principales (PCA). El objetivo es obtener una representación de los datos con el mínimo número de dimensiones que permitan perder la mínima información posible de los datos. A continuación se muestra el porcentaje de variabilidad explicada por cada una de las componentes. En la Figura 34 se muestra que la primera componente explica un 52% de la variabilidad total, la componente dos un 10 % y así sucesivamente. Al realizar un sumatorio de la variabilidad explicada de las 10 primeras componentes encontramos que representan un 90% de la variabilidad total (Figura 34).

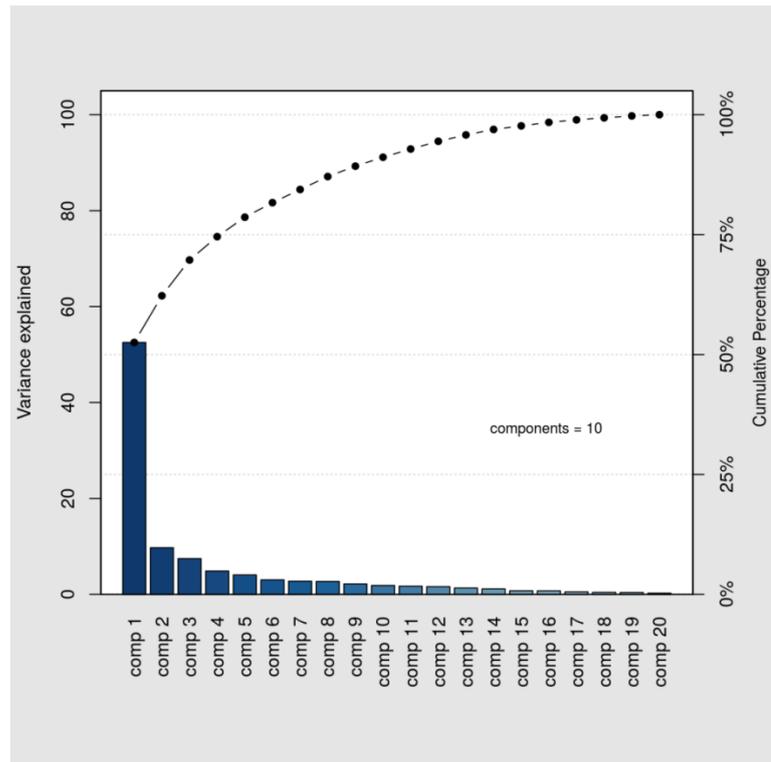


Figura 34. Variabilidad explicada en cada una de las componentes

Seguidamente se indica la contribución de cada una de las citocinas estudiadas en cada una de las dimensiones (componentes). Tal y como se muestra en la Figura 35 la mayoría de las citocinas se correlacionan con la dimensión 1. Esto conlleva que existe una gran colinealidad entre las citocinas. Cabe destacar que la citocina MCP-1 tiene su mayor rango de expresión en la dimensión 4 o la SP-selectina tiene una fuerte expresión en la dimensión 8.

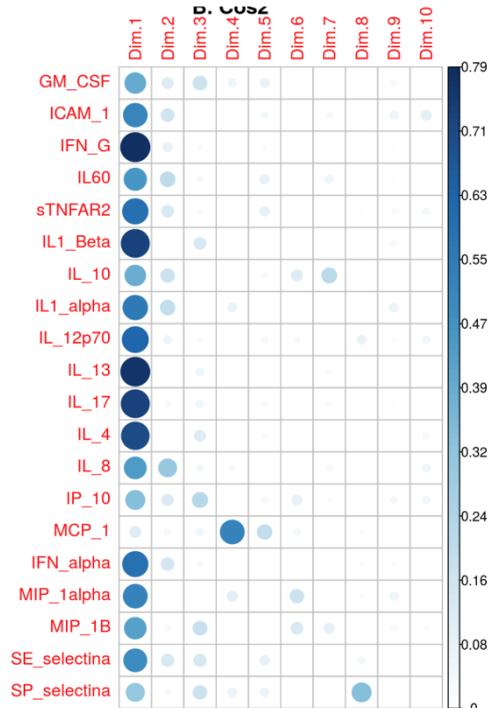


Figura 35. Contribución de las citocinas en cada una de las dimensiones

Con el objetivo de comprobar si realmente todas las citocinas están o no correlacionadas se han representado gráficamente las citocinas en un círculo de correlación (Figura 36). Se observa que todas las citocinas se correlacionan positivamente con la dimensión 1 del PCA. En cambio, en la dimensión 2 del PCA unas citocinas se correlacionan de forma positiva y otras de forma negativa.

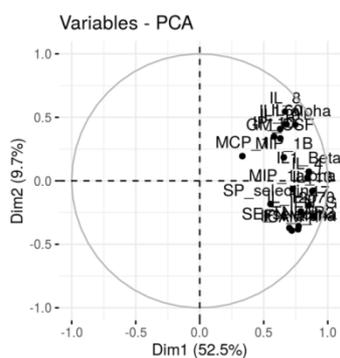


Figura 36. Círculo de correlación de las 20 citocinas

### 16.2.3 Obtención de perfiles de pacientes con el análisis de clústers con el método PAM

Se ha realizado un análisis de clústers con el objetivo de obtener perfiles de pacientes teniendo en cuenta las 10 dimensiones obtenidas en el apartado anterior. Una vez obtenida la correspondiente matriz de distancias se ha procedido a estimar los grupos a partir del método PAM (Partición alrededor de Medoides). A continuación se muestran los resultados obtenidos con el método PAM. Se ha calculado el número óptimo de grupos considerando un mínimo de 2 y un máximo de 10.

En la Figura 37 se puede observar que 2 clústers obtienen el valor más alto y, por lo tanto, es el número más óptimo de grupos con los que agrupar a los pacientes.

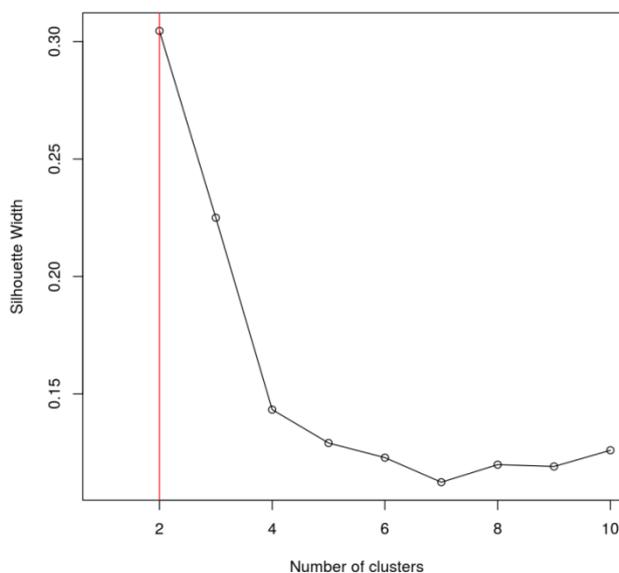


Figura 37. Número de clústers obtenidos con el método PAM

En los análisis realizados previamente se ha observado una gran colinealidad entre citocinas y con la reducción de la dimensión y la agrupación por clústers se ha conseguido identificar dos grupos. Con estos datos, se realizó un proceso de construcción de un árbol de clasificación (CART) asociado a los grupos identificados en los pasos anteriores (Figura 38).

El análisis CART escogió a tres citocinas MIP-1alpha, IL-13 e IL-4 como aquellas citocinas que mejor permiten clasificar a nuestros pacientes en los dos

grupos previamente generados. El CART ha clasificado a los pacientes en 4 grupos (Node). Cada “node” tiene en cuenta el % de probabilidad de pacientes que cumplan las características del árbol. Por ejemplo, para que un paciente esté en el “node 3”, ha de tener un valor de MIP1-alpha menor de 30,25 y de IL-13 menor de 12,875. El color gris representa aquellos pacientes con un nivel de expresión bajo de citocinas (menos inflamados=grupo 1 del método PAM) y el color negro un nivel de expresión alto de citocinas (más inflamados=grupo 2 del método PAM). En el “node 3” hay 65 pacientes que tendrían una menor expresión de citocinas, a excepción de 1 paciente con expresión alta de citocinas. En el “node 4” encontramos a 15 pacientes en los cuales la mitad tendría una expresión baja de citocinas y la otra mitad alta. En el “node 6” hay 22 pacientes en los que la mitad tienen una expresión baja de citocinas y la otra mitad una expresión alta. En el “node 7” hay 134 pacientes que una expresión alta de citocinas a excepción de 1 paciente, que tiene una expresión baja de citocinas.

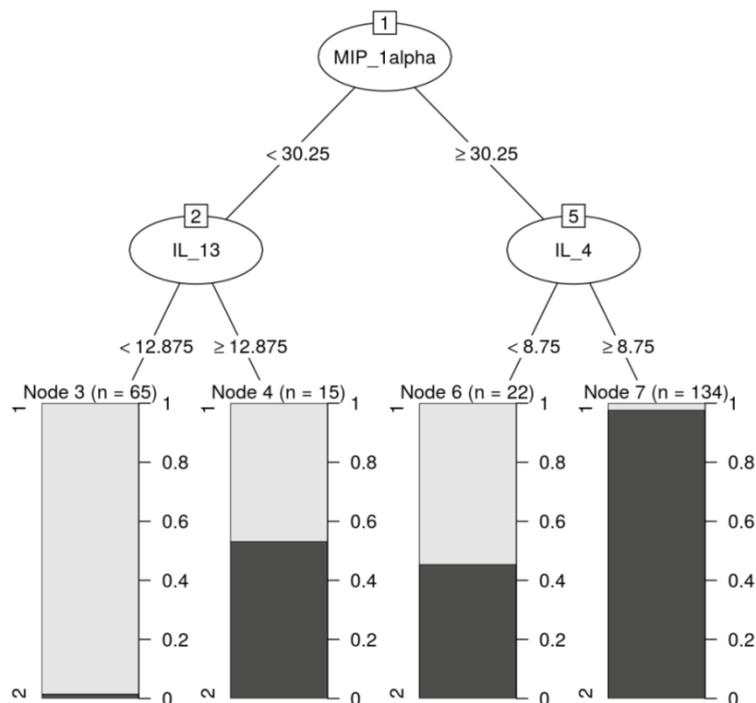


Figura 38. Árbol de clasificación (CART)

A continuación en la Tabla 13 se muestran los datos estadísticos obtenidos del árbol de clasificación CART con las tres citocinas seleccionadas: MIP-1alpha, IL-13 y IL-4. Estos datos estadísticos demuestran que clasificar a

nuestros pacientes con estas 3 citocinas tiene una precisión del 91% una sensibilidad del 88% y una especificidad del 93%.

<b>Accuracy</b>	0,911	<b>Mcnemar's Test P-value</b>	1
<b>95% CI</b>	(0,87;0,94)	<b>Sensitivity</b>	0,88
<b>P- Value</b>	<2e-16	<b>Specificity</b>	0,93
<b>Kappa</b>	0,81	<b>Balanced Accuracy</b>	0,91

Tabla 13. Datos estadísticos obtenidos con CART

Para los análisis realizados posteriormente los grupos que se tuvieron en cuenta son los siguientes:

- 1: se corresponde al Node 3 del árbol de clasificación
- 1-2: se corresponde al Node 4 y 6 del árbol de clasificación
- 2: se corresponde al Node 7 del árbol de clasificación

Se han agrupado el node 4 y el node 6 al considerarse que representaba a pacientes con valores de expresión de citocinas medios; ni muy altos, ni muy bajos. A continuación se muestra la correspondencia entre los grupos obtenidos con PAM y la nueva clasificación del CART. En la primera fila están situados los 2 grupos obtenidos con el método PAM y en la primera columna están situados los 3 grupos obtenidos con el método CART (1, 1-2, 2).

Como se puede observar en la Tabla 14 hay 64 pacientes que coinciden en el grupo 1 (baja inflamación) de ambas clasificaciones, así como 131 que coinciden en el grupo 2 (alta inflamación) en ambas clasificaciones. En el grupo 1-2 de la clasificación CART hay 19 pacientes que estaban en el grupo 1 de la clasificación PAM y 18 pacientes que estaban en el grupo 2 de la clasificación PAM.

	1	2
1	64	1
1-2	19	18
2	3	131

Tabla 14. Correlación entre la clasificación PAM y la clasificación del CART

#### 16.2.4 Heatmap

Con el objetivo de visualizar el conjunto de datos se ha realizado un heatmap, agrupando según los individuos y citocinas (Figura 39). El código de colores es: azul para los valores bajos y rojo para los valores elevados. Se ha realizado una agrupación jerárquica de las muestras y las citocinas para facilitar su interpretación. El siguiente gráfico muestra los individuos agrupados según el método CART, método utilizado para la caracterización de los individuos. El color negro es el grupo 1, los rojos el grupo 1-2 y el verde el grupo 2.

En el Heatmap se puede apreciar que el grupo 1 tiene una expresión de citocinas en los pacientes reflejado en el gráfico con color azul, es decir, una expresión de citocinas baja. El grupo 1-2 tiene a pacientes con una expresión de citocinas baja y otros alta, en el gráfico se ve reflejado con los colores azul y rojo. Y el grupo 2 tiene una expresión general de citocinas alta, por ello la mayor parte del gráfico en toda la parte derecha es de color rojo.

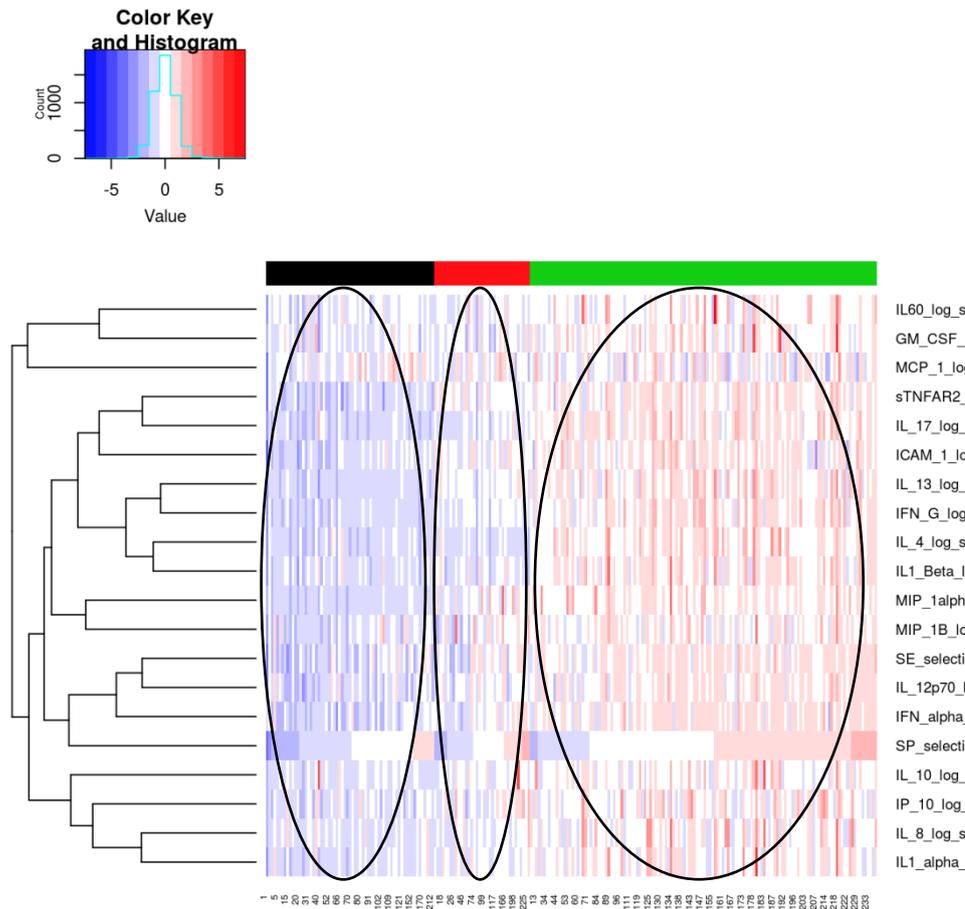


Figura 39. Heatmap

### 16.2.5 Caracterización de los grupos obtenidos con el método CART

Se ha realizado un análisis de las variables clínicas asociadas a los grupos obtenidos con el método CART. Para las variables categóricas se han calculado las frecuencias (totales y en porcentaje entre paréntesis) y el intervalo de confianza exacto al 95%. Para las variables continuas se ha calculado la media y la desviación típica  $-\text{mean}(\text{sd})-$  junto al intervalo de confianza para la media al 95%  $-\text{IC}[,]-$ .

Teniendo en cuenta las variables que han obtenido un p valor inferior al 0,05 al realizar las comparaciones entre grupos, podemos deducir los siguientes resultados: La variable Edad R (edad receptor) ha obtenido un valor superior en el grupo 1-2 con un valor de medio de 59,7 años. Respecto a la variable EdadD (edad donante) el grupo con un valor superior ha sido, de nuevo, el 1-2 con un valor medio de 62,2 años en su conjunto de pacientes. Por

último, la variable TiempoBxmeses (tiempo transcurrido del trasplante a la biopsia) ha obtenido un valor medio superior en el grupo 2, seguido del grupo 1.

Variable	Niveles	1	1-2	2	p-valor
<b>Edad R (n=236)</b>		65 48,5 (15) [44,8;52,3]	37 59,7 (13,8) [55,1;64,3]	134 50,7 (13,9) [48,4;53,1]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Sexo R (n=236)</b>	Hombre	46 (70,8%) [58,2;81,4]	20 (54,1%) [36,9;70,5]	89 (66,4%) [57,8;74,3]	0,223
	Mujer	19 (29,2%) [18,6;41,8]	17 (45,9%) [29,5;63,1]	45 (33,6%) [25,7;42,2]	
<b>IMC_R (n=236)</b>		65 25,8 (4,1) [24,8;26,8]	37 26,4 (4,4) [24,9;27,9]	134 26,5 (4,8) [25,7;27,4]	0,555
<b>DSA (n=236)</b>	No	60 (92,3%) [83;97,5]	35 (94,6%) [81,8;99,3]	120 (89,6%) [81,3;94,2]	0,696
	Si	5 (7,7%) [2,5;17]	2 (5,4%) [0,7;18,2]	14 (10,4%) [5,8;16,9]	
<b>EdadD (n=231)</b>		64 52,4 (16,9) [48,2;56,6]	36 62,2 (13,3) [57,7;66,8]	131 51,8 (15,7) [49,1;54,5]	<b>&lt;0,001</b>
<b>TipoD (n=236)</b>	Asistolia controlada	16 (24,6%) [14,8;36,9]	9 (24,3%) [11,8;41,2]	31 (23,1%) [16,3;31,2]	0,082
	Asistolia no controlada	1 (1,5%) [0;8,3]	1 (2,7%) [0,1;14,2]	0 (0%) [0;2,7]	
	Muerte encefálica	35 (53,8%) [41;66,3]	26 (70,3%) [53;84,1]	84 (62,7%) [53,9;70,9]	
	Vivo	13 (20%) [11,1;31,8]	1 (2,7%) [0,1;14,2]	19 (14,2%) [8,8;21,3]	
<b>Inducción (n=236)</b>	Basiliximab	33 (50,8%) [38,1;63,4]	14 (37,8%) [22,5;55,2]	75 (56%) [47,1;64,5]	0,062

	Daclizumab	0 (0%) [0;5,5]	0 (0%) [0;9,5]	5 (3,7%) [1,2;8,5]	
	No inducción	3 (4,6%) [1;12,9]	0 (0%) [0;9,5]	5 (3,7%) [1,2;8,5]	
	Timoglobulina	29 (44,6%) [32,3;57,5]	23 (62,2%) [44,8;77,5]	47 (35,1%) [27;43,8]	
	<b>Tiempo isquemia (n=228)</b>	11,7 (7,5) [9,9;13,6]	13,9 (5,3) [12,1;15,7]	13,1 (7,1) [11,9;14,4]	0,276
	<b>Perdida_del_injerto (n=235)</b> No	60 (93,8%) [84,8;98,3]	35 (94,6%) [81,8;99,3]	116 (86,6%) [79,6;91,8]	0,214
	Si	4 (6,2%) [1,7;15,2]	2 (5,4%) [0,7;18,2]	18 (13,4%) [8,2;20,4]	
	<b>TiempoBxmeses (n=223)</b>	13,9 (35,6) [4,9;22,8]	11,6 (36,8) [0,7;23,9]	18 (40,2) [10,8;25,2]	<b>0,038</b>

Tabla 15. Características clínicas con grupos CART con un p valor inferior al 0,7: Edad R, edad receptores; Sexo R, Sexo receptores; IMC, índice de masa corporal; DSA, anticuerpos donante específicos pre trasplante; EdadD, Edad donante; Sexo D, Sexo donante; TipoD, tipo donante (Asistolia controlada/Asistolia no controlada/Muerte encefálica/ Vivo); Inducción, tratamiento de inducción previo al trasplante renal (Basiliximab/Daclizumab/No inducción/Timoglobulina); Tiempo isquemia, tiempo isquemia previo al trasplante; Perdida\_del\_injerto, pérdida de injerto; TiempoBxmeses, tiempo del trasplante renal a la biopsia en meses.

También evaluamos las variables analizadas en la analítica convencional. Teniendo en cuenta las variables que han obtenido un p valor inferior al 0,05 al realizar las comparaciones entre grupos, podemos deducir los siguientes resultados: el grupo 2 ha obtenido un valor medio superior respecto a la variable “prot/creat” (cociente proteína/creatinina) y también respecto a la variable “mau/creat” (cociente albúmina/creatinina). La variable “linfocitos” ha obtenido un valor medio superior en el grupo 2, con un valor medio de 1,7. La variable “monocitos” si nos fijamos en el intervalo de confianza, podemos observar un rango superior en el grupo 2, pero las diferencias son mínimas, a pesar de tener un p valor significativo al realizar las comparaciones entre grupos.

En la Tabla 16 se muestran las variables con un p-valor inferior a 0,1.

Variable	1	1-2	2	p-valor
<b>Prot/Creat</b>	65 722,9 (1229,6) [418,2;1027,6]	36 738,2 (1127,3) [356,8;1119,6]	132 859,6 (1174,2) [657,4;1061,8]	<b>0,042</b>
<b>Mau/Creat</b>	64 319 (728) [137,2;500,8]	33 376,5 (777,5) [100,8;652,2]	126 488,2 (845) [339,3;637,2]	<b>0,022</b>
<b>25vitD0</b>	65 17,3 (9,8) [14,9;19,8]	36 12,8 (5,4) [11;14,6]	131 16,6 (9,2) [15;18,2]	0,056
<b>PCRuso</b>	65 0,4(0,4) 7[9,3;0,5]	37 0,7 (1,4) [0,2;1,1]	132 1,2 (4) [0,5;1,9]	0,073
<b>Leucocitos</b>	65 6,5 (2,5) [5,9;7,1]	37 6,9 (2,9) [5,9;7,9]	134 7,5 (3,2) [7;8]	0,059
<b>Linfocitos</b>	65 1,9 (3,3) [1,1;2,7]	37 1,3 (0,8) [1;1,5]	134 1,7 (0,9) [1,6;1,9]	<b>0,006</b>
<b>Monocitos</b>	65 0,6 (0,7) [0,4;0,8]	37 0,6 (0,3) [0,5;0,7]	134 0,6 (0,2) [0,6;0,7]	<b>0,005</b>

Tabla 16. Características analítica convencional con grupos CART

### 16.2.6 Concordancia entre diagnósticos clínicos y grupos generados

Por último se ha evaluado la concordancia entre los grupos generados mediante PAM o CART (clúster a partir de citocina o árbol), y los diagnósticos clínicos habituales. A continuación se muestran las tablas de frecuencias indicando el número total de casos, los porcentajes por filas y por columnas.

### **16.2.7 Grupos PAM vs diagnósticos histológicos**

En primer lugar se ha comparado los 2 grupos obtenidos con el método PAM versus todo listado de grupos diagnósticos histológicos por separado. Con el test de Chi cuadrado la p obtenida ha sido de 0,277. El grupo 1 incluye a los pacientes con una menor expresión de citocinas, por lo tanto, menos inflamados. En la Tabla 17 podemos observar que en el grupo 1 incluye a 35 pacientes del grupo IFTA (44,9% del total de pacientes de este grupo), 21 pacientes del grupo diagnóstico Normal (41,2% del total de pacientes de este grupo) y 14 pacientes del grupo diagnóstico de "cambios Borderline2 (un 34,1% del total de pacientes de este grupo). Respecto al grupo 2 se puede destacar que incluye a 10 pacientes con diagnóstico de rechazo humoral+rechazo mixto (un 90,9% del total de pacientes de este grupo), así como un 73% del total de pacientes del grupo diagnóstico de rechazo celular. Respecto al grupo Recidiva, el grupo 2 incluye un 71,4% del total de pacientes de este grupo. Es decir, el grupo 2 incluye un mayor porcentaje de los diagnósticos más inflamados. En cambio no se observa una relación entre el grado de inflamación sistémica y los cambios Borderline o la presencia de IFTA.

dat\$DiagBxSuma	1	2	Row Total
Borderline	14	27	41
	0.341	0.659	0.174
	0.163	0.180	
IFTA	35	43	78
	0.449	0.551	0.331
	0.407	0.287	
Nefropatia Bk	1	4	5
	0.200	0.800	0.021
	0.012	0.027	
Normal	21	30	51
	0.412	0.588	0.216
	0.244	0.200	
Pielonefritis	2	5	7
	0.286	0.714	0.030
	0.023	0.033	
Rechazo celular	4	11	15
	0.267	0.733	0.064
	0.047	0.073	
Rechazo Hum+Mixto	1	10	11
	0.091	0.909	0.047
	0.012	0.067	
Recidiva	8	20	28
	0.286	0.714	0.119
	0.093	0.133	
Column Total	86	150	236
	0.364	0.636	

Tabla 17. Comparación grupos PAM versus diagnósticos histológicos

Para poder clarificar la correlación entre los diagnósticos clínicos y los grupos obtenidos con el método PAM, se ha utilizado la clasificación obtenida al agrupar los grupos diagnósticos según su nivel de expresión media de citocinas. El grupo diagnóstico normal y el grupo diagnóstico IFTA se agruparon en la categoría “No Infla”. Los grupos diagnóstico Recidiva, Nefropatía BK y Pielonefritis se agruparon en la categoría “InfecRecidiva”. Los dos grupos diagnósticos de rechazo celular y el grupo de rechazo humoral+mixto se agruparon en la categoría de Rechazo. Con el test de Fisher la p obtenida en estas comparaciones ha sido de 0,059.

Tal y como se puede observar en la Tabla 18, en el grupo 1 se encuentra un 43,4% de pacientes con diagnóstico No infla y un 34,1% de pacientes con diagnóstico Borderline. En el grupo 2 hay incluidos un 80,8% de pacientes con diagnóstico de Rechazo y un 72,5% de pacientes con diagnósticos asociados a la categoría InfecRecidiva. En el diagnóstico Borderline los pacientes se encuentran correlacionados de la siguiente forma: 34,1% de pacientes en el grupo 1 y 65,9% de pacientes en el grupo 2.

dat\$DiagClasBx	1	2	Row Total
Borderline	14	27	41
	0.341	0.659	0.174
	0.163	0.180	
InfecRecidiva	11	29	40
	0.275	0.725	0.169
	0.128	0.193	
No Infla	56	73	129
	0.434	0.566	0.547
	0.651	0.487	
Rechazo	5	21	26
	0.192	0.808	0.110
	0.058	0.140	
Column Total	86	150	236
	0.364	0.636	

Tabla 18. Comparación grupos PAM versus agrupación de diagnósticos histológicos

### 16.2.8 Grupos CART vs diagnósticos clínicos

El mismo análisis se ha realizado con los grupos obtenidos con el método CART. Se ha realizado una primera comparación entre los grupo CART vs todos los diagnósticos histológicos (Tabla 19). Con el test de Chi cuadrado de Pearson la p obtenida ha sido de 0,172.

Respecto al grupo 1, asociado a menos inflamación, encontramos un 33% de pacientes con diagnóstico IFTA respecto al total de este grupo y un 35% de pacientes con diagnóstico Normal. El diagnóstico Borderline incluye un 24% de pacientes y el grupo de Recidiva un 21,4%. Respecto al grupo 1-2, asociado a una inflamación media, encontramos un 19% tanto de pacientes con diagnóstico Borderline como con diagnóstico IFTA. Destaca que únicamente se encuentran asociados a este grupo 2 pacientes con diagnóstico de rechazo celular. Por último, respecto al grupo 2, asociado a una alta inflamación, encontramos un 90% de pacientes con diagnóstico de Rechazo humoral+Mixto y un 66,7% de pacientes con rechazo celular. Además, en este grupo 2 también se encuentra asociado un 64,3% de pacientes con diagnóstico de Recidiva, un 56% de pacientes con diagnóstico Borderline y un 47% de pacientes con diagnóstico IFTA.

dat\$DiagBxSuma	1	1-2	2	Row Total
Borderline	10	8	23	41
	0.244	0.195	0.561	0.174
	0.154	0.216	0.172	
IFTA	26	15	37	78
	0.333	0.192	0.474	0.331
	0.400	0.405	0.276	
Nefropatia Bk	1	0	4	5
	0.200	0.000	0.800	0.021
	0.015	0.000	0.030	
Normal	18	5	28	51
	0.353	0.098	0.549	0.216
	0.277	0.135	0.209	
Pielonefritis	0	3	4	7
	0.000	0.429	0.571	0.030
	0.000	0.081	0.030	
Rechazo celular	3	2	10	15
	0.200	0.133	0.667	0.064
	0.046	0.054	0.075	
Rechazo Hum+Mixto	1	0	10	11
	0.091	0.000	0.909	0.047
	0.015	0.000	0.075	
Recidiva	6	4	18	28
	0.214	0.143	0.643	0.119
	0.092	0.108	0.134	
Column Total	65	37	134	236
	0.275	0.157	0.568	

Tabla 19. Comparación grupos CART versus diagnósticos histológicos

Por último, se ha utilizado la clasificación obtenida al agrupar los diferentes diagnósticos histológicos según su nivel de expresión media de citocinas. Se ha realizado la comparación respecto a los grupos obtenidos con el método CART (Tabla 20). Con el test de Fisher la p obtenida en estas comparaciones ha sido de 0,059.

En el grupo 1 se encuentra un 34,1% de pacientes con diagnóstico No infla y un 24,4% de pacientes con diagnóstico Borderline. En el grupo 1-2, asociado a pacientes con una inflamación media, hay incluidos un 19,5% de pacientes con diagnóstico de Borderline, un 17,5% de pacientes con diagnósticos asociados a la categoría InfecRecidiva. En el grupo 2, asociado a más inflamación, hay un 76,9% de pacientes con diagnóstico del grupo Rechazo, un 65% de pacientes con diagnóstico del grupo InfecRecidiva y un 56,1% de pacientes con diagnóstico Borderline. Pero, a su vez, en el grupo 2

hay asociado un 50,4% de pacientes con diagnóstico No Infla, es decir, pacientes con una baja inflamación.

dat\$DiagClasBx	1	1-2	2	Row Total
Borderline	10	8	23	41
	0.244	0.195	0.561	0.174
	0.154	0.216	0.172	
InfecRecidiva	7	7	26	40
	0.175	0.175	0.650	0.169
	0.108	0.189	0.194	
No Infla	44	20	65	129
	0.341	0.155	0.504	0.547
	0.677	0.541	0.485	
Rechazo	4	2	20	26
	0.154	0.077	0.769	0.110
	0.062	0.054	0.149	
Column Total	65	37	134	236
	0.275	0.157	0.568	

Tabla 20. Comparación grupos PAM versus agrupación de diagnósticos histológicos

Al evaluar estas comparaciones podemos deducir que el grupo 2 obtenido con el método CART incluye un mayor número de pacientes asociados a diagnósticos con inflamación, es decir, Rechazo y InfecRecidiva. Pero también se observa una fuerte asociación que incluye a pacientes con los diagnósticos Borderline e IFTA.



# Discusión



## 17. Expresión de genes de rechazo en biopsias renales

Los estudios llevados a cabo en los últimos años mediante la utilización de microarrays en biopsias del aloinjerto renal con el fin de mejorar la precisión del diagnóstico histológico, han permitido caracterizar los genes asociados a rechazo.

Los primeros estudios caracterizaron genes de rechazo que permitían diferenciar entre biopsias con rechazo y biopsias normales (71,109). Sin embargo existen muchos genes cuya su expresión se observa en rechazo y en otras condiciones inflamatorias como pueden ser glomerulopatías, nefropatía BK, infección por citomegalovirus, etc. Por este motivo el grupo de Edmonton propuso estudiar los genes que están diferencialmente expresados en el rechazo respecto a todos los posibles diagnósticos en biopsias de indicación. El estudio de De Freitas et al en 2012 (110) comparó un grupo de biopsias de rechazo versus un grupo con diferentes diagnósticos. En este estudio obtuvo un listado de genes asociados a rechazo que estaban diferencialmente expresados respecto a otros diferentes diagnósticos.

Posteriormente el mismo grupo caracterizó aquellos genes que permiten diferenciar entre genes de rechazo celular y humoral. En 2013 Reeve J et al publicaron genes asociados a TCMR que no estaban asociado a rechazo humoral y en el mismo año Sellarés et al. publicaron genes asociados a ABMR que no estaban presentes en el rechazo celular (75). Es importante remarcar que en estos estudios se ha visto que existen un conjunto de genes que se expresan tanto en el ABMR como en el TCMR. En 2013 en un estudio multicéntrico en el que participaron llamado Intercom, se confirmó que es posible diferenciar los dos tipos de rechazo a partir del microarray (74).

El sistema de clasificación internacional de BANFF para las biopsias del aloinjerto renal tiene limitaciones. Existe un importante variabilidad entre observadores en la evaluación de las lesiones básicas y, por tanto, de los diagnósticos (111). Además la biopsia renal constituye una muestra del daño renal para evaluar lesiones que tienen una distribución heterogénea. En los últimos años la clasificación de Banff ha sufrido distintas modificaciones con el

fin de adaptarse a los nuevos datos que han ido permitiendo afinar los criterios diagnósticos en las distintas formas de rechazo. Una limitación importante en la clasificación, que sigue siendo motivo de discusión, es comprender el significado de los cambios Borderline (40,112).

Han sido varios autores que han puesto en duda que el diagnóstico de cambios Borderline represente una forma de TCMR (113). Pero el diagnóstico molecular sí que permite diferenciar si hay o no hay expresión génica de rechazo en diagnósticos dudosos como el Borderline o incluso en pacientes con fenotipos incompletos por debajo del umbral que define el diagnóstico de cambios Borderline (84,110).

Por otro lado, la IFTA constituye un diagnóstico que en algunos pacientes se asocia a un deterioro de la función renal y pérdida del injerto. Algunos autores han evaluado si en los pacientes con fibrosis intersticial y atrofia tubular existe una expresión de genes de rechazo ya sean en biopsias de seguimiento o de indicación.

Park et al., en un estudio realizado en biopsias de seguimiento al año con fibrosis con o sin inflamación observaron que existe expresión de genes de rechazo en los pacientes que tienen fibrosis con inflamación en áreas sanas pero también en pacientes con fibrosis sin inflamación, sugiriendo que fenotipos histológicos diferentes del rechazo pueden mostrar la aparición de genes de rechazo. Estos resultados se confirmaron en el estudio de Modena et al que incluían tanto biopsias de causa como de seguimiento. En este estudio se pudo comprobar la presencia de la activación de genes de rechazo en los grupos con diagnóstico IFTA, tanto en el subgrupo con diagnóstico IFTA más inflamación como con el subgrupo de IFTA sin inflamación (86). En un estudio posterior, se observó que la activación de genes de rechazo en pacientes con IFTA se asocia a la pérdida del injerto (114).

Por lo tanto, los estudios de expresión génica en tejido renal permiten identificar genes de rechazo en diagnósticos de pacientes que solo presentan IFTA. Todos estos estudios se han realizado tanto con biopsias de seguimiento como con biopsias de causa, concluyendo que los pacientes con diagnóstico

de Borderline e IFTA se asocian a genes de rechazo en una proporción de pacientes y que estos genes se asocian a la pérdida del injerto.

En nuestro estudio uno de los objetivos era evaluar los genes de rechazo, tanto en biopsias de seguimiento como de causa, en grupos de pacientes con IFTA o cambios Borderline.

En primer lugar, se comparó la expresión génica de cada uno de los grupos de rechazo, celular (TCMR) y rechazo humoral (ABMR), versus el grupo Normal para comprobar si comparten o no genes propios del rechazo. Se observó que comparten una gran cantidad de genes y por ello se decidió agruparlos. Además, también se pudo comprobar que la indicación clínica (seguimiento o causa) es independiente de la expresión diferencial de los genes de rechazo.

Una vez definido el grupo de rechazo, se realizó un análisis de PCA y observamos que los pacientes con rechazo presentan una expresión diferencial de genes respecto a los pacientes con una biopsia normal, IFTA o cambios borderline. Por lo tanto, nosotros evaluamos cuales eran los genes con mayor expresión diferencial entre el diagnóstico de rechazo y las biopsias de seguimiento normales. Una vez caracterizados estos genes estudiamos si existía una expresión de genes de rechazo en los siguientes grupos: cambios borderline en una biopsia tanto de seguimiento como de causa e IFTA con una biopsia tanto de seguimiento como de causa.

En el grupo de IFTA de seguimiento no hay una expresión aumentada de genes de rechazo respecto al grupo de biopsias normales de seguimiento. En los pacientes con un diagnóstico de IFTA en biopsia de seguimiento, la fibrosis no conlleva un proceso activo. Y en este sentido nuestros datos confirman que la fibrosis observada en biopsias de seguimiento, especialmente en biopsias precoces representa la fibrosis presente en el donante. En cambio en la biopsia de causa con el diagnóstico de IFTA sí que existe un incremento de la expresión de genes de rechazo lo que sugiere que algunos de estos pacientes podrían beneficiarse de algún ajuste en la pauta inmunosupresora.

En los pacientes en la biopsia de seguimiento con cambios Borderline, existe un discreto aumento de los genes asociados a rechazo respecto a las biopsias normales. En los pacientes con cambios Borderline por causa existe un aumento muy significativo de la expresión de genes de rechazo versus las biopsias normales de seguimiento. Cuando un paciente presenta deterioro de la función renal y en la biopsia se observa cambios Borderline, este paciente recibe un tratamiento mediante bolus de esteroides y habitualmente responde al tratamiento anti rechazo. Nuestros datos, confirman la necesidad de tratar los cambios borderline en una biopsia de causa.

Existe una discusión de la necesidad de tratar a los pacientes borderline en la biopsia de seguimiento. Seifert ME et al. en un estudio de biopsias de seguimiento realizadas durante los primeros meses en el que los pacientes con rechazo subclínico se trataban con bolus de esteroides y los pacientes con cambios Borderline se trataban según criterio médico, observaron, que los pacientes con cambios Borderline que eran tratados tenían mejor supervivencia de los que no se habían tratado, sugiriendo que estos pacientes se beneficiaban del tratamiento con bolus de esteroides (115). En este sentido, nuestros datos sugieren que una proporción de los pacientes con cambios borderline en la biopsia de seguimiento, presentan expresión génica de rechazo y podrían beneficiarse del tratamiento con bolus de esteroides. Nuestros datos contribuyen a explicar por qué en el estudio de Seifert ME et al. se describe una mejor supervivencia del injerto en los pacientes con cambios Borderline.

En su conjunto nuestros resultados sugieren que la determinación de los genes de rechazo en las biopsias de seguimiento permitiría detectar aquellos pacientes con un grado de activación inmunológica. Nuestros datos no permiten responder a la pregunta de si la adecuación de la inmunosupresión en función de la activación génica permitiría diferenciar entre pacientes que reciben una inmunosupresión adecuada y aquellos que reciben una inmunosupresión insuficiente.

Para confirmar que los genes de rechazo están diferencialmente expresados en nuestros grupos de estudio (IFTA y Borderline en biopsias de

causa y cambios Borderline en biopsias de seguimiento) se realizó el mismo análisis utilizando listado de genes de rechazo previamente descritos en la literatura por otros grupos (106–108). Los resultados obtenidos con estas comparaciones confirman nuestros resultados en cuanto a la expresión génica diferencial de genes de rechazo tanto en los grupos IFTA y cambios Borderline en biopsias por causa y cambios Borderline en biopsias de seguimiento. Aunque únicamente con el grupo de pacientes con diagnóstico de cambios Borderline en biopsia por causa la expresión de los genes de rechazo descritos por Venner et al., Kathri et al. y Wang et al. estaba significativamente aumentada respecto a los controles, sí que existía un aumento numérico de la expresión de genes de rechazo en los pacientes con IFTA y en los pacientes con cambios Borderline en la biopsia de seguimiento (106–108).

## **18. Expresión de genes de rechazo en sangre periférica**

Se ha estudiado el uso de perfiles de expresión de genes de rechazo en células mononucleares periféricas como una herramienta diagnóstica no cruenta para la detección temprana del rechazo (116). La ventaja teórica del estudio de los genes de rechazo en sangre periférica es que teóricamente podría obviar la realización de la biopsia renal en una proporción de pacientes.

Los primeros estudios se centraron en la utilización de perfiles de expresión génica para discriminar entre rechazo y no rechazo (117) y también para monitorizar a los injertos estables y proporcionar una detección temprana de los injertos con rechazo subclínico o incluso poder predecir qué pacientes pueden desarrollar rechazo con cierta antelación (59).

En 2012 Li L et al. realizaron un estudio con 236 pacientes trasplantados renales, tanto pediátricos como adultos. Se realizaron 367 biopsias y se obtuvo una muestra de sangre periférica en el momento de la biopsia. Las biopsias se clasificaron según los criterios de Banff 2011. Como cohorte exploratoria utilizaron 122 biopsias. Se identificaron un total de 32 genes que estaban diferencialmente expresados en los pacientes con diagnóstico de rechazo. Posteriormente, en una cohorte de validación, confirmaron la expresión diferencial de 5 de estos 32 genes en los pacientes con diagnóstico de rechazo

(117). Además, de los 236 pacientes 99 participaron en el ensayo multicéntrico randomizado SNS01 como cohorte de validación externa independiente. Con esta cohorte confirmaron una alta sensibilidad (91%) y especificidad (94%) en la detección de RA con el set de 5 genes descritos anteriormente (118).

El mismo grupo realizó el estudio multicéntrico AART en el que validaron un set de 17 genes (kSORT) para la detección de rechazo agudo en sangre en pacientes trasplantados renales (62). En este estudio participaron 8 centros, las muestras transversales se dividieron en 3 cohortes diferentes para la validación del estudio y las muestras longitudinales del estudio multicéntrico se utilizaron como una única cohorte para la predicción con el modelo kSORT. Para realizar un primer screening de genes de rechazo agudo en las muestras obtenidas de este estudio, seleccionaron 43 genes de rechazo agudo previamente descritos en la literatura: 10 de estos genes los describieron Sarwal et al. en 2012 en el estudio SNS01, 14 genes fueron descritos en el estudio de Li L et al (117), añadieron 7 genes asociados al tráfico de monocitos, células NK, linfocitos T, células dendríticas y endoteliales. Además, incluyeron 11 genes para obtener una mayor precisión en la detección de rechazo agudo que ya habían sido también descritos previamente en la literatura (107,109). Finalmente validaron 17 genes para la detección del rechazo agudo que incluyen los genes descritos por el estudio de Li L et al. y 7 genes que añadieron de su propio estudio al comprobar que mejoraban la precisión de diferenciar entre muestras con o sin rechazo.

Estos listados de genes tenían el inconveniente de únicamente discriminar entre genes de rechazo y no rechazo. Además, en varios estudios dónde se publicaban listado de genes de rechazo no llegaron a ser validados de forma externa en otras cohortes (63). Por ello, en los años siguientes surgieron estudios con el objetivo de estandarizar la recogida de muestras pareadas tanto de tejido en la biopsia renal, como de sangre periférica, para poder realizar en todos ellos la validación externa de sus listados de genes (66,119).

Friedwald et al con el estudio multicéntrico CTOT-08 de 2018 se centraron en el desarrollo y validación de un biomarcador molecular, utilizando sangre

periférica pareada con biopsias de seguimiento, para la detección de rechazo agudo subclínico en pacientes con función renal estable. Para validar el biomarcador molecular utilizaron una cohorte de validación externa, confirmando los resultados obtenidos en su estudio: el uso de su biomarcador obtenido en sangre periférica reduce la necesidad de realizar biopsias de seguimiento al poder monitorizar al paciente y controlar la función del aloinjerto renal (119). Por otro lado, en 2019 Zhang et al. identificaron un set de 17 genes que permitía estratificar en alto, intermedio y bajo el riesgo de padecer un rechazo subclínico agudo, así como, la futura pérdida del injerto. En este estudio validaron este set de genes con muestras que procedían de la cohorte del estudio prospectivo GoCar que realizaron biopsias renales a los pacientes durante 2 años de seguimiento (66).

Estos listados de genes ofrecen la posibilidad de ser utilizados como una herramienta para monitorizar los injertos renales de forma no invasiva y controlar la inflamación subclínica y, de esta manera, prolongar la supervivencia del injerto.

En nuestro estudio, utilizando sangre periférica, el objetivo era evaluar la expresión diferencial de genes de rechazo en grupos de pacientes con diagnóstico de IFTA o con diagnóstico de cambios Borderline, tanto en biopsias de seguimiento como de indicación.

En primer lugar se realizó un análisis de PCA para poder observar cómo están distribuidos los diferentes grupos diagnósticos según su expresión génica. En el primer análisis de PCA se comprobó que los pacientes están distribuidos de forma aleatoria, independientemente del grupo diagnóstico al que pertenecen (biopsia normal, rechazo, cambios borderline e IFTA). Lo mismo se pudo observar al realizar otro análisis de PCA separando los grupos diagnósticos dependiendo de si la biopsia era de seguimiento o causa. Estos resultados parecían indicar que la señal de inflamación que había en el tejido renal no se observaba de la misma manera en sangre periférica, sugiriendo que otros factores, a parte de la inflamación en el tejido, diluyeran la señal de inflamación en sangre periférica.

Una vez realizados los PCA, se evaluaron los genes con mayor expresión diferencial entre el diagnóstico de rechazo y las biopsias de seguimiento normales.

Para poder caracterizar los genes diferencialmente expresados asociados a rechazo se realizó una comparativa entre los grupos con diagnóstico normal versus el grupo de rechazo. Una vez caracterizados los genes estudiamos si existía una expresión de genes de rechazo en los siguientes grupos: cambios borderline en una biopsia tanto de seguimiento como de causa e IFTA con una biopsia tanto de seguimiento como de causa.

En los resultados obtenidos se pudo comprobar que el grupo de pacientes con diagnóstico Normal tenía una expresión de genes de rechazo menor que el resto de grupos, siendo la diferencia significativa en todos ellos. A diferencia de la expresión de genes de rechazo en tejido, en sangre periférica el grupo de pacientes con diagnóstico IFTA en biopsias de seguimiento sí que tiene una expresión de genes diferencial respecto al grupo Normal. Respecto el grupo de pacientes con diagnóstico de rechazo versus al resto de grupos, las comparaciones eran significativas en los grupos de seguimiento, tanto IFTA como cambios Borderline, pero en los grupos por causa no. Estos resultados confirmaron lo observado anteriormente en los análisis por PCA: la expresión génica de genes de rechazo en los diferentes grupos diagnóstico es mucho menor que en tejido y encontrar diferencias entre grupos mucho más complicado, en especial en las biopsias por causa.

Además, se realizó el mismo análisis utilizando listado de genes de rechazo previamente descritos en la literatura por otros grupos (66,67,119). Las comparaciones entre grupos en cuanto a la expresión diferencial de genes de rechazo no son significativas en ninguno de los 3 listados. Cabe destacar, en primer lugar, que de cada uno de los listados de genes de estos autores ninguno coincidía con nuestro top de 112 genes.

Para caracterizar los genes diferencialmente expresados asociados a rechazo se realizó una comparativa entre el grupo diagnóstico Normal versus el grupo diagnóstico de Rechazo. De la lista total de 6332 genes con un  $p < 0,1$  y

un  $\log_{2}FC < 0.3$  se seleccionaron 112 genes con la máxima expresión diferencial entre rechazo y controles normales. Estos 112 genes se ordenaron de mayor a menor diferencia, el primero con el menor p valor y mayor FC y el último con el p valor más cercano a 0,1 y menor FC. Si se compara con el listado de genes obtenidos en tejido, en el que se seleccionaron 119 genes con un p valor menor a 0,01 y un  $\log_{2}FC$  mayor de 1,75 se puede apreciar que la expresión diferencial de genes de rechazo en sangre periférica es mucho menor que en tejido. Es decir, del primer gen del listado con un p valor menor y un mayor  $\log_{2}FC$  al último gen con el p valor más cercano a 0,1 y un  $\log_{2}FC$  menor, la diferencia era mínima. Además, al comparar nuestra lista de 112 genes con los listados de genes descritos por el grupo de Sarwal et al y Zhang et al. pudimos apreciar que no coincide ninguno de los genes. Este resultado nos es sorprendente ya que la expresión diferencial entre rechazo y biopsia de seguimiento normal es mínima en nuestro estudio y en los estudios de Sarwal et al. y Zhang et al.

En la actualidad el uso de biomarcadores moleculares utilizando la expresión de genes en sangre periférica es una herramienta diagnóstica que no se ha introducido en la práctica clínica, ni está aceptada como una herramienta diagnóstica en las guías de práctica clínica. Existe disparidad en los listados de genes diferencialmente expresados en el rechazo entre distintos estudios y es necesaria más información para comprender que factores, a parte de la inflamación tisular, modulan los genes pro-inflamatorios en sangre periférica. Hoy en día se están evaluando otras estrategias para detectar la presencia de rechazo u otras patologías en sangre periférica como puede ser la determinación de DNA libre. Las diferencias en la expresión diferencial de genes de rechazo entre el grupo normal y el grupo de rechazo son mucho menores que en tejido y únicamente se observan una expresión diferencial de genes de rechazo en los grupos con biopsias de seguimiento. Con estos resultados se puede deducir que la señal de inflamación en sangre periférica se encuentra posiblemente más diluida por factores que pueden dispersar o enmascarar esta señal, como puede ser la diabetes, hipertensión arterial, arterioesclerosis o infecciones.

## **19. Caracterización de la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica**

Los pacientes trasplantados renales presentan una inflamación sistémica mayor que la población sana. Esto es debido a que previamente han presentado un periodo con insuficiencia renal, así como, por la activación del sistema inmune desencadenada por el propio aloinjerto. Además, se ha descrito que un paciente trasplantado renal está más inflamado que un paciente con IRC no portador de un trasplante renal, para un mismo grado de insuficiencia renal (120).

Vereyken et al. estudiaron las características de los macrófagos circulantes y los monocitos a diferentes tiempos del post-trasplante renal y los compararon con pacientes sanos. En la población sana encontraron que el 80% de los monocitos son CD14+CD16-. Por el contrario, en el post trasplante inmediato, los pacientes presentaban un mayor número de CD16+, asociado a monocitos capaces de secretar mediadores proinflamatorios. Además, en este grupo de pacientes, también encontraron un aumento de los niveles de IL-1beta, IFN-gamma y TNF-alpha. En el grupo de pacientes que midieron los niveles de monocitos y macrófagos circulantes a los 3 y 6 meses del trasplante, también encontraron niveles de CD16+ elevados, presentado una tendencia a la normalización con el paso del tiempo asociada a la mejoría de la función renal y al fuerte tratamiento inmunosupresor. El porcentaje de monocitos CD14+CD16- en pacientes sanos fue del 82.4% y en pacientes trasplantados renales fue del 76.7% (121).

Además, han sido varios los estudios que han relacionado en la población portadora de un injerto renal, un incremento de la inflamación sistémica medida con los niveles séricos de IL-6, PCR, IL-2 (92,101,102) y se ha relacionado con un mayor riesgo de evento cardiovascular y mortalidad (90).

En nuestro estudio, la inflamación sistémica ha sido estudiada en los grupos diagnósticos agrupados (No infla, Borderline, Rechazo, InfecRec) con la medida de la proteína C reactiva y un panel de 20 citocinas. El grupo de Rechazo y el grupo de InfecRec obtuvieron los niveles más altos de PCR, así como de la expresión media de todas las citocinas, respecto al grupo No infla y

Borderline. Con estos resultados confirmamos que los grupos que a priori deberían presentar una mayor inflamación por su diagnóstico histológico, tenían una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias en suero.

Posteriormente quisimos obtener perfiles de pacientes a partir de la expresión de las citocinas, sin tener en cuenta su diagnóstico histológico. En primer lugar se procedió a la transformación logarítmica y escalado de variables para cada una de las citocinas, al comprobar que no se comportaban como variables normales. Seguidamente, con el objetivo de reducir la dimensión del conjunto de datos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Con este PCA se pudo observar que la primera dimensión explicaba un 52% de la variabilidad total y la 2 dimensión un 9,7%, llegando al 90% de la variabilidad total con el sumatorio de las 10 primeras dimensiones. Al comprobar la contribución de las citocinas en cada una de las dimensiones se pudo ver que la mayoría de las citocinas están correlacionadas positivamente con la primera dimensión. Una vez se ha reducido la dimensión de los datos, se realizó un análisis por clústers con el método PAM (partición alrededor de medoides), con el objetivo de obtener perfiles de pacientes. Con el método PAM se obtuvo que el número óptimo de grupos para agrupar a nuestros pacientes es de 2.

A partir de toda esta información, se realizó un proceso de construcción de un árbol de clasificación (CART). El objetivo del árbol de clasificación es clasificar a los pacientes a partir del menor número de citocinas posibles en los dos grupos previamente generados con el método PAM. El método CART se utilizó al observar una gran colinealidad entre las citocinas.

El análisis CART escogió a tres citocinas proinflamatorias como son MIP-1alpha, IL-13 e IL-4 que mejor permiten clasificar a nuestros pacientes en los dos grupos previamente generados. Con estas tres citocinas se clasificaron a los pacientes en 4 grupos: el primer grupo con una baja inflamación, el segundo y el tercero con una inflamación media y el cuarto con una inflamación alta. Al evaluar el poder estadística de este método de clasificación se comprobó que tiene una precisión del 91%, una sensibilidad del 88% y una especificidad del 93%.

Posteriormente se caracterizó los grupos obtenidos con el método CART con las variables clínicas. Para ello el segundo y tercer grupo que tenían una inflamación media se decidió agruparlos, al representar ambos grupos a pacientes con un mismo umbral de inflamación. El grupo 2, que está asociado a una mayor inflamación, obtuvo un mayor porcentaje de DSA en sus pacientes (10,4%) y un mayor porcentaje en pérdida del injerto con un 13,4%, a pesar de no obtener un p valor con significancia estadística en ambas variables. Respecto a las variables analizadas en la analítica convencional, se siguió la tendencia marcada por las variables clínicas, al observarse valores superiores en el grupo 2 tanto en el ratio proteinuria/creatinina, albumina/creatinina, en la proteína C reactiva, así como, en linfocitos, leucocitos y monocitos.

Por último, se evaluó la concordancia de los grupos obtenidos con el método PAM y CART con los diagnósticos clínicos. Respecto a los grupos PAM, el grupo 2 asociado a una mayor inflamación, incluye un mayor número de pacientes asociados a los diagnósticos de Rechazo (tanto celular como humoral+mixto) y a los diagnósticos de Recidiva, Pielonefritis y Nefropatía BK. Con los diagnósticos agrupados se puede observar esta asociación de forma más evidente: el grupo de Rechazo incluye un 80,8% de pacientes en el grupo 2 y el grupo InfecRecidiva un 72,5% de pacientes. Respecto a los 3 grupos obtenidos con el método CART se observó con el grupo 2, asociado a una mayor inflamación, incluye un mayor % de pacientes asociados a los diagnósticos de Rechazo (tanto celular como humoral+mixto) y a los diagnósticos de Recidiva, Pielonefritis y Nefropatía BK. En cuanto a los diagnósticos Borderline e IFTA se puede observar que los pacientes están incluidos en los 3 grupos, deduciendo que estos diagnósticos tienen un patrón de inflamación muy diferente y con esta nueva clasificación permite reclasificar a los pacientes de una forma más eficiente. El mismo patrón de clasificación en los 3 grupos obtenidos con el método CART se puede apreciar con la agrupación de los diagnósticos.

Por ello, se puede concluir que clasificar a los pacientes por su patrón de inflamación sistémica a partir de únicamente 3 citocinas es una herramienta útil para reclasificar a los pacientes, en especial, a aquellos pacientes con diagnóstico clínico dudoso como puede ser el de cambios Borderline o IFTA.

Pero este estudio tiene limitaciones. Se trata de un estudio exploratorio con un tamaño muestral relativamente pequeño. Además, será necesaria la confirmación de este resultado en una cohorte de validación independiente.

Por otro lado, se ha descrito que los pacientes portadores de un injerto renal presentan una mayor inflamación sistémica. Esta inflamación medida mediante diferentes proteínas en suero (PCR, IL-6...) se asocian a un aumento de la mortalidad fundamentalmente cardiovascular a largo plazo y a un deterioro de la función renal, tanto en la población general, como en la trasplantada renal. En este sentido, el estudio de la expresión génica en sangre periférica pudiera ser útil para comprender mejor cuál es la relación entre distintas vías inflamatorias y la enfermedad cardiovascular. En este sentido, aunque no es motivo de la presente tesis, en todos los pacientes incluidos en este estudio se les han realizado pruebas para medir el riesgo cardiovascular. Las pruebas realizadas a los pacientes han sido las siguientes: una ecografía de ambas carótidas para cuantificar el número de placas de ateroma, se ha determinado la velocidad de la onda de pulso (VOP) mediante tonometría de pulso, la vasodilatación de la arteria humeral tras 5 minutos de isquemia, medición del índice tobillo-brazo y monitorización ambulatoria de la presión arterial de 24h (MAPA). Con la medida del riesgo cardiovascular mediante estas pruebas el objetivo final es caracterizar la contribución de la inflamación del injerto a la inflamación sistémica y disfunción/activación endotelial. Los resultados de estas pruebas se presentaran a posteriori de la presente tesis.



# **Conclusiones**



- En nuestro estudio confirmamos que existe un conjunto de genes que está sobre expresado en los pacientes con rechazo ya sea celular o humoral.
- En los pacientes que no presentan rechazo en la biopsia, es decir, pacientes con cambios Borderline o pacientes con IFTA, existe un aumento de la expresión de genes de rechazo respecto a las biopsias de seguimiento normales, aunque la intensidad en la expresión de dichos genes es inferior a los pacientes que presentan rechazo. La expresión de genes de rechazo es superior en los pacientes de cambios Borderline e IFTA en biopsias por causa en comparación con las biopsias de seguimiento. Los genes de rechazo se expresan con intensidad variable en pacientes con cambios Borderline e IFTA. Estos datos sugieren que la determinación de genes de rechazo podría servir para adecuar la inmunosupresión en pacientes con un diagnóstico histológico de no rechazo.
- La expresión diferencial de genes de rechazo en sangre periférica es menor que en tejido. A pesar de que en la cohorte exploratoria hemos encontrado una diferencia significativa entre biopsias de rechazo y biopsias normales, no lo hemos podido comprobar en la cohorte de confirmación. Estos datos sugieren que la expresión génica en sangre periférica es una herramienta poco sensible para detectar el rechazo.
- En los pacientes con diagnóstico de rechazo existe un aumento de la inflamación sistémica ya sea evaluada con un panel de 20 citocinas o con la proteína C reactiva. Estos datos sugieren que la inflamación tisular contribuye a la inflamación sistémica, que constituye un factor de riesgo cardiovascular. Sin embargo, en los pacientes con glomerulonefritis, pielonefritis o nefropatía BK también existe un aumento de la inflamación sistémica. Estos datos sugieren que la caracterización de la inflamación sistémica no permite diferenciar el rechazo de otras causas de inflamación tisular.
- La información proporcionada por las 20 citocinas estudiadas puede obtenerse mediante la determinación de únicamente 3 citocinas.
- En su conjunto nuestros datos confirman que existe una relación entre la inflamación tisular y la inflamación sistémica.



# **Líneas de investigación de futuro**



- Estudio de la relación entre la expresión génica en biopsias de causa o de seguimiento en pacientes con no presentan rechazo y la exposición al tratamiento inmunosupresor (niveles tacrolimus y/o dosis de mofetil micofenolato).
- Estudio de la inflamación sistémica y sus efectos con el riesgo cardiovascular (ecografía de ambas carótidas para cuantificar el número de placas de ateroma, determinación de la velocidad de la onda de pulso mediante tonometría de pulso, medición de la vasodilatación de la arteria humeral tras 5 minutos de isquemia, medición del índice tobillo-brazo y monitorización ambulatoria de la presión arterial de 24h).
- Evaluar si la adecuación de la inmunosupresión a la expresión de genes de rechazo permite disminuir el grado de inflamación de la biopsia.



# **Bibliografía**



1. Latarjet M. Anatomía humana. 4th ed. Madrid; 2005.
2. Lippert H. Anatomía: estructura y morfología del cuerpo humano. 4th ed. Madrid; 2003.
3. Netter FH. Medicina interna. 1st ed. Barcelona; 2003.
4. Hernando L. Nefrología clínica. 3rd ed. Madrid; 2008.
5. Liaño, F. & Pascual J. Fracaso renal agudo: concepto y epidemiología. Editorial Médica Panamericana, S.A.,; 2003. 637–639 p.
6. Praga M. Causas de insuficiencia renal crónica y sus mecanismos de progresión. Editorial Médica Panamericana, S.A; 2003. 697–706 p.
7. Hernando L. Procedimiento diagnóstico en el enfermo con insuficiencia renal crónica. 2003. 693–695 p.
8. Van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int.* 2011 Jun;79(12):1341–52.
9. Villa G, Rodríguez-Carmona A, Fernández-Ortiz L, Cuervo J, Rebollo P, Otero A, et al. Cost analysis of the Spanish renal replacement therapy programme. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(11):3709–14.
10. Shurraw S, Zimmerman D. Vascular access complications in daily dialysis: a systematic review of the literature. *Minerva Urol Nefrol.* 2005 Sep;57(3):151–63.
11. Taylor SM, Eaves GL, Weatherford DA, McAlhany JC, Russell HE, Langan EM. Results and complications of arteriovenous access dialysis grafts in the lower extremity: a five year review. *Am Surg.* 1996 Mar;62(3):188–91.
12. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al.

- 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 Dec 2;341(23):1725–30.
13. Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation.* 2007 Jul 27;84(2):137–43.
  14. Kälble T, Alcaraz A, Budde K, Humke U, Karam G, Lucan M, et al. Guía clínica sobre el trasplante renal. 2010.
  15. Hamilton DN, Reid WA. Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft. *Surg Gynecol Obstet.* 1984;159(3):289–94.
  16. Guild W.R, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1955;67:167–73.
  17. Gil-Vernet JM, Caralps A. Human Renal Homotransplantation. *New Surgical Technique. Urol Int.* 1968;23(3):201–23.
  18. Kirk AD. Induction immunosuppression. *Transplantation.* 2006 Sep 15;82(5):593–602.
  19. Boillot O, Mayer DA, Boudjema K, Salizzoni M, Gridelli B, Filipponi F, et al. Corticosteroid-free immunosuppression with tacrolimus following induction with daclizumab: A large randomized clinical study. *Liver Transplant.* 2005 Jan;11(1):61–7.
  20. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL, et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant.* 2016;16(7):2117–38.
  21. Chen Y, Chu SH, Wei TY, Yen TH, Chiang YJ, Wu CT, et al. Does mycophenolate mofetil increase the incidence of infections in stable renal transplant recipients initially treated with a two-drug regimen? In:

- Transplantation Proceedings. 2004. p. 2122–3.
22. Morales JM, Campistol JM, Kreis H, Mourad G, Eris J, Schena FP, et al. Sirolimus-based therapy with or without cyclosporine: Long-term follow-up in renal transplant patients. In: Transplantation Proceedings. Elsevier USA; 2005. p. 693–6.
  23. Axelrod DA, Naik AS, Schnitzler MA, Segev DL, Dharnidharka VR, Brennan DC, et al. National Variation in Use of Immunosuppression for Kidney Transplantation: A Call for Evidence-Based Regimen Selection. *Am J Transplant*. 2016 Aug 1;16(8):2453–62.
  24. Canafax DM, Torres A, Fryd DS, Heil JE, Strand MH, Ascher NL, et al. The effects of delayed function on recipients of cadaver renal allografts. A study of 158 patients randomized to cyclosporine or ALG-azathioprine. *Transplantation*. 1986 Feb;41(2):177–81.
  25. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003 Dec 11;349(24):2326–33.
  26. Tippner C, Nashan B, Hoshino K, Schmidt-Sandte E, Akimaru K, Böker KH, et al. Clinical and subclinical acute rejection early after liver transplantation: contributing factors and relevance for the long-term course. *Transplantation*. 2001 Sep 27;72(6):1122–8.
  27. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim Y-S, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1354–60.
  28. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78(2):242–9.
  29. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG, Cavaillé-Coll MW, Haller H, Halloran PF, et al. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient

- management and pathogenesis. *Am J Transplant*. 2007 Mar;7(3):512–7.
30. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):310–6.
  31. Isoniemi H, Taskinen E, Häyry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation*. 1994 Dec 15;58(11):1195–8.
  32. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant*. 1995 Apr;9(2):79–84.
  33. Chapman JR. Do protocol transplant biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 Nov;21(6):580–6.
  34. Solez K, Axelsen R a, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen a H, Colvin RB, et al. Working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411–22.
  35. 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.
  36. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant*. 2017;17(1):28–41.
  37. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: New diagnostic insights and standards. *Am J Transplant*. 2004;4(10):1562–6.
  38. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. In: *American Journal of Transplantation*. 2008. p. 753–60.
  39. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff

- 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. In: *American Journal of Transplantation*. Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 272–83.
40. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018;18(2):293–307.
  41. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, Cheung E, Allen RD, O'Connell PJ, et al. Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation*. 2001 Feb 27;71(4):515–23.
  42. Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation*. 1999 May 15;67(9):1222–30.
  43. Rush D, Jeffery J, Trpkov K, Solez K, Gough J. Effect of subclinical rejection on renal allograft histology and function at 6 months. *Transpl Proc*. 1996;28(1):494–5.
  44. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(4):1046–52.
  45. Moreso F, Serón D, Carrera M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Hueso M, et al. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsies. *Transplantation*. 2004 Oct 15;78(7):1064–8.
  46. Serón D, Fulladosa X, Moreso F. Risk factors associated with the deterioration of renal function after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2005 Dec;68(SUPPL. 99).
  47. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am*

- J Transplant. 2009 Nov;9(11):2561–70.
48. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969 Apr 3;280(14):735–9.
  49. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Vol. 11, *Nature Reviews Immunology*. 2011. p. 823–36.
  50. Buelow R, Mercier I, Glanville L, Regan J, Ellingson L, Janda G, et al. Detection of panel-reactive anti-HLA class I antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay or lymphocytotoxicity. Results of a blinded, controlled multicenter study. *Hum Immunol*. 1995 Sep;44(1):1–11.
  51. Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients - triumphs and challenges of the solid phase bead assay. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2016.
  52. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KMK, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am J Transplant*. 2015 Sep 1;15(9):2421–30.
  53. Visentin J, Vigata M, Daburon S, Contin-Bordes C, Fremeaux-Bacchi V, Dromer C, et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation*. 2014 Sep 27;98(6):625–31.
  54. Kamburova EG, Wisse BW, Joosten I, Allebes WA, Van Der Meer A, Hilbrands LB, et al. Pretransplant C3D-fixing donor-specific anti-HLA antibodies are not associated with increased risk for kidney graft failure. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Sep 1;29(9):2279–85.
  55. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in human leukocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int*. 2017 Apr 1;30(4):347–59.

56. Molina J, Navas A, Agüera ML, Rodelo-Haad C, Alonso C, Rodríguez-Benot A, et al. Impact of preformed donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody C1q-binding ability on kidney allograft outcome. *Front Immunol.* 2017 Oct 31;8:1310.
57. Krenzien F, ElKhal A, Quante M, Biefer HRC, Hirofumi U, Gabardi S, et al. A rationale for age-adapted immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation.* 2015;99(11):2258–68.
58. Abadja F, Atemkeng S, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C. Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response. *Transplantation.* 2011;92(4):396–403.
59. Kurian SM, Williams AN, Gelbart T, Campbell D, Mondala TS, Head SR, et al. Molecular classifiers for acute kidney transplant rejection in peripheral blood by whole genome gene expression profiling. *Am J Transplant.* 2014;14(5):1164–72.
60. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant.* 2013 Oct;13(10):2634–44.
61. Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, Aulagnon F, Benon A, Sauvaget V, et al. Urinary C-X-C motif chemokine 10 independently improves the noninvasive diagnosis of antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov 1;26(11):2840–51.
62. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med.* 2014 Nov;11(11):e1001759.
63. Crespo E, Roedder S, Sigdel T, Hsieh SC, Luque S, Cruzado JM, et al. Molecular & functional noninvasive immune monitoring in the ESCAPE study for prediction of subclinical renal allograft rejection. *Transplantation.* 2017;101(6):1400–9.

64. Kurian SM, Velazquez E, Thompson R, Whisenant T, Rose S, Riley N, et al. Orthogonal Comparison of Molecular Signatures of Kidney Transplants With Subclinical and Clinical Acute Rejection: Equivalent Performance Is Agnostic to Both Technology and Platform. *Am J Transplant*. 2017 Aug;17(8):2103–16.
65. O'Connell PJ, Zhang W, Menon MC, Yi Z, Schröppel B, Gallon L, et al. Biopsy transcriptome expression profiling to identify kidney transplants at risk of chronic injury: a multicentre, prospective study. *Lancet*. 2016 Sep 3;388(10048):983–93.
66. Zhang W, Yi Z, Keung KL, Shang H, Wei C, Cravedi P, et al. A Peripheral Blood Gene Expression Signature to Diagnose Subclinical Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Aug;30(8):1481–94.
67. Van Loon E, Gazut S, Yazdani S, Lerut E, de Loor H, Coemans M, et al. Development and validation of a peripheral blood mRNA assay for the assessment of antibody-mediated kidney allograft rejection: A multicentre, prospective study. *EBioMedicine*. 2019 Aug;46:463–72.
68. Mas VR, Mueller TF, Archer KJ, Maluf DG. Identifying biomarkers as diagnostic tools in kidney transplantation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(2):183–96.
69. Fehr T, Cohen CD. Predicting an allograft's fate. *Kidney Int*. 2011 Dec;80(12):1254–5.
70. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant*. 2004 Sep;4(9):1475–89.
71. Mueller TF, Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Jhangri GS, et al. Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2712–22.

72. Reeve J, Einecke G, Mengel M, Sis B, Kayser N, Kaplan B, et al. Diagnosing rejection in renal transplants: A comparison of molecular- and histopathology-based approaches. *Am J Transplant.* 2009 Aug;9(8):1802–10.
73. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, Mengel M, et al. The molecular phenotype of kidney transplants. *Am J Transplant.* 2010 Oct;10(10):2215–22.
74. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant.* 2013 Nov;13(11):2865–74.
75. Reeve J, Sellarés J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant.* 2013;13(3):645–55.
76. Sellarés J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant.* 2013;13(4):971–83.
77. Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Hidalgo L, Famulski KS, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1862–72.
78. Famulski KS, Reeve J, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Halloran PF. Kidney transplants with progressing chronic diseases express high levels of acute kidney injury transcripts. *Am J Transplant.* 2013 Mar;13(3):634–44.
79. Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *J Am Soc Nephrol.* 2012 May;23(5):948–58.
80. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, Chang J, Halloran PF. Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight.*

2016 Jan 21;1(1).

81. Halloran PF, Merino Lopez M, Barreto Pereira A. Identifying Subphenotypes of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 2016 Mar 1;16(3):908–20.
82. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. Vol. 12, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 534–48.
83. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, Aubert O, Bohmig GA, Brennan D, et al. Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *Am J Transplant*. 2017 Nov 1;17(11):2851–62.
84. Nankivell BJ, Agrawal N, Sharma A, Taverniti A, P'Ng CH, Shingde M, et al. The clinical and pathological significance of borderline T cell-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2019 May 1;19(5):1452–63.
85. Park WD, Griffin MD, Cornell LD, Cosio FG, Stegall MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;21(11):1987–97.
86. Modena BD, Kurian SM, Gaber LW, Waalen J, Su AI, Gelbart T, et al. Gene Expression in Biopsies of Acute Rejection and Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy Reveals Highly Shared Mechanisms That Correlate With Worse Long-Term Outcomes. *Am J Transplant*. 2016;16(7):1982–98.
87. Lo DJ, Kaplan B, Kirk AD. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Apr;10(4):215–25.
88. Harada KM, Mandia-Sampaio EL, de Sandes-Freitas T V, Felipe CR, Park SI, Pinheiro-Machado PG, et al. Risk factors associated with graft loss and patient survival after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2009 Nov;41(9):3667–70.

89. Xue D, He X, Zhou C, Xu X, Xu R, Xu N. Correlation between CD14+CD16++ monocytes in peripheral blood and hypertriglyceridemia after allograft renal transplantation. *Transplant Proc.* 2013 Nov;45(9):3279–83.
90. Abedini S, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellström B, Jardine A, et al. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Jul;4(7):1246–54.
91. Dahle DO, Mjøen G, Oqvist B, Scharnagl H, Weihrauch G, Grammer T, et al. Inflammation-associated graft loss in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Nov;26(11):3756–61.
92. García-Carro C, Dörje C, Åsberg A, Midtvedt K, Scott H, Reinholt FP, et al. Kidney allograft subclinical rejection modulates systemic inflammation measured by C-reactive protein at 1 year after transplantation. *Clin Transplant.* 2018;32(3):e13196.
93. Preston GA, Barrett C V., Alcorta DA, Hogan SL, Dinwiddie L, Jennette JC, et al. Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-3 levels in dialysis patients vary independently of CRP and IL-6 levels. *Nephron.* 2002;92(4):817–23.
94. Mortazavi H, Soltani- Zangbar MS, Eghbal- Fard S, Mehdizadeh A, Kamrani A, Chakeri- Khiavi F, et al. Cytokine profile, Treg/Th17 cell frequency changes during different posttransplantational time points in patients undergoing renal transplantation. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20935–43.
95. De Serres SA, Vadivel N, Mfarrej BG, Grafals M, DeJoseph M, Dyer C, et al. Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. *Transplantation.* 2011;91(5):552–9.
96. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, González-Espinoza L, González-Tableros N, Martín-del-Campo F, Correa-Rotter R, et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation.

- Transplantation. 2005 Jul 15;80(1):47–51.
97. Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, et al. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation*. 2011;91(2):191–8.
  98. Eghbal-Fard S, Yousefi M, Heydarlou H, Ahmadi M, Taghavi S, Movasaghpour A, et al. The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia. *J Cell Physiol*. 2019 Apr;234(4):5106–16.
  99. Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2331–6.
  100. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012 Feb;17(1):8–14.
  101. Karahan HI, Soyöz M, Pehlivan M, Tatar E, Uslu A, Çerçi Gürbüz B, et al. Assessment of Interleukin 2 Cytokine Expression Levels After Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2019 May;51(4):1074–7.
  102. Omrani H, Jasemi SV, Sadeghi M, Golmohamadi S. Evaluation of Serum Interleukin-6 Levels in the Renal Transplant Recipients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Open access Maced J Med Sci*. 2019 Jan 15;7(1):174–8.
  103. Benjamini, Yoav ; Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 1995.pdf. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;57(1):289–300.
  104. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545–50.

105. Haas M. The relationship between pathologic lesions of active and chronic antibody-mediated rejection in renal allografts. *Am J Transplant.* 2018;18(12):2849–56.
106. Venner JM, Famulski KS, Badr D, Hidalgo LG, Chang J, Halloran PF. Molecular landscape of T cell-mediated rejection in human kidney transplants: Prominence of CTLA4 and PD ligands. *Am J Transplant.* 2014 Nov 1;14(11):2565–76.
107. Khatri P, Roedder S, Kimura N, De Vusser K, Morgan AA, Gong Y, et al. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. *J Exp Med.* 2013 Oct;210(11):2205–21.
108. Wang E, Worschech A, Marincola FM. The immunologic constant of rejection. *Trends Immunol.* 2008 Jun;29(6):256–62.
109. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med.* 2003 Jul 10;349(2):125–38.
110. De Freitas DG, Sellarés J, Mengel M, Chang J, Hidalgo LG, Famulski KS, et al. The nature of biopsies with “borderline rejection” and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant.* 2012 Jan;12(1):191–201.
111. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation.* 1987 Feb;75(2):401–5.
112. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant.* 2010;10(3):464–71.
113. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar IDR, Lopez MM, et al. Disappearance of T cell-mediated rejection despite continued antibody-mediated rejection in late kidney transplant recipients. *J Am Soc*

Nephrol. 2015 Jul 1;26(7):1711–20.

114. Nankivell BJ, Shingde M, Keung KL, Fung CLS, Borrows RJ, O'Connell PJ, et al. The causes, significance and consequences of inflammatory fibrosis in kidney transplantation: The Banff i-IFTA lesion. *Am J Transplant.* 2018 Feb 1;18(2):364–76.
115. Seifert ME, Yanik M V., Feig DI, Hauptfeld-Dolejssek V, Mroczek-Musulman EC, Kelly DR, et al. Subclinical inflammation phenotypes and long-term outcomes after pediatric kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2018 Sep 1;18(9):2189–99.
116. Roedder S, Vitalone M, Khatri P, Sarwal MM. Biomarkers in solid organ transplantation: Establishing personalized transplantation medicine. *Genome Med.* 2011 Jun 8;3(6):37.
117. Li L, Khatri P, Sigdel TK, Tran T, Ying L, Vitalone MJ, et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2710–8.
118. Sarwal MM, Ettenger RB, Dharnidharka V, Benfield M, Mathias R, Portale A, et al. Complete steroid avoidance is effective and safe in children with renal transplants: A multicenter randomized trial with three-year follow-up. *Am J Transplant.* 2012 Oct;12(10):2719–29.
119. Friedewald JJ, Kurian SM, Heilman RL, Whisenant TC, Poggio ED, Marsh C, et al. Development and clinical validity of a novel blood-based molecular biomarker for subclinical acute rejection following kidney transplant. *Am J Transplant.* 2019 Jan;19(1):98–109.
120. de Vries L V, Minović I, Franssen CFM, van Faassen M, Sanders J-SF, Berger SP, et al. The tryptophan/kynurenine pathway, systemic inflammation, and long-term outcome after kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(2):F475–86.
121. Vereyken EJF, Kraaij MD, Baan CC, Rezaee F, Weimar W, Wood KJ, et al. A Shift towards Pro-Inflammatory CD16+ Monocyte Subsets with

Preserved Cytokine Production Potential after Kidney Transplantation.  
PLoS One. 2013;8(7).