

**PERFILES TRANSCRIPCIONALES Y FUNCIONALES ASOCIADOS CON RECHAZO Y  
ACEPTACIÓN DEL INJERTO A LARGO PLAZO EN PACIENTES TRASPLANTADOS  
DE RIÑÓN.**

**Carlos Andrés Carmona-Agudelo, BSc.**

**Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de *Doctor en Ciencias  
Básicas Biomédicas (Inmunología)***

**Cristiam Mauricio Álvarez-Botero, DrSc.**

**Director**

**Comité asesor:**

**Gustavo Adolfo Zuluaga-Valencia, MD, Esp.**

**Carlos Enrique Muskus López, PhD.**

**Omar Triana Chávez, PhD.**



**Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética**

**Sede de Investigación Universitaria**

**Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas**

**Universidad de Antioquia**

**Medellín, Colombia**

**2023**

## AGRADECIMIENTOS

Al culminar la escritura de este manuscrito, pienso en la gran cantidad de personas que hicieron parte importante de este arduo proceso, tanto desde el apoyo técnico, académico y metodológico, como desde el apoyo en momentos en los que el trasegar como estudiante y como individuo se hicieron más complejos y difíciles de llevar.

Agradezco al profesor Cristiam Álvarez por haberme recibido como estudiante, y sobre todo por haber confiado en que mis capacidades iban a poder sortear los desafíos de un proyecto complejo que a lo largo del camino nos puso a prueba en muchos aspectos. En estos mismos momentos recibí su apoyo como profesor y esto fue fundamental para llevar a término mi trabajo.

A los miembros del comité asesor por su acompañamiento y por su apoyo para la ejecución del proyecto.

A la Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas y a la Universidad de Antioquia, por proveer los medios para formarme académicamente y por ser mi madre nutricia durante toda mi vida como estudiante y como profesional. Agradezco muy especialmente a la profesora Eliana por su apoyo desde su rol como directora que fue de gran utilidad para culminar mi proceso formativo.

A los miembros del GICIG, el cual ha sido el Grupo, la casa en la que inicié mi formación como investigador siendo estudiante de pregrado y a quienes debo el haber tenido la posibilidad de avanzar en este camino. Quisiera, dentro de estos, resaltar la compañía de Marlon y de Paula, con quienes no solo compartí un café, sino también pensamientos e ideas que de alguna manera aportaron significativamente a mi proceso. También, al profesor Mauricio porque hizo parte fundamental de mi proceso, especialmente en las últimas etapas.

A la Unidad de Nefrología del Hospital Pablo Tobón Uribe, por la provisión de muestras y el apoyo en la selección de los pacientes.

A los pacientes, quienes voluntariamente participaron del proyecto y fueron la base para que los análisis y hallazgos aquí presentados fueran posibles.

Agradezco a mi familia, a mi mamá, Sonia, mi hermanita, Elizabeth, a Luis y a Santi, quienes siempre han sido mi sostén y mi apoyo en todo lo que ha tenido que ver con mis ganas de estudiar y muy especialmente y aunque ya no pueda ver que este proceso llegó a su fin, a mi abuelito, Ricardo, quien siempre deseó un poco más de vida para estar presente en este momento. Su presencia en mi vida y

su motivación siempre fueron alicientes para emprender nuevos proyectos dentro de los que estuvo mi doctorado.

Agradezco Pao, porque sin pensarlo se convirtió en alguien especial y su acompañamiento en mi vida laboral, académica y personal han sido de gran apoyo, y su presencia en estos ámbitos contribuyó significativamente a que lograra llegar a este punto.

Agradezco también a mi mejor amigo, Felipe por estar ahí desde tiempos inmemorables, por su compañía y disposición para conversar sobre todo tipo de temas que sin lugar a dudas sacan de la rutina y hacen la vida más llevadera.

Finalmente, doy también gracias muy especiales a mis compañeros de Ayudas Diagnósticas Sura y del Centro de Ciencias Ómicas, porque siempre han sido conscientes de lo importante de este proceso, de la formación académica como el pilar para la ejecución adecuada de los procesos y de los proyectos, y por su apoyo para que pudiera lograr esta meta. Especialmente, agradezco a Carolina, no solo por ser una excelente líder, sino también por ser un gran apoyo y por nunca negarme la posibilidad de dedicarme a mi tesis aún en momentos en los que la labor era urgente.

## CONTENIDO

<b>Prefacio.....</b>	<b>10</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>Summary.....</b>	<b>16</b>
<b>Tipo de estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos: .....</b>	<b>19</b>
Objetivo general .....	19
Objetivos específicos: .....	19
<b>1    CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1.1    Enfermedad renal crónica y terapias de reemplazo.....	21
1.1.1    Diálisis.....	22
1.2    Generalidades del trasplante renal.....	23
1.3    Moléculas HLA y su papel en el trasplante renal.....	24
1.4    Anticuerpos específicos de donante (DSA).....	26
1.5    Inmunología del trasplante renal .....	27
1.5.1    Respuesta inmune innata.....	27
1.5.2    Respuesta inmune adaptativa: papel de las células dendríticas y presentación de antígenos 33	
1.5.3    Alorreconocimiento.....	34
1.5.4    Rol de las células B en el trasplante renal .....	39
1.5.5    Mecanismos efectores del rechazo del injerto renal.....	40
1.6    Ciencias ómicas y estudio de la expresión génica en la investigación en trasplantes .....	43
1.7    Expresión génica mediante secuenciación de RNA .....	46
1.8    Antecedentes de estudios mediante NGS implementando diferentes matrices biológicas de relevancia en el trasplante renal .....	48
1.9    Referencias .....	50

## **2 CAPÍTULO II: OPTIMIZATION OF AN RNA ISOLATION PROTOCOL FROM HUMAN URINARY SEDIMENT AND OTHER LIMITING SAMPLES FOR RNA SEQUENCING**

2.1	Abstract .....	60
	Background and objectives: .....	60
	Materials and Methods .....	60
2.2	Introduction .....	61
2.3	Materials and methods .....	63
2.3.1	Patients and study groups .....	63
2.3.2	Samples .....	63
2.3.3	Sample processing for RNA extraction.....	64
2.3.4	RNA quantification and integrity .....	64
2.3.5	Generation, quantification, and validation of cDNA libraries .....	65
2.3.6	cDNA libraries sequencing and evaluation by the Phred score.....	65
2.3.7	Primary and secondary bioinformatic analyses .....	65
2.4	Results .....	66
2.4.1	RNA concentration and integrity .....	66
2.4.2	Validation of cDNA libraries .....	66
2.4.3	Quality control analysis of cDNA library sequencing using the Phred score .....	66
2.4.4	Initial data exploration by bioinformatics analysis .....	67
2.5	Discussion and analyses .....	67
2.6	Conclusion.....	69
2.7	References .....	69

### **3 CAPÍTULO III: DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND FUNCTIONAL CATEGORIES IN BIOPSY, PERIPHERAL BLOOD, AND URINE FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC REJECTION**

3.1	Introduction .....	82
3.2	Materials and methods .....	84
3.2.1	Patients .....	84
3.2.2	Samples .....	84
3.2.3	Sample processing, RNA isolation, quantification, and integrity assessment.....	84
3.2.4	Library preparation and sequencing .....	85
3.2.5	Data analysis and statistics .....	85
3.2.6	Identification of differentially expressed genes (DEGs) .....	86
3.2.7	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	86
3.2.8	Identification of the most significant immune DEGs.....	86
3.2.9	Calculation of cell fractions in urine of AcR, Chr and Sta.....	87
3.3	Results .....	87
3.3.1	Histopathologic analysis of AcR and Chr biopsies .....	87
3.3.2	Library exploration with Multidimensional Scaling and Hierarchical Clustering ....	87
3.3.3	Differential gene expression analysis.....	87
3.3.4	Gene Set Enrichment Analysis in blood, urine, and biopsy of AcR and Chr.....	88
3.3.5	Identification of immune DEGs and functional analysis .....	89
3.3.6	Cell enrichment analysis .....	91
3.4	Discussion and analysis.....	91
3.5	References .....	95

#### **4 CAPÍTULO IV: PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANÁLISIS DE PROCESOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RESPUESTA INMUNE EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN PROCESO DE HEMODIÁLISIS Y PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN CON RECHAZO AGUDO, RECHAZO CRÓNICO Y SUPERVIVENCIA DEL INJERTO A LARGO PLAZO**

4.1	Introducción .....	113
4.2	Materiales y métodos .....	115
4.2.1	Pacientes y controles .....	115
4.2.2	Muestras .....	115
4.2.3	Evaluación de la integridad, construcción de librerías y secuenciación.....	116
4.2.4	Análisis de datos.....	116
4.2.5	Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs).....	117
4.2.6	Análisis de enriquecimiento (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA).....	117
4.2.7	Análisis de STRING.....	118
4.2.8	Identificación de genes inmunes y análisis de interacción proteína-proteína (P-P)	118
4.3	Resultados .....	119
4.3.1	Primera parte: genes diferencialmente expresados y análisis funcional entre individuos sanos y pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico, supervivencia del injerto a largo y plazo y pacientes en hemodiálisis. ....	119
4.3.2	Segunda parte: genes diferencialmente expresados y categorías funcionales en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo.....	123
4.4	Discusión y análisis.....	127
4.5	Referencias.....	135

## **5 CAPÍTULO V: DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND FUNCTIONAL CATEGORIES IN URINE FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH ACUTE REJECTION, CHRONIC REJECTION, AND LONG-TERM GRAFT SURVIVAL**

5.1	Introduction .....	161
5.2	Materials and methods .....	163
5.2.1	Patients and controls.....	163
5.2.2	Samples .....	163
5.2.3	Library preparation and sequencing .....	163
5.2.4	Data analysis .....	164
5.2.5	Identification of differentially expressed genes (DEGs) .....	164
5.2.6	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	164
5.2.7	STRING analysis.....	165
5.2.8	Identification of the most significant immune DEGs.....	165
5.2.9	Calculation of cell fractions in urine of AcR, Chr and Sta.....	165
5.3	Results .....	165
5.3.1	Library exploration and number of DEGS in AcR vs Sta and Chr vs Sta.....	165
5.3.2	Functional categories and biological processes of Gene Ontology based on DEGs in AcR, Chr and Sta.....	166
5.3.3	Functional categories of GO, KEGG and REACTOME associated to the most up regulated 1000 genes in AcR, Chr and Sta.....	168
5.3.4	Immune DEGs and functional categories associated with most up regulated genes in AcR, Chr and Sta.....	169
5.3.5	AcR and Chr exclusive immune DEGS .....	171
5.3.6	Urinary cell fractions of AcR, Chr and Sta .....	171
5.4	Discussion and analysis.....	172
5.5	References .....	179

## **6 CAPÍTULO VI: EXPLORACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES EN SANGRE PERIFÉRICA Y ORINA DE PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN CON RECHAZO AGUDO, ANTES Y DESPUÉS DE LA TERAPIA INMUNOSUPRESORA ANTI-RECHAZO**

6.1	Introducción .....	197
6.2	Materiales y métodos .....	198
6.2.1	Pacientes y controles .....	198
6.2.2	Muestras .....	198
6.2.3	Construcción de librerías y secuenciación .....	199
6.2.4	Análisis de datos.....	199
6.2.5	Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs).....	200
6.2.6	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	200
6.2.7	Análisis de STRING.....	200
6.2.8	Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	201
6.3	Resultados .....	201
6.3.1	Exploración de librerías y análisis de expresión diferencial .....	201
6.3.2	Análisis funcional mediante GSEA.....	202
6.3.3	Análisis de categorías funcionales y redes de interacción proteína-proteína en STRING 203	
6.3.4	Ingenuity Pathway Analysis.....	203
6.4	Discusión y análisis .....	204
6.5	Referencias .....	208
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>222</b>
7.1	Conclusiones .....	234
7.2	Perspectivas.....	236
7.3	Referencias .....	237

## Prefacio

Aunque en los últimos tiempos ha habido un avance significativo en la mejora y desarrollo de nuevas terapias inmunosupresoras para los pacientes trasplantados de riñón, el riesgo de pérdida del injerto a largo plazo por causa del rechazo crónico sigue siendo una de las principales amenazas para la supervivencia del órgano trasplantado. Variables como baja adherencia a las terapias, o eventos previos de rechazo agudo, son predisponentes a la falla crónica del órgano. Aunque se conocen los mecanismos celulares efectores que median ya sea el rechazo o la tolerancia al injerto, se ha propuesto que diferencias a nivel de la expresión génica tienen un papel fundamental en la regulación de dichos mecanismos, y a su vez, que estas diferencias están influenciadas por otros factores, lo que conduce a que diferentes pacientes con un mismo diagnóstico presenten perfiles moleculares distintos. Para esta tesis, se hizo una exploración de diferencias en la expresión génica mediante análisis de datos obtenidos de secuenciación de RNA (RNA-Seq), y de procesos biológicos asociados a estos genes, mediante análisis de categorías funcionales en muestras de sangre, biopsia y orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo, así como en pacientes con enfermedad renal crónica, ya que dicha enfermedad, junto con la diálisis pueden generar un ambiente proinflamatorio que puede repercutir posteriormente en el desenlace del injerto. Estas tres matrices biológicas se seleccionaron considerando su papel en la respuesta inmune frente al injerto: en sangre periférica se movilizan células del sistema inmune que migran al tejido renal en donde se instaura la respuesta frente al injerto. Por su parte, la orina, al estar en contacto estrecho con el riñón, puede contener células inmunes o moléculas derivadas de esta que pueden ser potenciales marcadores de rechazo o aceptación.

La tesis está estructurada de la siguiente manera:

**Capítulo 1:** en este capítulo se hace un abordaje general y conceptual de las diferentes etapas del trasplante renal, desde la enfermedad renal crónica y la hemodiálisis, hasta los mecanismos inmunológicos que median el rechazo y la supervivencia del injerto a largo plazo. Asimismo, se plantean algunos antecedentes de estudios moleculares realizados a partir de diferentes matrices biológicas, en los que se identificaron tantos genes como vías de señalización o procesos biológicos activados posterior al trasplante renal.

**Capítulo 2:** este capítulo se presenta en inglés y en formato tipo artículo y se encuentra sometido para publicación en la revista Heliyon. en este capítulo se describen los aspectos técnicos asociados

a la extracción de ARN de muestras de biopsia, sangre y orina. La relevancia de este capítulo se basa en que la puesta a punto del protocolo para extracción de ARN de orina, el cual fue aplicado también para las demás muestras, fue una etapa retardadora en la fase inicial del proyecto, entre otras cosas, por la baja celularidad en muestras de orina y por la labilidad del RNA especialmente en este tipo de muestras. En el capítulo se describe la metodología de extracción del ARN, así como las métricas de calidad implementadas desde la extracción hasta la preparación de librerías y secuenciación.

**Capítulo 3:** este capítulo se encuentra en inglés y en formato artículo, ya que por la relevancia de los hallazgos se encuentra en proceso de sometimiento para publicación en la revista *World Journal of Transplantation*. En el capítulo se hizo un abordaje del rechazo agudo y el rechazo crónico. Para esto, se realizaron análisis intra-desenlace comparando los diferentes tipos de muestra. Tanto para rechazo agudo como para rechazo crónico se identificaron los genes diferencialmente expresados en biopsia y orina con relación a sangre periférica. Con estos análisis se buscó, por un lado, identificar los genes regulados en cada una de las matrices, y por el otro, identificar el nivel de concordancia a nivel transcripcional entre biopsia y orina ya que ambas fueron comparadas frente a una matriz común. Adicionalmente, con la identificación de los genes regulados, se realizaron los análisis de enriquecimiento y demás análisis funcionales para identificar procesos biológicos y vías de señalización relevantes.

**Capítulo 4:** habiendo identificado que las muestras de sangre y orina tienen perfiles transcripcionales diferentes y que las muestras de biopsia y orina tienen un comportamiento transcripcional similar, se hizo el análisis por separado para cada muestra. En este capítulo se exploraron diferencias en sangre periférica de pacientes en rechazo agudo, crónico, supervivencia del injerto a largo plazo y hemodiálisis. El capítulo se abordó desde dos enfoques: en el primero identificaron diferencias en la expresión génica entre los pacientes en rechazo, supervivencia y hemodiálisis teniendo como línea de base a controles sanos no trasplantados. Los genes regulados positivamente en cada comparación corresponden a los pacientes, mientras que los genes regulados negativamente se anotaron como genes regulados positivamente en los controles. Sin embargo, en este caso se dio más relevancia a los genes regulados positivamente en los pacientes de los tres grupos. Posteriormente los genes de pacientes trasplantados fueron comparados con los genes regulados en pacientes en hemodiálisis. De esta manera se obtuvo un conjunto de genes comunes a los pacientes trasplantados de riñón y los pacientes con enfermedad renal crónica, con los cuales se identificaron procesos biológicos y otras categorías que pudieran ser comunes a los pacientes en lista de espera para trasplante y los pacientes trasplantados.

**Capítulo 5:** este capítulo se encuentra en inglés y en formato artículo, ya que por la relevancia de los hallazgos se encuentra en proceso de sometimiento para publicación. en este capítulo se exploraron diferencias en la expresión génica en orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo. Inicialmente, se realizó el análisis entre pacientes con supervivencia (línea de base) versus pacientes con rechazo agudo y pacientes con supervivencia (línea de base) versus rechazo crónico. La interpretación de la regulación de los genes se hizo siguiendo la misma lógica mencionada anteriormente: los genes regulados positivamente correspondieron a los genes de pacientes en rechazo agudo o crónico, mientras que los genes regulados negativamente se asumieron como regulados positivamente en supervivencia del injerto en cada comparación. Adicionalmente, se realizó el análisis comparando el grupo de rechazo agudo con el de rechazo crónico. En vista de que el número de genes regulados en esta muestra fue más alto con relación a las demás, la exploración de procesos biológicos y categorías funcionales se realizó con el total de los genes, pero también a partir del ranking de los 2000 y 1000 genes con mayores niveles de regulación; esto con el fin de facilitar el hallazgo de moléculas asociadas a la respuesta inmune con niveles significativos de expresión.

**Capítulo 6:** En este capítulo se abordaron diferencias en la expresión génica y en los procesos biológicos activados y suprimidos en los pacientes con rechazo agudo antes y después del suministro de la terapia inmunosupresora anti-rechazo. El análisis se realizó a partir de muestras de sangre y orina, ya que de los pacientes en la condición postratamiento no se contaba con muestra de tejido.

**Capítulo 7:** este capítulo corresponde a la discusión general, en la cual se hace un análisis recopilando los hallazgos más representativos de cada capítulo.

## Resumen

El trasplante renal constituye la terapia de remplazo de elección para pacientes con enfermedad crónica terminal y se considera superior a la diálisis por aspectos como mejoramiento de la calidad de vida del paciente y mayor probabilidad de supervivencia. El trasplante representa un reto inmunológico considerable para el paciente, ya que el injerto inflamado por cuenta de los mediadores liberados en la remoción del órgano, la lesión por isquemia/reperfusión y el daño mecánico generado en los procesos quirúrgicos, es una fuente de aloantígenos que promueve la activación de la respuesta inmune del paciente con la posterior instauración de una respuesta adaptativa por las vías de alorreconocimiento directo, indirecto y semidirecto. Aunque estos mecanismos inmunológicos están bien establecidos y se sabe que son los responsables del desarrollo de rechazo, y al mismo tiempo pueden estar asociados a la tolerancia inmunológica, aún no se ha logrado mejorar la supervivencia a largo plazo del injerto, ya que el rechazo crónico sigue siendo la principal limitante para el paciente trasplantado. La alta heterogeneidad genética entre los pacientes, la respuesta a las terapias inmunosupresoras y factores ambientales externos pueden influir en que los pacientes trasplantados presenten perfiles moleculares diferenciales; diferencias que a su vez pueden estar gobernando los mecanismos celulares efectores. En estudios previos ya se han reportado genes diferencialmente expresados en muestras de sangre, orina o biopsia de pacientes trasplantados, mediante metodologías de secuenciación masiva como la secuenciación de RNA y dichos genes se han asociado a procesos inmunes.

El objetivo de este trabajo fue **explorar** diferencias en la expresión génica mediante RNA-Seq en muestras de sangre, biopsia y orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo, así como en pacientes con enfermedad renal crónica sometidos a hemodiálisis. Adicionalmente, de los pacientes en rechazo agudo se realizó un análisis transcripcional posterior al suministro de la terapia anti-rehazo para lo cual fue necesario tomar nuevamente muestras de sangre y orina tres semanas después del tratamiento. De cada muestra se aisló y se secuenció RNA. Los datos se analizaron para identificar genes diferencialmente expresados que pudieran aportar al entendimiento de los mecanismos inmunológicos asociados al desenlace del injerto renal. La elección de estas muestras en conjunto se hizo con base en su relevancia biológica en el trasplante por el contacto estrecho que tienen con tejidos, células y moléculas implicados en la alorrespuesta inmune frente al injerto renal.

En cada capítulo se describen las aproximaciones metodológicas empleadas para la exploración de los genes diferencialmente expresados, así como de las categorías funcionales relacionadas. Inicialmente fue necesario estandarizar un protocolo para el aislamiento de ARN de orina. Este fue uno de los pasos con mayor demanda de tiempo debido a que fue necesario probar diferentes metodologías de extracción de RNA idóneo para secuenciación, a partir de orina. El procedimiento no está muy reportado en la literatura y muchos de los métodos actualmente implementados, no generaban un rendimiento adecuado. La extracción se puso a punto implementando Tri Reagent, así como el uso de glicógeno y acetato de sodio.

Posterior a todo el proceso de secuenciación y análisis inicial, se identificó la similitud entre biopsia y orina en función del número de genes diferencialmente expresados en pacientes con rechazo agudo y rechazo crónico. En los hallazgos se identificó un alto número de genes regulados en ambas muestras con relación a sangre periférica, la cual se usó como línea de base en el análisis de expresión diferencial. Dentro de los genes inmunes enriquecidos en orina y biopsia se identificaron algunos genes que codifican para quimiocinas, mientras que en sangre se identificaron principalmente receptores de estas moléculas. En los análisis de enriquecimiento se identificaron procesos biológicos que también fueron comunes entre biopsia y orina y que tuvieron una relación importante con mecanismos efectores del rechazo.

A continuación, se realizó la exploración únicamente en muestras de sangre periférica. Esta muestra fue la única que se pudo captar de todos los individuos y pacientes incluidos, ya que las muestras de biopsia solo se tomaron de pacientes en rechazo, y las muestras de orina no fue posible tomarlas de pacientes en diálisis y de individuos sanos. El análisis se realizó en dos partes. En la primera se hizo el análisis de expresión diferencial entre pacientes en rechazo, pacientes con supervivencia del injerto a largo plazo y pacientes en hemodiálisis con relación a controles sanos. Después se identificaron los genes comunes entre rechazo y supervivencia del injerto, con los pacientes en diálisis, para identificar genes y procesos biológicos comunes en los pacientes en diálisis que pudieran estar asociados al posterior desenlace del injerto y ser aplicados como una herramienta pronóstica. Uno de los hallazgos más relevantes, fue la identificación de procesos asociados a inflamación compartidos por los pacientes trasplantados y los pacientes en diálisis. En la segunda parte, se realizó el análisis de expresión diferencial entre pacientes con rechazo y pacientes con supervivencia del injerto a largo plazo. Se identificó que en pacientes con supervivencia hay mayor enriquecimiento de genes y procesos implicados en la regulación inmunológica, mientras que en rechazo agudo hubo un enriquecimiento de procesos inflamatorios como quimiotaxis y en rechazo crónico un enriquecimiento de actividad de neutrófilos.

Seguidamente, se exploraron diferencias transcripcionales en muestras de orina, ya que como se mencionó previamente, es una muestra de gran relevancia por ser poco invasiva y por la alta probabilidad de contener células y moléculas indicadoras del estado del injerto. Debido al alto número de genes regulados entre los pacientes en rechazo y pacientes con supervivencia del injerto a largo plazo, se realizó un análisis de enriquecimiento a partir de todos los genes, pero también a partir de los 1000 y 2000 genes con mayor nivel de regulación y significancia. En rechazo agudo y crónico con respecto a supervivencia del injerto a largo plazo se identificaron genes asociados a la quimiotaxis, así como enriquecimiento de procesos como presentación antigénica. Finalmente, al realizar un análisis de enriquecimiento celular, se identificó una tendencia al incremento en la fracción de células inmunes en orina de pacientes en rechazo con relación a supervivencia del injerto a largo plazo.

Finalmente, en el análisis de expresión diferencial en pacientes con rechazo agudo antes y después de la terapia anti-rechazo, se identificó la supresión de categorías asociadas a la respuesta inflamatoria, a la actividad de citoquinas y a la activación de células TCD4+ en la condición postratamiento.

En conjunto, se identificó que en la orina se refleja en un alto porcentaje la regulación de genes y procesos que pueden estar ocurriendo a nivel del tejido renal y que dichos procesos se asocian a los procesos efectores que se activan en rechazo o tolerancia del injerto. Adicionalmente, se identificó que si bien en la sangre hay un nivel de regulación importante de genes que hacen parte de las vías de señalización activadas en rechazo, la orina también representa una fuente de marcadores que se asocian a la respuesta efectora frente al injerto lo cual debe de ser validado en un mayor número de pacientes.

## Summary

Kidney transplantation is the replacement therapy of choice for patients with terminal chronic disease and is considered superior to dialysis for aspects related to quality of life and greater probability of survival. Transplantation represents a considerable immunological challenge for the recipient, as the inflamed graft is a source of alloantigens that promotes the activation of the immune response with the subsequent establishment of an adaptive response through direct, indirect, and semidirect allorecognition pathways. Although these immunological mechanisms are well established and are known to be responsible for the development of rejection or may be associated with immunological tolerance, it has not yet been possible to improve long-term graft survival, since chronic rejection continues to be the leading cause of graft loss. The high heterogeneity between patients, the response to immunosuppressive therapies and external environmental factors may influence that patients with a common diagnosis whether acute or chronic rejection mediated either by T cells or by antibodies, present differential molecular profiles; differences that in turn may be governing the effector cellular mechanisms. In previous studies, differentially expressed genes have already been reported in blood, urine, or biopsy samples of kidney transplant patients, using massive sequencing methodologies such as RNA sequencing, and these genes have been associated with immune processes.

The objective of this work was to explore differences in gene expression in kidney transplant patients with acute rejection, chronic rejection, and long-term graft survival, as well as in patients with chronic kidney disease undergoing hemodialysis, based on the analysis of RNA-Seq derived data. For this aim, blood, biopsy and urine samples were jointly implemented, since they have great biological relevance in transplantation due to their close contact with tissues, cells, and molecules involved in the immune alloresponse. In addition, acute rejection was explored both at the time of active rejection, as well as after the administration of anti-rejection immunosuppressive therapy, for which new samples were taken three weeks after treatment. In this way, transcriptional differences that could be associated with the response to drugs were explored.

Each chapter describes the methodological approaches used to explore differentially expressed genes, as well as related functional categories. Initially it was necessary to standardize a protocol for the isolation of RNA from urine. This was one of the most time-demanding steps because it was necessary to test different methodologies for extracting RNA suitable for sequencing from urine. The procedure is not widely reported in the literature and many of the currently implemented methods did not

generate adequate performance. The extraction was fine-tuned by implementing Tri Reagent, as well as the use of glycogen and sodium acetate.

After the entire sequencing process and initial analysis, the similarity between biopsy and urine was identified based on the number of differentially expressed genes in patients with acute rejection and chronic rejection. In the findings, a high number of regulated genes was identified in both samples in relation to peripheral blood, which was used as a baseline in the analysis of differential expression. Within the immune genes enriched in urine and biopsy, some chemokine ligand genes were identified, while in blood, receptors for these molecules were mainly identified. In the enrichment analyzes, biological processes were identified that were also common between biopsy and urine and that had an important relationship with effector mechanisms of rejection.

Subsequently, the examination was performed only on peripheral blood samples. This sample was the only one that could be taken from all the individuals and patients included, since biopsy samples were only taken from patients in rejection; urine samples could not be taken from dialysis patients and healthy individuals. The analysis was carried out in two parts. Firstly, differential gene expression analysis was performed in patients in rejection, patients with long-term graft survival, patients on hemodialysis and healthy controls. Common genes between rejection and graft survival were then identified with dialysis patients to identify common genes and biologic processes in dialysis patients that might be associated with engraftment outcomes. One of the most relevant findings was the identification of processes associated with inflammation shared by transplant patients and the dialysis group. Secondly, differential expression analysis was performed between patients with rejection and patients with long-term graft survival. It was identified that in patients with survival there was a greater enrichment of genes and processes involved in immune regulation, while in acute rejection there was an enrichment of inflammatory processes such as chemotaxis and in chronic rejection an enrichment of neutrophil activity.

Subsequently, transcriptional differences in urine samples were explored. Due to the high number of regulated genes among rejection patients and patients with long-term graft survival, an enrichment analysis was performed based on the whole regulated genes, but also on the 1,000 and 2,000 genes with the highest level of regulation and significance. In acute and chronic rejection with respect to long-term graft survival, genes associated with chemotaxis were identified, as well as enrichment of processes such as antigenic presentation. Finally, when performing a cell enrichment analysis, an increasing trend was identified in the fraction of immune cells in the urine of patients in rejection in relation to long-term graft survival.

Finally, in the analysis of differential expression in patients with acute rejection before and after anti-rejection therapy, the suppression of categories associated with the inflammatory response, cytokine activity, and activation of CD4+ T cells was identified in the post-treatment condition.

Overall, it was identified that a high percentage of the regulation of genes and processes at the renal tissue level is reflected in the urine and that these processes are associated with the effector processes that are activated in graft rejection or tolerance. Additionally, it was identified that although in the blood there is an important level of regulation of genes that are part of the signaling pathways activated in rejection, urine also represents a source of markers that are associated with the effector response against the graft, which It should be validated in a larger number of patients.

**Tipo de estudio:** exploratorio – descriptivo

### **Hipótesis**

Este es un estudio *non-hypothesis driven* ya que se hizo un abordaje en función de los desenlaces y de los tipos de muestra para identificar diferencias transcripcionales y funcionales en los pacientes trasplantados de riñón y con enfermedad renal crónica, con el fin de plantear nuevas hipótesis así como nuevas propuestas de investigación.

### **Objetivos:**

#### **Objetivo general**

Identificar diferencias en la expresión génica y en los procesos biológicos y categorías funcionales en muestras de sangre, biopsia y orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo y crónico, supervivencia del injerto a largo plazo, y pacientes en hemodiálisis.

#### **Objetivos específicos:**

Determinar mediante secuenciación el transcriptoma de pacientes trasplantados de riñón con diferentes desenlaces, pacientes en diálisis e individuos sanos.

Establecer las diferencias en la expresión génica asociadas a los diferentes desenlaces del injerto renal.

Definir las posibles vías de señalización y redes de interacción molecular asociadas a la respuesta inmune implicada en los diferentes desenlaces del injerto renal.

Establecer la concordancia entre los genes diferencialmente expresados del transcriptoma y los mecanismos inmunológicos efectores en cada uno de los diferentes desenlaces.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL**

# 1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 Enfermedad renal crónica y terapias de reemplazo

La enfermedad renal crónica (CKD, de *chronic kidney disease*) es una enfermedad multicausal, caracterizada por daños estructurales y disminución en la función renal que incluyen valores en las tasas de filtración glomerular (eGFR) por debajo de 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup> y paraclínicos alterado como albuminuria, hematuria, u observaciones anormales en otras variables o imágenes diagnósticas que persisten por más de tres meses. Las tasas de CKD están en constante aumento en todo el mundo y se estima que al menos 10% de adultos padecen algún tipo de afectación renal crónica, que causan aproximadamente 1,2 millones de muerte cada año. En la figura 1 se muestran los porcentajes estimados asociados a las diferentes causas de CKD. La causa más frecuente es la diabetes mellitus tipo 2. Entre otras entidades se encuentran la diabetes mellitus tipo 1, hipertensión, glomerulonefritis primaria, nefritis tubulointersticial crónica, quistes o factores hereditarios, glomerulonefritis secundaria o vasculitis y nefropatías (1).

Posterior al diagnóstico de CKD, es necesario determinar la etapa en la que se encuentra la enfermedad. Las etapas son determinadas con base en la eGFR y en los niveles de albuminuria. Según la eGFR, la CKD es clasificada en 5 etapas: G1, G2, G3a-G3b, G3, G4 y G5. En la etapa 5, también denominada etapa terminal (ESKD, de *end stage kidney disease*), los valores en las eGFR se encuentran por debajo de 15 mL/min/1.73m<sup>2</sup>. Por su parte, en función de la albuminaria, la CKD es clasificada en tres etapas: A1, A2 y A3. En A3, los valores de albuminuria superan los 300mg/g (1,2).

El manejo de los pacientes con CKD incluye, entre otros, disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular, manejo de la hipertensión y manejo de la diabetes, para lo cual se considera el ajuste de medicamentos, ya que algunos podrían actuar como nefrotoxinas y exacerbar la enfermedad. En los casos en los que se observa anemia en los pacientes, el tratamiento con eritropoyetina también es una estrategia de manejo.

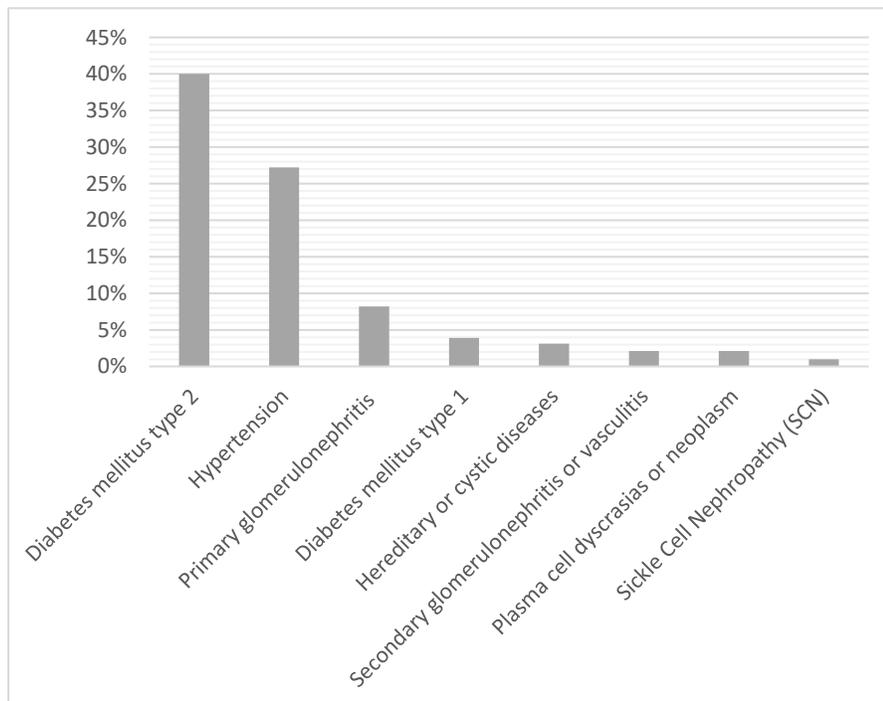
Aunque muchos de los pacientes con CKD no llegan a requerir de terapias de reemplazo como la diálisis o el trasplante renal, factores como el manejo de la enfermedad y condiciones ambientales, son determinantes en el pronóstico. En los casos en los que el paciente alcanza la etapa G4, aumento significativo en los niveles de albuminuria, imposibilidad de controlar la hipertensión o hipocalcemia persistente, debe ser remitido al nefrólogo para determinar la necesidad de una terapia de reemplazo, la cual, es finalmente requerida cuando el paciente alcanza la etapa terminal (1–4).

### 1.1.1 Diálisis

Cuando se evalúa la necesidad de una terapia de reemplazo, la diálisis es una opción de primera línea. El procedimiento puede ser de dos tipos: diálisis peritoneal y hemodiálisis. La primera está basada en la infusión de una solución estéril al espacio peritoneal mediante un catéter, y se realiza la remoción de agua y de solutos mediante el aprovechamiento de la membrana peritoneal como superficie de intercambio. Este procedimiento es realizado por el paciente.

La hemodiálisis es un procedimiento más complejo, en el que el intercambio de fluidos se realiza en condiciones hospitalarias y al que el paciente asiste al menos tres veces en una semana, por 3 – 5 horas cada día. En el procedimiento, se utiliza una máquina de diálisis a través de la cual se hace pasar la sangre del paciente y en el que se hace un intercambio de fluidos por difusión a través de una membrana semipermeable. Los productos del metabolismo, como la urea o la creatinina se difunden en la solución de diálisis. Aunque la hemodiálisis es la modalidad más realizada en todo el mundo, supone muchas desventajas para el paciente, principalmente por la dependencia a asistir al centro de diálisis lo cual disminuye su calidad de vida por la inversión de tiempo, y por la imposibilidad de realizar otras actividades.

La realización de hemodiálisis se ha encontrado asociada al desarrollo de algunos eventos adversos que hacen necesaria y urgente la realización del trasplante renal. Estos incluyen problemas como aterosclerosis, cardiomiopatías, problemas asociados a accidentes técnicos durante el procedimiento, polineuropatía o amiloidosis (5–9).



**Figura 1.** Causas más frecuentes de CKD. Gráfica generada a partir de la información obtenida de Vaidya SR, Aeddula NR. *Chronic Renal Failure*. [Updated 2022 Oct 24]. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535404/>*

## 1.2 Generalidades del trasplante renal

Aunque un paciente con CKD puede o no requerir de una terapia de reemplazo, y un paciente en hemodiálisis puede o no requerir de un trasplante renal, esta representa la terapia de reemplazo de elección para pacientes con ESKD, especialmente por aspectos relacionados con la calidad de vida y con la supervivencia a largo plazo del paciente con relación a la diálisis. No obstante, el tiempo de función estable del injerto posterior al trasplante, depende de múltiples factores tanto inmunes como no inmunes.

Desde el primer trasplante renal exitoso realizado en 1954 por Joseph Murray en gemelos monocigotos y que tuvo una supervivencia de 8 años, se han realizado múltiples avances en el área de inmunología de trasplantes que han permitido mejorar la supervivencia del injerto y la calidad de vida de los pacientes trasplantados, dentro de los que se encuentran los protocolos para la selección de los donantes, las metodologías implementadas en el estudio inmunológico pre-trasplante y el desarrollo de nuevos medicamentos inmunomoduladores. Uno de los aspectos determinantes, es la selección del donante y dentro de las filosofías que se tienen en cuenta actualmente para la selección del donante se encuentra la selección personalizada bajo la premisa de “seleccionar el donante adecuado para el receptor adecuado”, para lo cual se consideran diferentes variables. La calidad del órgano va a depender, entre otros factores, de si es un donante vivo o un donante fallecido. Clásicamente, se ha reportado que las tasas de supervivencia y la reducción en las tasas de función retardada del injerto (DGF, de *delayed graft function*) son más probables en receptores con órganos de donantes vivos. Sin embargo, en estudios retrospectivos recientes se ha reportado que, si bien en los pacientes con injertos a partir de donantes fallecidos hay mayores tasas de DGF, variables como la función estable a largo plazo no mostraron muchas diferencias entre donantes vivos y donantes fallecidos. En otros estudios previos se ha reportado que la supervivencia del injerto a tres años, fue superior en pacientes con injertos de donante vivo respecto a pacientes con órganos de donante fallecido. Asimismo, la posibilidad de acceder a un riñón de un donante vivo relacionado, podría

disminuir el tiempo de diálisis, lo cual también es una variable asociada a resultados más positivos (10–12).

En el proceso de selección del donante adecuado para el receptor adecuado, juegan un rol importante variables como la edad, tanto del donante como del receptor y la determinación del riesgo inmunológico. Este último es sin duda la de mayor peso y representa un reto importante en el proceso de selección. Previo al trasplante, es necesario evaluar el estado inmunológico del donante y del receptor específicamente mediante la evaluación de la compatibilidad HLA (de *Human Leukocyte Antigen*) de clase I y clase II, presencia de anticuerpos específicos de donante en el receptor y compatibilidad de grupo sanguíneo (ABO).

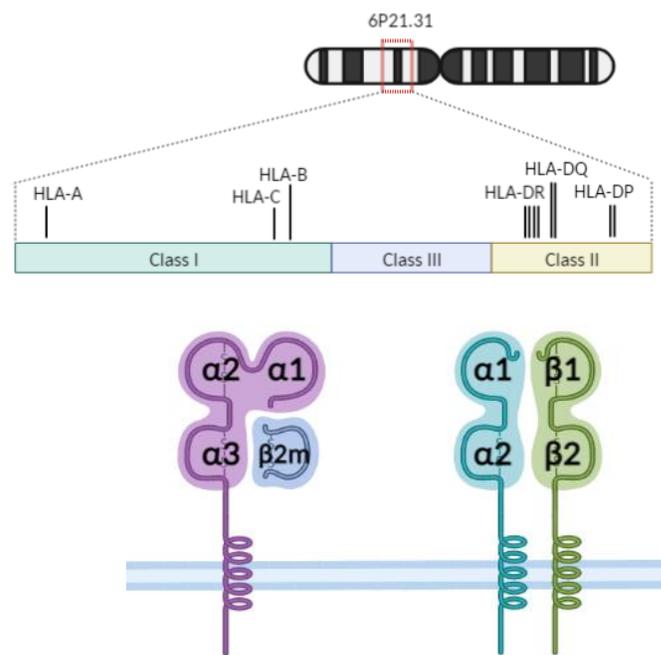
### **1.3 Moléculas HLA y su papel en el trasplante renal**

El sistema HLA tiene un rol biológico esencial en la presentación antigénica y en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Los genes del HLA se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) y abarcan aproximadamente 3600 kb. El sistema de genes está dividido en tres regiones: la región de clase I contiene los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, los cuales codifican para las cadenas  $\alpha$  de las moléculas de clase I. Esta cadena está formada por alrededor de 340 residuos de aminoácidos y tiene una región citoplasmática, una región transmembrana y una región en la superficie celular. Esta última está conformada por aproximadamente 270 residuos de aminoácidos que forman los dominios tipo inmunoglobulina  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  forman el surco de unión del péptido y de unión al receptor de la célula T (TCR). Los dominios extracelulares de moléculas de clase I interactúan además con la molécula estabilizadora  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2m$ ), específicamente con el dominio  $\alpha 3$  (13–15).

La región de clase II, la cual está a su vez dividida en diferentes subregiones que contienen los genes A (que codifican para las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) y los genes B (que codifican para las cadenas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ). Las moléculas de clase II están conformadas por los genes HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. La familia DR consiste de un solo gen DRA y 9 genes DRB. La cadena DRA puede asociarse con cualquiera de las cadenas DRB. Las familias DP y DQ están cada una formada por un gen A y B. Adicionalmente, existe la región de clase III, la cual contiene genes que no expresan moléculas HLA, pero sí genes importantes en vías como el complemento y TNF. En la figura 2 se esquematiza la organización de los genes del complejo HLA y la posterior organización de la proteína a nivel celular (15–17).

La importancia de la clasificación HLA con el menor número de incompatibilidades posible se basa en dos razones principales: la primera, por el papel del HLA en la presentación antigénica, necesario

para la activación de la respuesta frente al injerto en el proceso de alorreconocimiento. La segunda, por su rol como aloantígeno ya que los péptidos derivados de los complejos HLA de las células del donante presentes en el injerto, son posteriormente presentados a las células T y la antigenicidad del péptido presentado va a influir directamente en el tipo de respuesta inmune frente al órgano. Estos aspectos serán mencionados más adelante. De esta manera, se ha descrito que las proteínas de los HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 son las más inmunogénicas y se han asociado a mayores tasas de rechazo, por lo cual las incompatibilidades en estos alelos son clásicamente de las más relevantes en el estudio pre-trasplante. Adicionalmente, se ha descrito que las moléculas DQ son altamente polimórficas, y por lo tanto pueden tener una implicación negativa en el desenlace del injerto (15,17).



**Figura 2.** Organización cromosómica y genética de los genes HLA clase I y clase II, y estructura de las moléculas HLA expresadas en la superficie celular. Las moléculas de clase I están conformadas por tres dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  y por la  $\beta 2$ -microglobulina. Las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  conforman el surco de unión al péptido. Las moléculas de clase II están formadas por 2 dominios  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) y dos dominios  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ). Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  conforman el surco de unión al péptido.

#### 1.4 Anticuerpos específicos de donante (DSA)

Los anticuerpos específicos de donante (DSA, de *donor specific antibodies*) son anticuerpos que dependiendo de la temporalidad pueden ser pre formados o *de novo*. En el estudio pre-trasplante, se debe hacer una detección adecuada de DSA pre formados, ya que un receptor sensibilizado con anticuerpos anti-HLA puede sufrir procesos de rechazo hiperagudo, rechazo acelerado o rechazo agudo mediado por anticuerpos. La sensibilización en un individuo puede darse por embarazo, trasplantes previos o transfusiones de sangre por lo que en estos casos se aumenta la probabilidad de presentar un panel reactivo de anticuerpos (PRA, de *panel reactive antibodies*) positivo. Los DSA preformados pueden estar dirigidos contra moléculas de clase I o de clase II, y su detección contraindica el trasplante, particularmente si se detectan anticuerpos citotóxicos fijadores de complemento tipo IgG, ya sean IgG1 o IgG3.

Los anticuerpos de grupo sanguíneo (ABO) contraindican el trasplante, y pueden estar asociados a rechazos agudos mediados por anticuerpos ya que al estar presentes al momento del trasplante pueden depositarse en el tejido renal y activar la vía clásica del complemento, lo cual desencadenaría procesos de lisis celular e inflamación tisular inmediatos. Sin embargo, el marcado desequilibrio entre la demanda de trasplante y la oferta de donantes, hizo necesario la determinación de criterios extendidos para la realización del trasplante renal y el manejo de la incompatibilidad ABO antes de la realización del trasplante. Dentro de las opciones de manejo se encuentran la remoción de anticuerpos mediante plasmaféresis, inmunoadsorción, plasmaféresis de doble filtración e intercambio selectivo de plasma. También se han implementado medicamentos para la depleción de células B, como el Rituximab, inmunoglobulina intravenosa y se han mejorado los protocolos de terapias de inducción de tal forma que impacten directamente en la reducción de los títulos de anticuerpos anti-ABO.

Teniendo en cuenta que en gemelos monocigotos se han reportado casos de rechazo mediado por anticuerpos, se ha planteado que los DSA no son exclusivamente dirigidos contra moléculas HLA, sino que existen otras moléculas como MICA (de *major histocompatibility complex class I chain-related gene A*) o vimentina frente a las que puede haber DSA deletéreos. El estudio inmunológico pre-trasplante, sin duda, ha influido positivamente en las tasas de supervivencia del injerto renal, aunado al mejoramiento y desarrollo de nuevas terapias inmunosupresoras. Sin embargo, al tratarse de un trasplante alogénico siempre existirá la probabilidad de riesgo inmunológico, por lo que procesos como el rechazo y particularmente el rechazo crónico, continúa siendo una de las principales limitantes para la supervivencia del injerto a largo plazo ya que más del 50% de los pacientes sufren

pérdida del injerto después de 10 años, y la tasa de pérdida después del primer año es del 3%-5% en pacientes con donante fallecido y del 2%-3% en pacientes con donante vivo (18–23).

## **1.5 Inmunología del trasplante renal**

Junto con los aspectos mencionados previamente, la profundización en la identificación de los mecanismos inmunológicos que se activan posterior al trasplante, y la comprensión de la dinámica y la interacción entre las diferentes células de la respuesta innata y adaptativa, también ha influido en el incremento de la supervivencia del injerto a un año en un 90% y a la reducción de las tasas de rechazo agudo por debajo del 15%. El componente inmunológico es sin duda el principal determinante del desenlace del injerto, y como se mencionó previamente, juega un papel muy importante desde el estudio pre trasplante, hasta la implementación de estrategias de monitoreo de la función y estado del órgano trasplantado.

### **1.5.1 Respuesta inmune innata**

Aunque históricamente las principales células efectoras de la respuesta frente al injerto renal han sido las células T, la respuesta inmune innata es crucial para modular la respuesta adaptativa frente al injerto y su papel consiste principalmente en la modulación de la respuesta específica frente al injerto renal en las primeras etapas del trasplante y en la generación de un ambiente proinflamatorio en las etapas subsecuentes, lo cual la hace un potencial blanco de terapias inmunomoduladoras.

En la respuesta innata frente al injerto renal, se da la interacción de receptores, células y mediadores solubles que, en conjunto, contribuyen a la expansión de la respuesta inflamatoria, y por lo tanto son claves en el rechazo del injerto. La respuesta innata se activa desde el momento de la muerte del donante (en los casos en los que haya un donante fallecido), ya que posterior a la muerte cerebral se induce la liberación de mediadores inflamatorios como IFN- $\gamma$ , y se inician procesos de muerte celular que promueven la liberación de moléculas intracelulares al espacio extracelular, que pueden ser reconocidos por receptores, codificados en línea germinal, encargados del reconocimiento de patógenos (PRRs, de *pattern recognition receptors*). En los años 90, Janeway propuso la existencia de un conjunto de receptores ubicuos que podían diferenciar entre patrones moleculares de patógenos (PAMPs, de *pathogen associated molecular patterns*) y moléculas propias del individuo. Sin embargo, en los años siguientes se propuso que el sistema inmune mediante estos receptores, tiene la capacidad de reconocer señales de alarma, más que de discernir entre lo propio y lo no propio. Estas señales de alarma también pueden estar dadas por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, de *damage associated molecular patterns*), los cuales son, precisamente, las moléculas liberadas tras la muerte del donante, y posteriormente en procesos como la lesión del órgano por

isquemia/reperfusión (IRI de *ischemia/reperfusion injury*). En este caso, la falta en el suministro de oxígeno con la posterior reconexión a la circulación sanguínea, y el daño mecánico generado en el proceso quirúrgico, inducen la activación de vías de muerte celular, disfunción endotelial y reprogramación transcripcional que, a su vez, promueven la liberación de DAMPs, como HMGB1 (de high mobility group box 1). Dentro de los PRRs mayormente descritos por tener un papel importante en la respuesta frente al injerto, se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs, de *Toll-like receptors*). Adicionalmente, existen otro tipo de receptores como los RLRs (de *RIG-1-like receptors*), NLRs (de, *NOD-like receptors*), ALRs (de *AIM2-like receptors*), CLRrs (de *C-type lectin receptors*), y sensores intracelulares de ADN como cGAS (24–27).

### 1.5.1.1 Receptores tipo Toll (TLRs)

Estructuralmente, los TLR tienen un dominio N-terminal de unión al ligando, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular o intra endosomal. Los TLR1 al TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 se localizan a nivel de la membrana celular y reconocen ligandos extracelulares. Por ejemplo, HMGB1 es reconocida a través de TLR4, al igual que PAMPs como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas. Por su parte, los TLR3, y TLR7 a TLR10, están localizados en las membranas endosomales y reconocen principalmente ácidos nucleicos derivados de microorganismos o provenientes de células fagocitadas. La señalización a través de estos receptores, culmina en la translocación nuclear de factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B, los cuales activan la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras (25,28,29).

Dentro de las células que expresan TLRs se encuentran células del sistema inmune como células dendríticas (DCs), monocitos y macrófagos; y células no inmunes como fibroblastos y células endoteliales. La activación inicial de estas células a través de los diferentes TLR, induce el reclutamiento de otras células de la respuesta innata hacia el injerto renal como neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, células NK y células dendríticas (27).

Los TLR son claves en mediar el daño frente al injerto, específicamente en el proceso de lesión por isquemia reperfusión (IRI, de *ischemia/reperfusion injury*). Este es un proceso que se da posterior a la remoción del órgano del donante y que consiste, en primer lugar, en la interrupción del suministro del oxígeno y, en segundo lugar, en su restauración. La lesión genera a partir de la activación de programas de muerte celular como apoptosis, necrosis y autofagia; reprogramación transcripcional a nivel de las células renales y por la disfunción endotelial que incrementa la permeabilidad de los vasos y facilita la subsecuente migración de células inmunes al tejido (30). En estudios previos, se ha

reportado que en IRI hay un incremento en la expresión de TLR4 y niveles más elevados de HMGB1, liberado a partir de ellos procesos de muerte activados previamente. La interacción de HMGB1 y TLR4 activa las vías proinflamatorias ya mencionadas que, a su vez, generan un ambiente proinflamatorio propicio para la activación inmune posterior al trasplante. Esto fue confirmado en modelos animales *knockout* para TLR4 en los que se observó una disminución en los niveles de TNF $\alpha$ , MCP-1 y en los que además se identificó mejor función del injerto (31).

### **1.5.1.2 Células de la respuesta innata en trasplante renal**

Los neutrófilos son las células inmunes más abundantes en sangre periférica, y son las primeras en migrar al injerto en respuesta al estímulo proinflamatorio. La activación endotelial por citoquinas como la IL-1 $\beta$ , inducen la atracción de neutrófilos hacia el tejido renal. El reconocimiento de DAMPs por parte de los neutrófilos a través de TLRs, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, de *reactive oxygen species*), y de enzimas hidrolíticas que promueven el daño tisular. Adicionalmente, se ha observado que los neutrófilos pueden fagocitar y presentar antígenos, y, por ende, modular la respuesta adaptativa mediante la activación de células T. Con estos mecanismos de acción, los neutrófilos están asociados a procesos de rechazo tanto agudo como crónico (27,32).

Los macrófagos son células que en el trasplante pueden tener un papel dual, ya que, como clásicamente se ha reportado, pueden amplificar la respuesta inflamatoria, pero también pueden participar en el desarrollo de tolerancia inmunológica frente al injerto. Los macrófagos pueden activarse a través de PRRs, y esta activación induce un incremento en su expresión de moléculas HLA, moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, e incrementa la secreción de citoquinas como THF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6, y quimiocinas como CXCL9 y CXCL10, por lo cual, el macrófago puede generar las tres señales requeridas para la activación de células T. Posterior a la activación por CLR como dectina-1, o de TLRs como TLR4 y después de un segundo estímulo a través de estos receptores, los macrófagos pueden producir citoquinas como IL-6 y TNF- $\alpha$ , las cuales estarían incrementando y prolongando la respuesta inflamatoria frente al injerto. Para abordar la asociación entre macrófagos y rechazo o tolerancia, se ha aceptado dividir los macrófagos en los subtipos M1 y M2. Los macrófagos M1 son proinflamatorios, y posterior a su activación median las respuestas mencionadas previamente. Los macrófagos M2, por el contrario, tiene un perfil antiinflamatorio y se especializan en la producción de citoquinas como IL-10 y de arginasa 1. Aunque la polarización hacia M1 o M2 es una forma de entender el rol dual de los macrófagos, es importante resaltar que son células con alta plasticidad y que dichos fenotipos pueden variar en función del microambiente en el injerto. Aunque no es un mecanismo muy ampliamente descrito en el trasplante renal, los macrófagos pueden adoptar un fenotipo que les confiere la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias a

largo plazo, bajo lo que se ha denominado memoria del sistema inmune innato o inmunidad entrenada. (27,33–35).

Las células NK representan entre el 5-10% de linfocitos en sangre periférica. Clásicamente, son células citotóxicas, que a diferencia de las células T no requieren de la presentación antigénica para su activación. El control de la actividad de las células NK se basa en el reconocimiento por parte de receptores inhibidores de moléculas HLA de clase I propias. Ante un constante reconocimiento, la célula permanece inactiva y no ejerce su actividad citotóxica. Sin embargo, en casos en los que se reduce la expresión de moléculas HLA propias, como en el caso de tumores, las células son activadas produciendo una lisis directa mediante la producción de moléculas como perforinas y granzimas.

Asimismo, el reconocimiento de fracciones Fc de inmunoglobulinas por parte de las células NK, puede activar el mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos. El rol de las células NK en trasplante renal es aún controversial. Aunque su mecanismo citotóxico se ha asociado más al desarrollo de rechazo, algunas investigaciones también han apuntado al desarrollo de tolerancia mediado por estas células. El principio, se basa en que las células NK reconocen y tiene una acción lítica sobre células dendríticas presentes en el riñón, que al ser parte del donante no expresan moléculas HLA de clase I propias. Este efecto también podría tener una acción directa sobre células T presentes en el órgano, lo cual afectaría la vía de alorreconocimiento directa. No obstante, no existe suficiente evidencia que soporte este planteamiento (36–38).

### **1.5.1.3 Activación del complemento y cascada de la coagulación**

Dentro de los factores solubles más importantes en la respuesta frente al injerto renal se encuentra el complemento. Este sistema está conformado por alrededor de 50 proteínas, las cuales pueden ser solubles, o hacer parte de la membrana celular en el caso de los receptores. Las proteínas solubles del sistema se encuentran a nivel sérico y son producidas en el hígado. Estas se encuentran en sus formas inactivas y requieren de un proceso de activación en cascada para cumplir las funciones inmunológicas. En un principio, el único rol conocido del complemento, era la formación del complejo de ataque a membrana, el cual se describió como un mecanismo de lisis de microorganismos. Sin embargo, hoy se sabe que el complemento cumple múltiples funciones no solo como un componente de la respuesta inmune innata, sino también de la respuesta específica (24,27)

La activación del complemento puede darse a través de tres vías: la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alterna. La vía clásica requiere de un complejo inmune formado por la unión de un anticuerpo (ya sea IgM o IgG) con su antígeno, y de la activación del complejo C1q y su interacción con C1r y C1s. La interacción del complejo inmune con el complejo C1q-C1s-C1r induce el reclutamiento y

clivaje de las proteínas C2 y C4 en las subunidades a y b. C2b y C4a son liberadas, y C4b y C2a forman el complejo convertasa de C3. La convertasa cliva la proteína C3 en las subunidades a y b. La subunidad a es liberada como un factor soluble, y la subunidad C3b se une al complejo C4bC2a para formar la convertasa de C5, C4bC2aC3b; la cual cliva la proteína C5 en las subunidades a y b. La subunidad a es también liberada como un factor soluble y la subunidad C5b se une a las proteínas C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque a membrana. Este complejo funciona como un mecanismo de daño en procesos como el rechazo mediado por anticuerpos, activado por esta vía. La vía de las lectinas se activa a partir del reconocimiento de carbohidratos o residuos N-acetil en la membrana de la célula blanco por moléculas como la lectina ligadora de manosa, ficolinas y colectinas. Este reconocimiento induce el reclutamiento de serina-proteasas (MASPs), las cuales convergen al paso del clivaje de C4 y C2, y el proceso continúa conforme en la vía clásica. La vía alterna se activa con la hidrólisis espontánea de C3 y la generación de la convertasa de C5, que en este caso está formado por subunidades C3b y subunidades Bb generadas a partir de la hidrólisis inicial. La convertasa de C5 C3bBbC3b también cliva a C5 en las subunidades a y b, y el proceso continúa igual que en las vías anteriores. Los factores solubles liberados, es decir, las subunidades C3a y C5a no forman parte del complejo de ataque a membrana, sino que cumplen funciones inmunomoduladoras y proinflamatorias. Uno de sus principales roles es el de anafilotoxinas y participan en el reclutamiento hacia el injerto de células como neutrófilos, mastocitos y linfocitos T. Asimismo, participan en inducir la producción de radicales de oxígeno por parte de granulocitos, producción de mediadores inflamatorios y aumento de la permeabilidad vascular, esencial para la trans migración celular de la circulación hacia el tejido renal. La activación del complemento en el contexto del trasplante renal se ha asociado a procesos como IRI, microangiopatía trombótica post trasplante (por su interacción con la cascada de la coagulación), rechazo mediado por células T y rechazo mediado por anticuerpos (36,39–42).

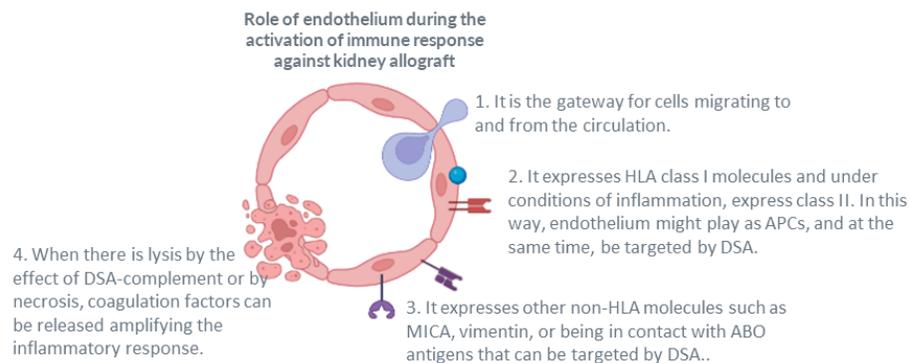
La cascada de la coagulación también es un componente esencial de la respuesta inmune innata, y su papel no se restringe únicamente al proceso de coagulación. El sistema del complemento y esta cascada tienen diferentes puntos de intersección que marcan procesos relevantes en la respuesta frente al injerto renal. Algunos factores de la coagulación, como XIa, Xa, IXa, y plasmina, pueden clivar la proteína C5 sin la acción de la convertasa de C5. Asimismo, se ha reportado que proteínas como las MASPs, de la vía de las lectinas, pueden ser activadas por el sistema de la coagulación. Por otro lado, también se ha reportado que el factor de la coagulación, o protrombina, puede interactuar directamente con la proteína C5. Asimismo, las subunidades generadas por el clivaje de C5 y el complejo de ataque a membrana, pueden inducir la activación de la cascada de la coagulación, por la

expresión de factor tisular por múltiples tipos celulares, como monocitos y células endoteliales (43,44).

#### 1.5.1.4 Papel del endotelio en la respuesta frente al injerto renal

El endotelio de la microvasculatura renal constituye la puerta de entrada de las células que van de la circulación al tejido, y es a su vez un blanco de los diferentes mecanismos inmunes activados en respuesta al trasplante. Bajo condiciones fisiológicas, el endotelio tiene funciones moduladoras de la homeostasis, hemodinámicas, control de permeabilidad, coagulación y extravasación de diferentes tipos celulares. Asimismo, regula la coagulación sanguínea mediante mecanismos pro y anticoagulantes. Bajo condiciones de inflamación, se incrementa la permeabilidad vascular, lo cual favorece la adhesión y migración de células como neutrófilos, monocitos y macrófagos proinflamatorios hacia los tejidos.

Las células endoteliales son clasificadas por algunos autores como células inmunes, ya que no solo se encargan de las funciones mencionadas previamente, sino que también al expresar moléculas HLA clase I y bajo condiciones inflamatorias por efecto del IFN- $\gamma$  pueden expresar moléculas HLA de clase II, tienen la capacidad de presentar antígenos a las células T. Algunos autores sugieren que las células endoteliales están implicadas en el mantenimiento de las condiciones inflamatorias que median el rechazo del injerto a largo plazo. Las células endoteliales también expresan PRRs por lo que tienen la capacidad de reconocer DAMPs, activarse y secretar diferentes citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-17 y TNF- $\alpha$ . Asimismo, son un blanco de la actividad del complemento, ya que al expresar moléculas HLA y otros aloantígenos, pueden ser reconocidas por DSAs activadores de esta vía lítica. (figura 3) (45–49)



**Figura 3.** Rol del endotelio en la respuesta inmune frente al injerto renal. El endotelio constituye la puerta de entrada y de movilización de células efectoras desde y hacia el tejido. La expresión de moléculas HLA de clase I y II permite que la célula endotelial cumpla el rol de célula presentadora de antígeno, además, los HLA expresados, así como otros antígenos las hace blanco de la acción de los DSA. La activación de vías como la del complemento pueden a su vez interactuar con otras vías como la cascada de la coagulación, lo cual favorece la expansión de mecanismos inmunopatogénicos.

### **1.5.2 Respuesta inmune adaptativa: papel de las células dendríticas y presentación de antígenos**

La activación de la respuesta específica frente al injerto renal, requiere de la comunicación constante con la respuesta innata. En esta comunicación es de gran relevancia el proceso de presentación de antígenos por parte de las células innatas previamente activadas. Como se mencionó previamente, células como monocitos, macrófagos o neutrófilos, pueden procesar y presentar antígenos a las células T. No obstante, las células presentadoras profesionales por excelencia son las células dendríticas (DCs). Estas células abarcan un conjunto de subpoblaciones que pueden ser residentes de tejido, migratorias y que pueden o no estar en órganos linfoides secundarios.

Las células dendríticas derivan de precursores hematopoyéticos, y con base en la expresión de diferentes marcadores de superficie se han clasificado en cDC1 y cDC2. Las cDC1, expresan los marcadores CD11c, CD141, CLEC9A y altos niveles de HLA de clase II. Las cDC2 expresan CD11c, receptor de alta afinidad para IgE, CD1c, CD1a y altos niveles de HLA de clase II. En el riñón, la mayoría de células dendríticas residentes del tejido son del tipo cDC2. Estas pueden estar directamente en el tejido renal, o localizarse en los nódulos linfoides cercanos.

En un estado basal, las células dendríticas inmaduras controlan la actividad de células T y B, promoviendo un ambiente regulador en el que no se requiere de la activación de la respuesta efectora. Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias como las desencadenadas en IRI, las células dendríticas residentes en el tejido renal del donante, inician un proceso de activación y maduración mediante el reconocimiento de DAMPs a través de diferentes PRRs, principalmente TLR2 y TLR4.

En este contexto tienen un rol fundamental tanto las células dendríticas del donante, las cuales son clásicamente denominadas “leucocitos pasajeros” y las células dendríticas del receptor. Estas células se podrían denominar células de primera y segunda línea, respectivamente. Posterior al trasplante del órgano, las células dendríticas del donante ya se encuentran activadas y tienen la capacidad de presentar antígenos a células T naïve o de memoria del receptor. Asimismo, el gradiente de quimiocinas y el ambiente proinflamatorio favorecido por la liberación y el reconocimiento de

DAMPs, permite la migración hacia el tejido de células dendríticas, así como la diferenciación de células como monocitos a un fenotipo de células dendríticas. Estas, las que se denominarían de segunda línea, pueden activarse, fagocitar aloantígenos y migrar a los tejidos linfoides secundarios para la subsecuente activación de células T. Adicionalmente, células dendríticas de primera y segunda línea, pueden interactuar, y por procesos de trogocitosis o por medio de vesículas, intercambiar moléculas de superficie que van a tener un rol crucial en el proceso de activación de células T mediante el alorreconocimiento (27,50–54).

### **1.5.3 Alorreconocimiento**

El alorreconocimiento es el proceso que marca el inicio de la instauración de la respuesta adaptativa frente al injerto. El concepto, hace referencia al reconocimiento de antígenos HLA de un individuo (donante) por parte de otro (receptor) de la misma especie, pero con incompatibilidades genéticas entre sí. Los antígenos HLA, al ser lo más polimórficos del genoma, son los más relevantes en el alorreconocimiento, y son los que clásicamente dirigen la respuesta frente al injerto. El resultado del alorreconocimiento, es la activación de células T aloespecíficas (del receptor) que sin inmunosupresión y en ausencia de un microambiente tolerogénico, van a mediar el rechazo del injerto (55).

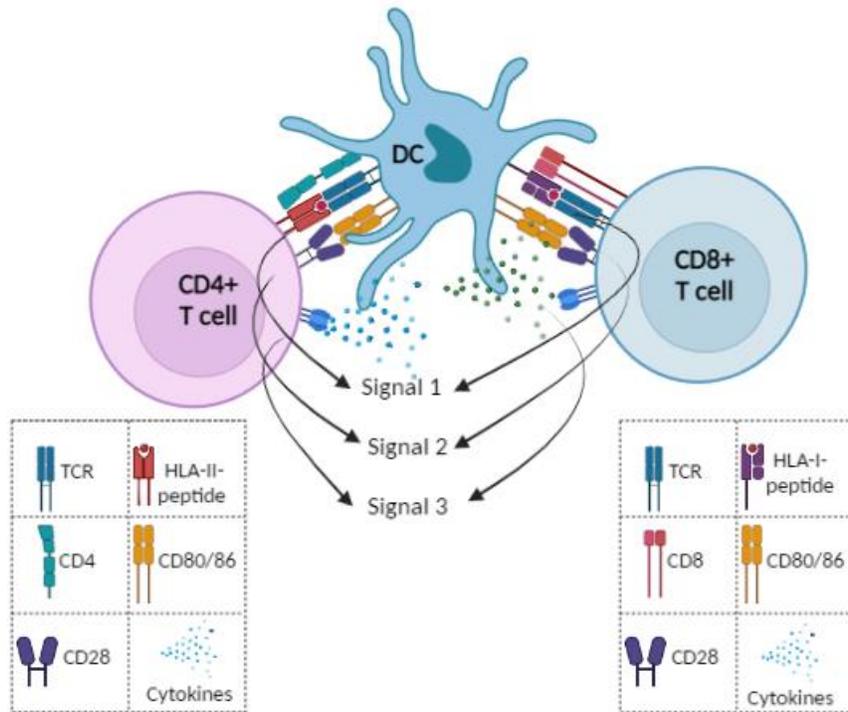
Como se describe a continuación, el alorreconocimiento puede darse a través de tres vías (figura 4), las cuales no son mutuamente excluyentes; es decir, suceden simultáneamente y cada una tiene un significado determinado en el desenlace del injerto. En el proceso de alorreconocimiento juegan un papel fundamental las células dendríticas del donante presentes en el injerto, implicadas en la vía directa y en la vía semidirecta; células dendríticas del receptor, las cuales migran al tejido renal posterior al restablecimiento del flujo sanguíneo y son necesarias para la vía indirecta y semidirecta; y las células T aloespecíficas, las cuales son finalmente las células activadas en cada una de las tres vías y que van a mediar la respuesta efectora.

#### **1.5.3.1 Generalidades de la activación de células T**

Para comprender el alorreconocimiento, es necesario saber que está basado en la activación de células T, la cual requiere de la participación de diferentes receptores, moléculas coestimuladoras y citoquinas para la generación de una respuesta efectora adecuada. En la figura 4 se ilustra el panorama general de las moléculas y señales requeridas para la activación de la célula T.

La activación de células T requiere, en un primer momento, de la sinapsis inmunológica entre la célula presentadora de antígenos y la célula T. Para esto, y como se mencionó previamente, se

requiere que la célula presentadora, en cuyo caso se usará como ejemplo la DC, se haya activado mediante el reconocimiento de PAMPs, DAMPs u otras moléculas ligandos de estos receptores, haya captado y procesado un antígeno (en este caso, un aloantígeno) y haya sufrido un proceso de maduración, en el cual se incrementan la expresión de moléculas HLA y de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86. Asimismo, la expresión de receptores de quimiocinas como CCR7, van a dirigir la movilización de la DC al nódulo linfoide donde se llevará a cabo la interacción con la célula T. La sinapsis inmunológica, requiere de la generación de tres señales. La primera señal está dada por la interacción entre el complejo formado por el HLA y el péptido unido, el cual corresponde al antígeno presentado (en la DC), y el TCR (de *T cell receptor*) (en la célula T). Adicionalmente, se requiere de la participación del correceptor CD4 (cuando se presenta a través de un HLA de clase II) y CD8 (cuando se presenta a través de un HLA de clase I). En esta señal, se dan diferentes cambios conformacionales en los receptores que permiten un contacto directo célula-célula, que resulta en la fosforilación de los dominios ITAM del CD3 por la quinasa Lck. A partir de este paso, se inicia una cascada de señalización que culmina en la translocación de factores de transcripción al núcleo. Sin embargo, para que la activación sea adecuada y no se genere un estado de anergia, se requiere que en la sinapsis haya una segunda señal, la cual está dada por moléculas coestimuladoras. CD80 y CD86, los cuales se incrementaron en el proceso de maduración de la DC, interactúan con CD28 en la célula T. Asimismo, para una coestimulación estable, se da la interacción entre moléculas como LFA1 con ICAM1 o ICAM2, y CD2 con LFA3. La señal intracelular generada incrementa la respuesta de la primera señal y la estabiliza. Es importante mencionar que dentro de las moléculas que pueden interactuar con CD80/86, también se encuentra CTLA-4 en células T. Sin embargo, la señal generada es una señal inhibitoria, por lo que su papel es relevante en procesos de generación de tolerancia más que de activación celular. Adicionalmente, se requiere de una tercera señal, la cual es generada por citoquinas del microambiente en el que se está dando la interacción. Las tres señales determinan finalmente el perfil de diferenciación de la célula T, y por ende, modula el tipo de respuesta generada, la cual puede ser proinflamatoria, antiinflamatoria o reguladora (27,56–59).



**Figura 4.** La activación de las células T requiere de la presentación de antígenos por parte de una célula presentadora de antígenos y de la activación de tres señales. La presentación a través de moléculas HLA de clase I activa células T CD8+, mientras que la presentación por HLA de clase II activa células T CD4+. La interacción entre el complejo HLA-péptido-TCR y correceptor, ya sea CD4 o CD8, el cual interactúa con las moléculas HLA respectivas, generan la señal 1, mientras que la interacción de moléculas coestimuladoras generan la señal 2. Finalmente, la activación se termina de llevar a cabo con la señal 3, la cual es proporcionada por las citoquinas generadas tanto por la célula presentadora de antígeno, como por la célula T en proceso de activación.

### 1.5.3.2 Vía de alorreconocimiento directa

En esta vía se requiere de la interacción de células dendríticas del donante con células T del receptor (figura 5). La denominación de “directa” obedece a que no se requiere un procesamiento antigénico para llevar a cabo una activación inmune convencional, sino que las células del donante presentan antígenos directamente a las células T CD4 o CD8 del receptor. Se ha reportado que la activación de la vía directa está dada en parte por el ambiente proinflamatorio generado previo al trasplante por procesos como IRI. En primer lugar, en esta vía se pierde la restricción por HLA, ya que las células T se activan por la interacción con un complejo HLA-péptido alogénico y se rompe la regla de activación en función al proceso de “educación” en el timo con moléculas HLA propias. Esto, en

parte, obedece a que el repertorio de células T alorreactivas es superior (alrededor del 10%) al repertorio de células T que fueron educadas para responder a antígenos foráneos específicos (0.01%).

La vía de alorreconocimiento directa, fue inicialmente asociada con rechazo agudo, teniendo en cuenta que su ocurrencia iniciaba inmediatamente después del trasplante. Adicionalmente, en algunos modelos experimentales de trasplante de páncreas y tiroides (52) se observó que la eliminación de células dendríticas pasajeras antes del trasplante, disminuía significativamente la activación de células T de memoria e incrementaba la supervivencia del injerto.

Aunque la vía directa sí permite la activación de células T en las etapas iniciales del trasplante, su impacto ha sido progresivamente discutido, en primer lugar, por la disminución de DC pasajeras presentes en el injerto y, en segundo lugar, por la alta probabilidad de que, al migrar a los nódulos linfoides secundarios, puedan ser reconocidas y consecuentemente “asesinadas” por células NK teniendo en cuenta su mecanismo de activación por la ausencia de moléculas HLA de clase I propias. No obstante, y como se mencionó previamente, es importante no descartar el rol de las células endoteliales, que, al adquirir un fenotipo de célula presentadora de antígeno, puede contribuir en cierta medida a la perpetuación de presentación de aloantígenos por la vía directa. Además, en estudios recientes se ha reportado que otros tipos celulares pueden también estar implicados en la continuidad de la vía directa. Eleftheriades y colaboradores, reportaron que en modelos *in vitro*, células epiteliales tubulares proximales primarias podían expresar moléculas como HLA-DR, CD80 e ICAM-1, y se observó que podían activar células TCD4+, y observaron un incremento en la función y en la proliferación de los linfocitos. Sin embargo, no hay reportes en modelos *in vivo* que dé cuenta de estas observaciones (60–64).

### **1.5.3.3 Vía de alorreconocimiento indirecta**

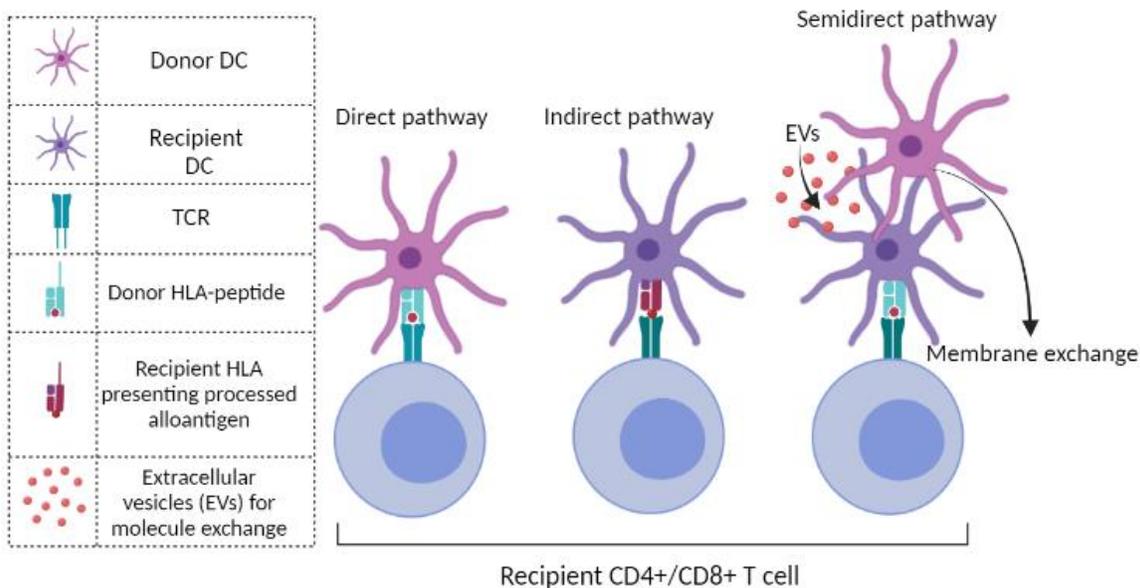
En la vía indirecta, se da un proceso de presentación antigénica en el que interactúan DC del receptor con células T del receptor. A diferencia de la vía directa en la que ya existe un complejo HLA-péptido preformado, en la vía indirecta se da la captación de antígenos, procesamiento y presentación antigénica por parte de la DC; es decir, la vía indirecta corresponde a la activación convencional de la respuesta inmune específica (figuras 4 y 5). La DC puede activarse e iniciar su proceso de maduración, mediante la captación de aloantígenos a nivel del tejido renal o en los nódulos linfoides secundarios cercanos. Los mecanismos descritos para captación de los aloantígenos incluyen pinocitosis de pequeños péptidos derivados de moléculas HLA alogénicas, y fagocitosis de estructuras derivadas de células del donante, como cuerpos apoptóticos u otros restos de células muertas. Asimismo, las células del donante pueden liberar vesículas extracelulares en las cuales

pueden estar contenidas moléculas HLA, que son procesadas y posteriormente presentadas a las células T. Por la vía indirecta, pueden también procesarse y presentarse antígenos asociados a complejos menores, los cuales pueden estar en otro tipo de proteínas con pequeños polimorfismos que incrementan la inmunogenicidad de los péptidos. A diferencia de la vía directa, en la que el repertorio de células T alorreactivas es alto y se da una activación policlonal sin generación de memoria inmunológica, en la vía indirecta el repertorio de células es menor por lo que se da una respuesta oligoclonal. Ya que esta vía requiere únicamente de células del receptor, está asociada a una respuesta más prolongada con generación de memoria inmunológica, por lo que es más probable que esté implicada en procesos de rechazo crónico, o en el desarrollo de tolerancia a largo plazo (61,62,65,66).

#### **1.5.3.4 Vía de alorreconocimiento semidirecta**

En la vía semidirecta se da la activación de células T mediante mecanismos que incluyen procesos de la vía directa y la indirecta (figura 5). Esta vía de alorreconocimiento se basa en la transferencia de complejos HLA péptidos intactos desde células del donante hacia células presentadoras de antígeno del receptor. Esto implica que la DC del receptor no necesariamente requiere procesar el antígeno y expresar la molécula de HLA alogénica con el péptido, sino que se da la activación de células T con complejos HLA-péptido pre formados. Teniendo en cuenta que la presentación antigénica se está llevando a cabo a través de un HLA alogénico, la respuesta efectora y la clonalidad de las células T activadas, será similar a la observada en la vía directa.

Para la transferencia de los complejos HLA-péptido de células del donante a DC del receptor, se han descrito dos mecanismos principales: uno de ellos es el contacto célula-célula que permite intercambiar fracciones de membrana celular en las que se encuentran expresados complejos HLA (clase I/II)-péptido mediante un mecanismo denominado trogocitosis. El otro también se basa en la comunicación celular, pero a través de vesículas extracelulares en las que se encuentran contenido, entre otras macromoléculas, complejos HLA (clase I/II)-péptido. Estas vesículas son liberadas por células del donante y posteriormente captadas por DC del receptor que mantienen los complejos en su superficie y pueden posteriormente activar células T de manera directa (61-63,65,66).



**Figura 5.** Vías de alorreconocimiento en respuesta al injerto. En la vía directa se presentan antígenos directamente a las células T CD4+/CD8+ por parte de células presentadoras de antígenos del receptor. En la vía indirecta, células T del receptor captan, procesan y presentan aloantígenos a las células T del receptor y se da una sinapsis inmunológica y activación de la respuesta específica convencional. En la vía semidirecta se activa la vía directa a través de la presentación antigénica por parte de células presentadoras de antígeno del receptor. La captación de los complejos HLA-péptido se lleva a cabo mediante la comunicación célula-célula e intercambio de membranas o mediante vesículas extracelulares cargadas con complejos HLA-péptidos intactos del donante.

#### 1.5.4 Rol de las células B en el trasplante renal

Aunque la activación de células T es crucial para la instauración de la respuesta frente al injerto, la respuesta adaptativa al órgano también depende en gran medida de las células B. Clásicamente, el papel de las células B se ha asociado a su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Como se mencionó previamente, después del trasplante pueden formarse DSA *de novo* (dnDSA) los cuales requieren de la activación de células B. No obstante, al tratarse de determinante antigénicos derivados de proteínas, la activación de la respuesta humoral depende a su vez del alorreconocimiento, ya que es una respuesta T dependiente, para lo cual se requiere la interacción entre células T y B a nivel de los nódulos linfoides.

Las células B pueden reconocer e internalizar antígenos a través del BCR (de *B cell receptor*) dentro o fuera de los folículos, localizados en los nódulos linfoides secundarios. A este nivel, las células B pueden reconocer antígenos en la superficie de las DC foliculares, u otras células como macrófagos. La captación del antígeno inicia una cascada de señalización intracelular que resulta en el inicio de rearrreglos del citoesqueleto. Las células B que han llevado este proceso, pueden migrar a la zona T, a nivel del folículo, en donde recibirá “ayuda” de las células TCD4+; esta ayuda está dada por la interacción entre CD40/CD40L, y por la producción de citoquinas como IL-21, esenciales para la producción de anticuerpos. La migración de la célula T a este sitio, depende previamente de la activación, en el contexto del trasplante, en el alorreconocimiento.

Aunque el papel de la respuesta humoral juega un papel determinante en la respuesta al injerto, es necesario tener en cuenta que las células B también pueden cumplir otros roles, dentro de los que destaca la presentación antigénica. Las condiciones inflamatorias dadas por el trasplante, y las cuales fueron mencionadas anteriormente, permiten también la migración de células B al tejido, y la expresión de moléculas HLA de clase II y de moléculas coestimuladoras, pueden captar, procesar y presentar antígenos a las células T mediante la vía indirecta. Estudios previos han demostrado que en biopsias de pacientes con rechazo agudo celular también se observó una alta infiltración de células B, y que este hallazgo no estaba asociado a la producción de DSA o de otros hallazgos sugerentes de una respuesta humoral, lo cual sugiere a su vez que el rol de las células B en algunos casos puede ser más de célula presentadora de antígenos que productora de anticuerpos, e incluso puede mediar procesos reguladores como es el caso de las células B reguladoras (27,67–71).

### **1.5.5 Mecanismos efectores del rechazo del injerto renal**

El reconocimiento de incompatibilidades en antígenos HLA que conduce la activación de la respuesta inmune adaptativa es la principal causa de rechazo, mediado principalmente por la respuesta celular y denominado rechazo mediado por células T (TCMR, de *T cell mediated rejection*) y por la respuesta humoral, denominado rechazo mediado por anticuerpos (ABMR, de *antibody mediated rejection*). Esta clasificación obedece no solo a los mecanismos implicados en el desarrollo del rechazo, sino también a los hallazgos histopatológicos en el estudio de biopsia renal, para lo cual la clasificación de Banff es el criterio universalmente aceptado para la clasificación de rechazo.

#### **1.5.5.1 TCMR**

Desde el punto de vista del mecanismo efector, el TCMR se caracteriza por la infiltración intersticial de células T efectoras, macrófagos, células dendríticas y células B. Asimismo, tras la activación de una respuesta citotóxica, pueden identificarse marcadores como granzima, perforina granulisna y

FASL. Este tipo de rechazo se inicia con la activación de células T efectoras por las diferentes vías de alorreconocimiento. A partir del microambiente proinflamatorio generado por la interacción entre las células presentadoras de antígenos y la célula T, se van a reclutar al injerto los demás tipos de células proinflamatorias ya mencionados. En la clasificación de Banff, los principales hallazgos asociados al TCMR incluyen la infiltración celular, tubulitis e inflamación intersticial (72,73).

#### **1.5.5.2 ABMR**

El ABMR es la principal causa de pérdida del injerto renal y puede ser de dos tipos: el tipo 1, causado por DSA preformados y el tipo 2 causado por dnDSA, la cual es la presentación más común teniendo en cuenta la identificación de los anticuerpos pre formados en el estudio pre trasplante. Este tipo de rechazo, específicamente el de clase 2, requiere de la activación de células B y de la producción de anticuerpos dirigidos contra epítopes de moléculas HLA expresados principalmente por células endoteliales de la microvasculatura renal. Adicionalmente, pueden estar dirigidos contra antígenos menores y moléculas como el receptor de angiotensina II. Los anticuerpos de grupo sanguíneo ABO también pueden estar implicados en el rechazo mediado por anticuerpos, aunque su ocurrencia es más baja. Hallazgos característicos de este tipo de rechazo incluyen la infiltración de neutrófilos, monocitos y células NK en los glomérulos y capilares peritubulares, que inducen al daño vascular, glomerulitis, tubulitis y capilaritis. Otros hallazgos histopatológicos pueden incluir el depósito de C4d como resultado de la activación del complemento. Aunque su identificación es indicador de ABMR, es importante tener en cuenta que no es un marcador de alta sensibilidad ya que un alto porcentaje de biopsias con diagnóstico de ABMR son negativas para C4d. Otro marcador clínico y temprano en el diagnóstico de ABMR, es la identificación de DSA circulantes (74–76).

#### **1.5.5.3 Rechazo agudo y rechazo crónico**

Clásicamente, el rechazo se ha clasificado en función del tiempo de ocurrencia posterior al trasplante. En ese orden de ideas, el rechazo se clasifica en hiperagudo, agudo y crónico. El rechazo hiperagudo es poco frecuente. Este se desarrolla de minutos a horas posterior al trasplante y está mediado por DSA preformados o por anticuerpos de grupo sanguíneo ABO.

El rechazo agudo se define como aquel que ocurre entre los primeros meses del trasplante, y el rechazo crónico es aquel que ocurre en cualquier momento después del trasplante, generalmente después del tercer mes. En un principio se asociaba el rechazo agudo a la respuesta efectora de las células T, y el rechazo crónico a la respuesta humoral. Sin embargo, vale aclarar que esta es una forma muy general de clasificar el rechazo, ya que a la fecha se sabe que el impacto clínico está determinado

por los mecanismos efectores implicados y por los hallazgos histopatológicos asociados a estos. Así, tanto el rechazo agudo como el rechazo crónico pueden ser de tipo TCMR o ABMR.

El rechazo agudo de tipo TCMR se presenta en los primeros meses post trasplante y se caracteriza por síntomas como disminución en la eGFR. Según la clasificación de Banff puede ser de tipo IA, IB, IIA, IIB, III. En los de tipo I se presenta inflamación intersticial significativa y tubulitis, mientras que en los de tipo II hay mayor compromiso que incluye la presencia de arteritis. El tipo III es más severo y puede tener marcadores de activación humoral.

El rechazo agudo ABMR se diagnostica en función de hallazgos morfológicos, inmunológicos y/o serológicos. Dentro de los hallazgos morfológicos, según la severidad, se puede presentar inflamación de la microvasculatura que puede involucrar glomerulitis y/capilaritis peritubular; arteritis y microangiopatía trombótica. Los hallazgos inmunológicos pueden ser detección de C4d en los capilares peritubulares, moderada inflamación y expresión de transcritos asociados al endotelio (ENDATS) los cuales fueron incluidos como criterio diagnóstico en esta clasificación. Los hallazgos serológicos pueden incluir DSA.

El rechazo crónico TCMR es poco frecuente. Cuando se presenta se puede clasificar en grado IA, IB y grado II. En los de grado I se puede identificar tubulitis e inflamación cortical o tubulointersticial moderada, así como fibrosis intersticial/atrofia tubular (IFTA). En grado II se puede presentar fibrosis íntima arterial con infiltración de células mononucleares.

En el rechazo crónico ABMR, los hallazgos morfológicos incluyen glomerulopatía, microangiopatía trombótica y puede estar acompañado de cambios crónicos como formación de múltiples capas en los capilares peritubulares y fibrosis arterial. Los antecedentes inmunológicos de este tipo de rechazo pueden ser episodios de rechazo previos y a nivel serológico se pueden o no detectar DSA (77–81).

#### **1.5.5.4 Tolerancia y regulación inmunológica en el trasplante renal**

Aunque la mayoría de los procesos efectores inmunes activados a partir del alorreconocimiento resultan en la amplificación de la respuesta inflamatoria que finalmente culmina en el rechazo y en la posible pérdida del injerto renal, es de resaltar que posterior al trasplante también puede darse mecanismos de tolerancia y/o la activación de una respuesta tolerogénica que favorecen la supervivencia del injerto a largo plazo, incluso, aunque en pocos casos, a bajas dosis o con nula inmunosupresión.

La tolerancia en trasplantes ha sido definida como la supervivencia y el mantenimiento de la función estable del injerto trasplantado en ausencia de respuestas inmunes efectoras. La tolerancia puede ser

dividida en dos categorías: central y periférica. La tolerancia central se refiere al proceso por el cual linfocitos autorreactivos son eliminados del timo o de la médula ósea. La tolerancia periférica hace referencia a la deleción o anergia de linfocitos activados para que no reconozcan antígenos propios en tejidos periféricos. La tolerancia en trasplantes se relaciona exclusivamente con la tolerancia periférica, debido a la ausencia de deleción clonal de las células T autorreactivas en el timo. Además de la deleción y la anergia, otros mecanismos de tolerancia periférica incluyen la supresión de la actividad de células T efectoras.

Procesos de tolerancia periférica como la supresión de la actividad de células y la regulación inmunológica tienen un elemento en común de suma relevancia en el trasplante: las células T reguladoras (Tregs). Estas son células que fenotípicamente, se identifican por la expresión de CD4, CD25<sup>high</sup> y del factor de transcripción FOXP3 y CD127<sup>low/-</sup>. Las Tregs pueden ser derivadas del timo (tTregs, naturales), o diferenciadas a nivel de periferia (pTregs, adaptativas). Las tTregs se originan en el proceso de selección positiva, a partir de células que reconocen los complejos HLA-péptido propios con alta afinidad, mientras que las pTregs requieren de un proceso de activación en un microambiente rico en TGF- $\beta$  e IL-2. Con base en su origen, las tTregs no son antígeno específicas, y su función principal es la supresión de la actividad de células T efectoras, mientras que las pTregs son antígeno específicas y requieren de las condiciones previamente mencionadas para su función.

Los mecanismos de acción de las Tregs pueden ser dependientes del contacto célula-célula, o independiente de este mediante la producción de diferentes citoquinas. Dentro de los mecanismos dependientes del contacto, se encuentra la inducción de apoptosis mediante la interacción de moléculas como CD80/CD86 con CTLA-4, el cual, a diferencia de la interacción con CD28, envía una señal inhibitoria a la célula T, con una afinidad entre los receptores mayor que la observada con CD28. Además, la interacción entre PD1/PD1L también está asociada a la inhibición de la activación celular. Dentro de las citoquinas producidas por las Tregs, las cuales ejercen su función independiente del contacto célula-célula, se encuentran IL-35, TGF- $\beta$  e IL-10. Otro de los mecanismos, es la liberación de exosomas por parte de las Tregs, en el que se encuentran contenidas algunas moléculas como miRNAs. Células T efectoras activadas pueden captar los exosomas, y los miRNAs pueden actuar como reguladores de la transcripción mediante el silenciamiento de genes asociados a la activación (82–85).

## **1.6 Ciencias ómicas y estudio de la expresión génica en la investigación en trasplantes**

Con el paso del tiempo, se han logrado avances significativos, en el mejoramiento y desarrollo de nuevas terapias inmunosupresoras y en la comprensión de los mecanismos efectoras del rechazo, lo

cual ha impactado positivamente en la supervivencia a un año del injerto y han permitido reducir las tasas de rechazo agudo. No obstante, aún sigue habiendo desconocimiento de los mecanismos moleculares, tanto inmunes como no inmunes, implicados en los procesos de rechazo a largo plazo y en los que median la supervivencia del injerto a largo plazo. Uno de los factores que limita la identificación de mecanismos específicos asociados a estos desenlaces, es la variabilidad que existe entre los pacientes; es decir, tanto el rechazo como la supervivencia son procesos que, si bien se agrupan bajo estas denominaciones, son a su vez heterogéneos entre los pacientes.

Esta variabilidad está soportada por hallazgos que involucran variaciones en la composición de las células que infiltran los injertos, inconsistencias en la respuesta a las terapias inmunosupresoras, y casos de rechazo mixto. Esto último pone en tela de juicio la dicotomía entre los dos tipos de rechazo, TCMR y ABMR, ya que algunos pacientes pueden manifestar signos de ambos como inflamación de a microvasculatura e inflamación tubulointerstitial. Asimismo, se han observado discrepancias entre hallazgos moleculares y hallazgos histopatológicos. En estudios previos se han reportado cambios moleculares asociados a ABMR que incluyen la expresión de genes asociados al endotelio cuya expresión varía en estos pacientes con relación a pacientes sin rechazo o TCMR. No obstante, la expresión de estos genes no siempre se corresponde con los hallazgos histopatológicos patognomónicos en ABMR. Adicionalmente, en otros estudios se ha que biopsias clasificadas bajo un mismo diagnóstico, presentan cambios histopatológicos diferentes. Todo esto, pone de manifiesto que el rechazo es sin duda un proceso variable y que, si bien el diagnóstico histopatológico es una guía relevante para el tratamiento y seguimiento del paciente, no es suficiente para comprender a fondo los mecanismos implicados, así como para dar una terapia personalizada al paciente en función de un diagnóstico específico. El abordaje de esta heterogeneidad se ha realizado a partir de la identificación de diferencias moleculares entre los individuos, y a su vez, estas diferencias se han abordado desde las ciencias ómicas, las cuales permiten explorar los cambios que ocurren a nivel genómico, transcriptómico, epigenético, proteómico o metabolómico y que puedan influenciar el desenlace del injerto. Es importante resaltar que la regulación de los cambios en cada uno de esos niveles está determinada, entre otros factores, por condiciones ambientales, lo cual sugiere que cada paciente tendrá un comportamiento molecular diferente respecto a otro (86).

El estudio de la expresión génica se enfoca en los transcritos de RNA de una célula o de un conjunto de células. La expresión génica, hace referencia a la conversión de la información contenida en el ADN en un producto funcional. Según el dogma central de la Biología Molecular, el ADN debe ser transcrito a RNA y este, traducido a proteínas, las cuales fueron históricamente, los productos funcionales generados a partir de los genes. Sin embargo, hoy es aceptado que los transcritos de RNA

también son biológicamente funcionales, sobre todo en procesos de regulación de la expresión génica, sin necesidad de su paso a proteínas. Con base en esto, el abordaje de un fenómeno de interés desde el conjunto de transcritos de RNA en las células en un momento específico, permite conocer como se está dando la expresión de los genes y teniendo en cuenta el rol funcional de dichos transcritos, ya sea como proteínas o como reguladores de la expresión génica, es posible asociarlos a diferentes procesos biológicos asociados a su vez a un fenotipo, mediante el uso de herramientas de análisis.

El estudio de la expresión génica en trasplante renal, ha evolucionado a lo largo de la historia tanto desde el punto de vista de las metodologías implementadas para su abordaje, como de los hallazgos reportados. Uno de los estudios pioneros se publicó en el 2001 por Li y colaboradores, y fue liderado por Suthanthiran. En este estudio la metodología implementada fue la qRT-PCR, y el hallazgo más relevante fue la identificación de cambios en los niveles de moléculas como perforina y granzima B en orina de pacientes con rechazo agudo. La relevancia de este hallazgo, se basó en la asociación entre los hallazgos y la respuesta efectora en el rechazo agudo, en el que la respuesta celular fue quizás la predominante, lo cual permitió observar un incremento en moléculas relacionadas con una respuesta citotóxica. No obstante, aunque los hallazgos fueron relevantes y aplicables al grupo de pacientes del estudio, no fueron reproducibles en otras poblaciones. Posteriormente, estas mismas moléculas fueron identificadas en sangre periférica de pacientes trasplantados en otra población y a partir de los hallazgos, los autores concluyeron que podían ser relevantes en la identificación de rechazo agudo en sus primeras etapas y para el monitoreo de pacientes con riesgo de rechazo agudo. Particularmente, en un estudio publicado posteriormente y en el que se evaluaron los niveles en orina de perforina, y adicionalmente, los niveles de FOXP3, se observó que los transcritos de este último estaban igualmente incrementado en pacientes con rechazo agudo. Estos hallazgos causaron revuelo, en parte, porque la molécula FOXP3 es incrementada en células Tregs por lo que su incremento, en función de los mecanismos efectores, era más probable en pacientes con función estable del injerto (87–89).

Aunque la qRT-PCR es una herramienta de gran utilidad y con buena sensibilidad, su principal limitación es que permite explorar un número específico y reducido de genes. Con el advenimiento de nuevas metodologías y en aras de ampliar la exploración de nuevas moléculas candidatas asociadas al rechazo y con potencial utilidad clínica, se comenzaron a implementar los microarreglos, los cuales, si bien requieren del diseño de sondas específicas complementarias a los genes de interés, permiten abordar un mayor número de moléculas.

En estudios realizados por Halloran en 2014, se reportaron los panoramas moleculares asociados al ABMR y TCMR en cohortes de pacientes de exploración y cohortes de validación, mediante la

implementación de microarreglos en muestras de tejido renal obtenidas por biopsia. Ya que los resultados de los microarreglos permiten realizar análisis más amplios, por su mayor dimensionalidad en relación con la qRT-PCR, los hallazgos de estos estudios fueron muy significativos y aportaron información, no solo de las moléculas implicadas, sino también de los mecanismos que podrían estar gobernando uno u otro desenlace. Dentro del panorama de genes asociados a TMCR, dentro de las moléculas con mayor nivel de expresión se encontraron CTLA-4 y ligandos de PD1. Al respecto, los autores discutieron que al microambiente proinflamatorio se sobrepone la generación de un microambiente regulador con el objetivo de disminuir los efectos de la inflamación sobre el injerto, lo cual, de alguna manera, podría estar asociado al incremento en FOXP3 en los hallazgos de Suthanthiran. Por su parte, el panorama molecular en ABMR se asoció a un incremento en la expresión de genes, que funcionalmente se asociaron a la citotoxicidad mediada por anticuerpos de células T por unión al receptor CD16a (72,90).

### **1.7 Expresión génica mediante secuenciación de RNA**

La evolución de los estudios transcripcionales en trasplante renal es continua, y actualmente metodologías de secuenciación de próxima generación (NGS) se han superpuesto a los microarreglos por la disminución en los costos para su ejecución y porque la secuenciación del transcriptoma completo permite tener acceso a más información que el panel de sondas implementado en los microarreglos.

Para el estudio transcripcional y de la expresión génica mediante NGS, se ha propuesto la secuenciación de RNA (RNA Seq), ya sea *bulk*-RNA Seq o *single cell*-RNA Seq. Esta es una herramienta versátil que permite, entre otras cosas, explorar nuevos genes, patrones de *splicing* o identificar genes diferencialmente expresados entre dos o más condiciones.

El principio del RNA-seq se basa en la identificación de la secuencia de nucleótidos que conforman el transcriptoma de una célula o un conjunto celular en un momento específico. Para esto, se cuenta con diferentes procesos y metodologías que se dividen típicamente en fase húmeda y fase seca. La fase húmeda inicia con la obtención de la matriz biológica bajo condiciones que mantengan estables los ácidos nucleicos, es decir, se debe obtener bajo condiciones que reduzcan el riesgo de contaminación con enzimas nucleasas, y de condiciones de temperatura que inhiban la acción de estas enzimas, es decir, refrigeración o congelación. Posteriormente, se implementan reactivos basados en detergentes líticos y sales caotrópicas como el isotiocianato de guanidina para la disrupción de membranas celulares y la separación del RNA de otras biomoléculas como ADN o proteínas. Esto

requiere además del uso de solventes orgánicos o de métodos basados en membranas de sílica que permitan la separación o fijación, respectivamente, del RNA. Los alcoholes a alta concentración, como el isopropanol o el etanol, permiten precipitar el RNA en presencia de sales como el acetato de sodio. Posteriormente el RNA es recuperado y eluido en agua libre de nucleasas. A partir de este, se preparan librerías de ADN copia (cDNA), el cual es el insumo para la secuenciación. La preparación de librerías se basa en la fragmentación del RNA por métodos enzimáticos o mecánicos, conversión a cDNA, así como en el enriquecimiento de los transcritos de interés. Para esto, se han desarrollado métodos de deleción de RNA ribosomal, o de selección positiva mediante la captación de RNAs mensajeros con perlas con colas de poli-T. Las librerías de cDNA son posteriormente amplificadas, e indexadas mediante el uso de códigos de barras, los cuales corresponden a secuencias de oligonucleótidos que se adhieren a los extremos de los fragmentos de cDNA y que funcionan a su vez como identificadores de cada librería en los casos en los que se hace multiplexación, y como cebadores para el proceso de secuenciación por síntesis, en el cual se basan las plataformas más comúnmente usadas.

En la secuenciación se generan datos masivos correspondientes a las lecturas (reads) de los fragmentos iniciales y que se convierten en el *input* para la fase seca. En esta, los datos en formato FASTQ son tratados mediante un análisis bioinformático primario, en el que se limpian las secuencias, para remover los códigos de barras y otros elementos “basura”. Asimismo, se realiza un ensamblaje, el cual puede ser *de novo* o con la implementación de un genoma o un transcriptoma de referencia frente al que se mapean o alinean los reads obtenidos y que permiten reconstruir la información de cada librería. Este alineamiento no permite solo el ensamblaje, sino que además es el punto de partida para identificar el número de reads alineados en cada región, y tras un proceso de anotación, identificar a cuáles genes corresponden dichas regiones. Este número de reads es entonces el número de cuentas que tras los análisis de normalización constituyen la base para la identificación de diferencias en la expresión génica diferencial.

Del mapeo se obtiene una tabla de cuentas crudas con las que se realizan los análisis bioinformáticos subsecuentes. En primer lugar, las cuentas son normalizadas, y los genes con cuentas por debajo de un umbral establecido en más del 50% de las librerías son eliminados del análisis. Con las cuentas normalizadas se realizan las pruebas estadísticas de múltiples hipótesis a partir de las cuales se identifican los genes diferencialmente expresados (DEGs). Los DEGs pueden ser el resultado final del análisis, o pueden a su vez ser el insumo para análisis funcionales que permiten identificar la ontología génica de grupos de genes, y asociarlos a diferentes categorías funcionales que son finalmente asociadas al fenómeno de estudio (91–98).

## **1.8 Antecedentes de estudios mediante NGS implementando diferentes matrices biológicas de relevancia en el trasplante renal**

Junto con las diferentes metodologías empleadas para el estudio de la expresión génica (qRT-PCR, microarreglos) y los estudios realizados hasta el momento mediante NGS, se han empleado como muestras de estudio principalmente biopsia, sangre periférica y orina. La elección de dichas muestras obedece a que son matrices en contacto directo con los tejidos, células y moléculas implicados en la respuesta efectora frente al injerto. Los estudios se enfocan principalmente en la identificación de genes diferencialmente expresados en una de estas muestras con diferentes objetivos, dentro de los que destacan la identificación de potenciales biomarcadores asociados al rechazo o a la tolerancia, y la identificación de procesos enriquecidos asociados a los genes que permitan explicar la respuesta inmune efectora, procesos metabólicos o vías de señalización relevantes.

La mayoría de los estudios reportados en trasplante renal se han realizado implementando muestras de biopsia ya que representa una matriz para hacer una confirmación directa de la sospecha de rechazo u otro evento adverso que pueda sufrir el injerto, y al mismo tiempo, de marcadores asociados a los mecanismos implicados en dichos eventos. Un estudio de gran importancia realizado con muestras de biopsia fue publicado por Halloran y colaboradores en 2009 en el que se reportaron 119 transcritos asociados al endotelio, particularmente regulados por la acción de inmunoglobulinas en rechazo mediado por anticuerpos. Dichos transcritos fueron denominados ENDATS (de endothelial associated transcripts) y se identificaron en biopsia de pacientes trasplantados mediante microarreglos. Posteriormente, y junto con otros paneles de moléculas también reguladas en pacientes con rechazo, fueron incluidos como parte de la clasificación de Banff (99,100). Sin embargo, y como ya se ha mencionado, tener las muestras de biopsia como una opción para la investigación básica y para su aplicación en la rutina en la clínica, es una opción poco viable por los riesgos que representa este procedimiento para los pacientes y por lo dispendioso del proceso mismo. Es por esto que la identificación en muestras menos invasivas como sangre periférica y orina han cobrado gran relevancia, y en orina, particularmente orina por su estrecho contacto con el tejido renal.

Diferentes estudios multicéntricos han captado muestras de sangre periférica de pacientes trasplantados, así como datos de transcriptomas secuenciados y cargados en repositorios web y se han enfocado en la identificación de marcadores moleculares que puedan ser diagnósticos de los desenlaces del injerto renal. En un estudio de Christakoudi de 2019 se identificó una firma transcripcional en rechazo mediado por células T mediante RT-PCR. El estudio fue realizado con muestras de 248 pacientes y se evaluaron 22 genes previamente reportados en la literatura. Con los ensayos de validación identificaron una firma asociada a TCMR conformada por genes como *IFNG*,

*IP-10*, *ITGA4*, *MARCH8*, *RORc*, *SEMA7A* y *WDR40A* (101). En otro estudio se tomaron 3 set de datos consignados en la base datos OMNIBUS y obtenidos de RNA Seq. A partir de estos datos se realizó una deconvolución y se identificaron células potencialmente asociadas a esos genes y que por ende pudieran tener un impacto en el desenlace del injerto. Dentro de estos, se identificaron un enriquecimiento de monocitos en pacientes con rechazo, así como la regulación positiva de *ISG15* en estos mismos pacientes (102).

En orina se han realizado diferentes estudios mediante RNA Seq y llamativamente uno de los hallazgos comunes a estos es la identificación de la regulación positiva de genes asociados a la migración celular. En un estudio de 2020, se identificó la expresión de 4 quimiocinas en orinas de pacientes con TCMR las cuales fueron *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* y *CCL5*, y de 6 asociadas a rechazo mediado por anticuerpos: *CXCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CCL2*, *CCL5* y *CCL18*. En ambos casos, el hallazgo se hizo respecto a pacientes sin evidencia de rechazo (103). En otro estudio de 2021 se realizó también un estudio con muestras de orina de pacientes con rechazo agudo y se valoraron mediante RT-PCR genes como *CXCL9*, *C1QB*, *LCK*, *CD3ε*, *FOXP3*, *TIM-3*, *IP-10*, *PSMB9* y *FAM26F*, los cuales estuvieron incrementados en pacientes con rechazo agudo con relación a individuos con función estable del injerto.

Todo lo anterior sugiere que, a la fecha, ha habido un gran avance e interés en la identificación de biomarcadores asociados al desenlace del injerto renal, empleando metodologías de nueva generación y muestras no invasivas. No obstante, no se ha reportado un perfil molecular específico para cada desenlace, ya sea rechazo o aceptación del injerto.

Con este estudio se buscó hacer una integración de las diferentes matrices biológicas de relevancia en el trasplante renal, así como el uso de herramientas de nueva generación como el RNA Seq. De esta manera, se trató de hacer un abordaje más holístico, para explorar los perfiles moleculares en el rechazo agudo, el rechazo crónico y la aceptación del injerto en un mismo momento y con el fin de asociar los hallazgos entre las diferentes muestras y en los diferentes desenlaces. No obstante, es necesario precisar que al tratarse de un estudio exploratorio los hallazgos aquí descritos en función de las diferentes comparaciones establecidas, están sujetos a una validación posterior con un mayor número de pacientes y empleando metodologías alternas.

## 1.9 Referencias

1. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3.
2. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *Lancet [Internet].* 2021;398(10302):786–802. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00519-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00519-5)
3. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet [Internet].* 2017;389(10075):1238–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
4. Kazancioğlu R. Risk factors for chronic kidney disease: An update. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(4):368–71.
5. Burton JO, Corbett RW, Kalra PA, Vas P, Yiu V, Chrysochou C, et al. Recent advances in treatment of haemodialysis. *J R Soc Med.* 2021;114(1):30–7.
6. Dąbrowska-Bender M, Dykowska G, Żuk et al. The impact on quality of life of dialysis patients with renal insufficiency. *Patient Preference and Adherence. Patient Preference and Adherence [revista en Internet]* 2018 [acceso 11 julio 2020]; 12(1):577-583. *Patient Preference Adherence [Internet].* 2018;12:577–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5916456/pdf/ppa-12-577.pdf>
7. Vadakedath S, Kandi V. Dialysis: A Review of the Mechanisms Underlying Complications in the Management of Chronic Renal Failure. *Cureus.* 2017;9(8).
8. Himmelfarb J, Vanholder R, Mehrotra R, Tonelli M. The current and future landscape of dialysis. *Nat Rev Nephrol [Internet].* 2020;16(10):573–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-020-0315-4>
9. Grahl J. Review Article. *Int Rev Appl Econ.* 2003;17(1):121–4.
10. Fakhr Yasseri AM, Namdari F, Gooran S, Ahmadi A, Dehghani S, Asadi M, et al. Living versus deceased kidney transplantation: Comparison of complications. *Urol J.* 2021;88(3):185–9.
11. Nemati E, Einollahi B, Pezeshki ML, Porfarziani V, Fattahi MR. Does kidney transplantation with deceased or living donor affect graft survival? *Nephrourol Mon.* 2014;6(4).

12. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(4):1–18.
13. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunol.* 2017;8(MAR):1–16.
14. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: Expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet.* 2009;54(1):15–39.
15. Mutar Mahdi B. Introductory Chapter: Concept of Human Leukocyte Antigen (HLA). *Hum Leukoc Antigen.* 2019;1–8.
16. Cabrales CC, Pinto JA. HLA-Matched Donor-Recipient Combinations and Kidney Transplant Probabilities in a Specific Colombian Population. 2016;14(2):147–60.
17. Wang M, Claesson MH. Chapter 17 Classification of Human Leukocyte Antigen (HLA). 1184:309–17.
18. Süsal C, Döhler B, Ruhstroth A, Morath C, Slavcev A, Fehr T, et al. EBioMedicine Donor-specific antibodies require preactivated immune system to harm renal transplant. 2016;9:366–71.
19. Sharma A, Jorgensen DR, Mehta RB, Sood P. The Clinical Impact of Anti-HLA Donor Specific Antibody Detection Through First Year Screening on Stable Kidney Transplant Recipients. 2022;35(March):1–13.
20. Phillpott M, Daga S, Higgins R, Lowe D, Krishnan N. Dynamic Behaviour of Donor Specific Antibodies in the Early Period Following HLA Incompatible Kidney Transplantation. 2022;35(April):1–12.
21. Frischknecht L, Deng Y, Wehmeier C, Gannage M, Wirthmueller U, Sidler D, et al. The impact of pre-transplant donor specific antibodies on the outcome of kidney transplantation – Data from the Swiss transplant cohort study. 2022;(September):1–16.
22. Manuscript A. Donor Specific Antibodies after Transplantation. 2012;15(7):686–90.
23. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. 2017;1–11.
24. Etxebarria A, Díez-Martín E, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. Role of the Immune System in Renal Transplantation, Types of Response, Technical Approaches and Current

Challenges. *Immuno*. 2022;2(4):548–70.

25. Braza F, Brouard S, Chadban S, Goldstein DR. Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2016;12(5):281–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2016.41>
26. Pontrelli P, Grandaliano G, Van Kooten C. Editorial: Kidney Transplantation and Innate Immunity. *Front Immunol*. 2020;11(October):1–4.
27. Melo Z, Ruiz-pacheco JA, Mendoza-cerpa CA, Ruiz-pacheco JA, Mendoza-cerpa CA, Echavarría R. Immunopathology of Kidney Transplantation Immunopathology of Kidney Transplantation.
28. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. 2014;5(September):1–8.
29. Cucchiari D, Podestà MA, Ponticelli C. The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation. *Nephron* [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 14];132(3):227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26914915>
30. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, Sanders JSF, Pol RA, Struys MMRF, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: Relevant mechanisms in injury and repair. *J Clin Med*. 2020;9(1).
31. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3390–5.
32. Ergin G, Değer SM, Köprü B, Dericü Ü, Arinsoy T. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute allograft rejection in kidney transplantation: A retrospective study. *Turkish J Med Sci*. 2019;49(2):525–30.
33. Bergler T, Jung B, Bourrier F, Kühne L, Banas MC, Rümmele P, et al. Infiltration of Macrophages Correlates with Severity of Allograft Rejection and Outcome in Human Kidney Transplantation. *PLoS One*. 2016;11(6):1–14.
34. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2020;877(November 2019):173090. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
35. Ordikhani F, Pothula V, Sanchez-tarjuelo R, Jordan S, Ochando J. Macrophages in Organ

- Transplantation. 2020;11(November):1–14.
36. Pontrelli P, Rascio F, Castellano G, Grandaliano G, Gesualdo L, Stallone G. The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2020;11(July):1–10.
  37. Ashraf MI, Sarwar A, Kühl AA, Hunger E, Sattler A, Aigner F, et al. Natural Killer Cells Promote Kidney Graft Rejection Independently of Cyclosporine A Therapy. 2019;10(September):1–14.
  38. Beilke JN, Gill RG. *Frontiers in Nephrology : The Varied Faces of Natural Killer Cells in Transplantation — Contributions to Both Allograft Immunity and Tolerance.* 2007;2262–7.
  39. Viklicky O. Complement in Kidney Transplantation. 2017;4(May):1–11.
  40. Qi R, Qin W. Role of Complement System in Kidney Transplantation : Stepping From Animal Models to Clinical Application. 2022;13(February):1–18.
  41. Ferreira VP. Complement system part i – molecular mechanisms of activation and regulation. 2015;6(June):1–30.
  42. Dunkelberger JR, Song W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34–50.
  43. Pavlou EG, Georgatzakou HT, Fortis SP, Tsante KA, Tsantes AG, Nomikou EG, et al. Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease : The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors. 2021;
  44. Stallone G, Pontrelli P, Rascio F, Castellano G, Gesualdo L, Grandaliano G. Coagulation and Fibrinolysis in Kidney Graft Rejection. *Front Immunol.* 2020;11(August):1–9.
  45. Shao Y, Saredy J, Yang WY, Sun Y, Lu Y, Saaoud F, et al. HHS Public Access. 2021;40(6):1–26.
  46. Kummer L, Zaradzki M, Vijayan V, Arif R, Weigand MA, Immenschuh S, et al. Vascular Signaling in Allogenic Solid Organ Transplantation – The Role of Endothelial Cells. 2020;11(May).
  47. Cells E, Allograft IN. NIH Public Access. 2009;86(10):1340–8.
  48. Trimm E, Red-horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. 0123456789.

49. Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans. 2020;7(October):1–15.
50. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen. 2018;9(July).
51. Hughes AD, Zhao D, Dai H, Abou-daya KI, Tieu R, Rammal R, et al. Cross-dressed dendritic cells sustain effector T cell responses in islet and kidney allografts. 2020;130(1):287–94.
52. Lin J, Wang H, Liu C, Cheng A, Deng Q, Zhu H. Dendritic Cells : Versatile Players in Renal Transplantation. 2021;12(May):1–15.
53. Macri C, Pang ES, Patton T, Keeffe MO. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.009>
54. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations [Internet]. 1st ed. *Immunobiology of Dendritic Cells Part A*. Elsevier Inc.; 2019. 1–68 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.004>
55. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition Pathways in Transplant Rejection and Tolerance. 2013;96(8):681–8.
56. Bousso P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node : lessons from the movies. 2008;8(SePTeMbeR):675–84.
57. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. 2018;9(June):1–10.
58. Smith-garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. NIH Public Access. 2010;591–619.
59. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(November). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
60. Boardman DA, Jacob J, Smyth LA, Lombardi G, Lechler RI. What Is Direct Allorecognition? *Curr Transplant reports* [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 2];3(4):275–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909647>
61. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thaunat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. 2022;101(4):692–710.
62. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in

Solid Organ Transplantation. 2018;9(November):1–14.

63. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Europe PMC Funders Group Pathways of major histocompatibility complex allorecognition Europe PMC Funders Author Manuscripts Indirect allorecognition The indirect pathway refers to recognition of processed peptides of allogeneic. 2013;13(4):1–12.
64. Eleftheriadis T, Pissas G, Crespo M, Nikolaou E, Liakopoulos V. A Role for Human Renal Tubular Epithelial Cells in Direct Allo-Recognition by CD4 + T-cells and the Effect of. 2021;
65. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. 2016.
66. Manuscript A. NIH Public Access. 2013;9(4):655–6.
67. Firl DJ, Benichou G, Kim JI, Yeh H, Hoogduijn MJ, Yeh H. A Paradigm Shift on the Question of B Cells in Transplantation ? Recent Insights on Regulating the Alloresponse. 2017;8(February):8–12.
68. Schmitz R, Fitch ZW, Schroder PM, Choi AY, Jackson AM, Stuart J. B cells in transplant tolerance and rejection : friends or foes ? 2019;
69. Karahan GE, Claas FHI, Heidt S. B Cell immunity in Solid Organ Transplantation. 2017;7(January):1–11.
70. Chong AS. Mechanisms of organ transplant injury mediated by B cells and antibodies : Implications for antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* [Internet]. 2020;20(December 2019):23–32. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajt.15844>
71. Dijke EI, Platt JL, Blair P, Clatworthy MR, Patel JK, Kfoury AG, et al. HHS Public Access. 2016;35(6):704–10.
72. Venner JM, Famulski KS, Badr D. Molecular Landscape of T Cell – Mediated Rejection in Human Kidney Transplants : Prominence of CTLA4 and PD Ligands. 2014;2565–76.
73. Aziz F, Parajuli S, Garg N, Mohamed M, Zhong W. How Should Acute T-cell Mediated Rejection of Kidney Transplants Be Treated : Importance of Follow-up Biopsy. 2022;1–8.
74. Pathophysiology AR. R EVIEW T HERAPEUTICS Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation : Options. 2014;

75. Singh N, Pirsch J, Samaniego M. Antibody-mediated rejection : treatment alternatives and outcomes ☆. *Transplant Rev [Internet]*. 2009;23(1):34–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trre.2008.08.004>
76. Kojc N. Antibody Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. 1960;1–26.
77. Jeong HJ. Diagnosis of renal transplant rejection : Banff classification and beyond. 2020;39(1):17–31.
78. Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15(3):430–8.
79. Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation : A Review. 2012;2012.
80. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial Gene Expression in Kidney Transplants with Alloantibody Indicates Antibody-Mediated Damage Despite Lack of C4d Staining. 2009;2312–23.
81. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. Atlas of Renal Pathology II AJKD Atlas of Renal Pathology : Acute T-Cell – Mediated Rejection Atlas of Renal Pathology II. *Am J Kidney Dis [Internet]*. 67(5):e29–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.03.004>
82. Martin-moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. 2018;25(23):1–5.
83. Hu M, Wang YM, Wang Y, Zhang GY, Zheng G, Yi S, et al. and transplantation. *Kidney Int [Internet]*. 2016;90(3):502–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.022>
84. Ew REVI, Cle A. Clinical and Experimental Immunology REVIEW SERIES : IMMUNE TOLERANCE IN TRANSPLANTATION Series Editor : Thomas Wekerle Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers REVIEW SERIES : IMMUNE TOLERANCE IN TRANSPLANTATION. 2017;138–57.
85. Pullen LC. Tolerance Induction in Kidney. *Am J Transplant [Internet]*. 18(6):1297–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajt.14903>
86. Stapleton CP, Conlon PJ. Using omics to explore complications of kidney transplantation. :251–62.

87. England TN. NUMBER 13 BY MEASUREMENT OF MESSENGER RNA FOR PERFORIN AND GRANZYME B IN URINE. 2001;344(13):947–54.
88. Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, et al. Messenger RNA for. 2005;2342–51.
89. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Su C. Serial Peripheral Blood Perforin and Granzyme B Gene Expression Measurements for Prediction of Acute Rejection in Kidney Graft Recipients. 2003;1121–7.
90. Venner JM, Hidalgo LG, Famulski KS, Chang J, Halloran PF. The Molecular Landscape of Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection: Evidence for NK Involvement Through CD16a Fc Receptors. *Am J Transplant* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Aug 10];15(5):1336–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25787894>
91. Shi H, Bressan R. RNA Extraction. 323:345–8.
92. Rio DC, Jr MA, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA Using TRIzol ( TRI Reagent ). 2019;2010(6):1–4.
93. Lee R, Ambros VR, Freedman JE. SC. *Anal Biochem* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.02.019>
94. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Passarelli M, Machado UF, Lin CJ, et al. Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2016;462:158–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.018>
95. Stark R, Grzelak M. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet* [Internet]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>
96. Cseke LJ, Larka L. DNA Sequencing and Analysis. *Handb Mol Cell Methods Biol Med Third Ed.* 2016;2015(11):141–64.
97. Hematol J, Hong M, Tao S, Zhang L, Diao LT, Huang X, et al. RNA sequencing : new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020;1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01005-x>
98. Haque A, Engel J, Teichmann SA, Lönnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. 2017;1–12.
99. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene

expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2312–23.

100. Loupy A, Mengel M, Haas M. Thirty years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: the past, present, and future of kidney transplant diagnostics. *Kidney Int [Internet]*. 2022;101(4):678–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.11.028>
101. Christakoudi S, Runglall M, Mobillo P, Tsui TL, Duff C, Domingo-Vila C, et al. Development of a multivariable gene-expression signature targeting T-cell-mediated rejection in peripheral blood of kidney transplant recipients validated in cross-sectional and longitudinal samples. *EBioMedicine*. 2019;41:571–83.
102. Zhang Z, Qin Y, Wang Y, Li S, Hu X. Integrated analysis of cell-specific gene expression in peripheral blood using ISG15 as a marker of rejection in kidney transplantation. *Front Immunol*. 2023;14(March):1–13.
103. Verma A, Muthukumar T, Yang H, Lubetzky M, Cassidy MF, Lee JR, et al. Urinary cell transcriptomics and acute rejection in human kidney allografts. *JCI Insight*. 2020;5(4):1–16.

**CAPÍTULO II: OPTIMIZATION OF AN RNA ISOLATION  
PROTOCOL FROM HUMAN URINARY SEDIMENT AND OTHER  
LIMITING SAMPLES FOR RNA SEQUENCING.**

## 2 CAPÍTULO II: OPTIMIZATION OF AN RNA ISOLATION PROTOCOL FROM HUMAN URINARY SEDIMENT AND OTHER LIMITING SAMPLES FOR RNA SEQUENCING.

Carlos Carmona<sup>1</sup>, Cristiam Álvarez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Cl. 62 #52-59, Medellín, Colombia.

**Corresponding author email:** [carlos.carmonaa@udea.edu.co](mailto:carlos.carmonaa@udea.edu.co)

### 2.1 Abstract

**Background and objectives:** Renal biopsy is the gold standard for diagnosis of transplant rejection. However, biopsy is an invasive procedure that may adversely affect the graft. Identification of differentially expressed genes in urine by RNA Sequencing (RNA-Seq) has been proposed as a noninvasive alternative approach. Nevertheless, RNA extraction from urinary sediment is challenging due to the high rate of RNA degradation. This work aimed to optimize a protocol for urinary RNA extraction (Monteiro et al., 2016), include the DV200 index as an integrity metric and subsequently use them in different biological matrixes to obtain RNA suitable for RNA-Seq.

**Materials and Methods:** An RNA extraction protocol involving TriReagent, glycogen, and sodium acetate, was used to extract RNA from urine, peripheral blood, and renal biopsy samples from kidney transplant patients. RNA concentration and integrity were measured. cDNA libraries were generated, sequenced, and then evaluated by primary analysis to assess the functionality of the isolated RNA.

**Results:** RNA concentration and Integrity were suitable for RNA-Seq. In addition, sequenced libraries were clustered according to the sample type.

**Conclusions:** The optimized protocol for RNA extraction comprising the DV200 index helped isolate urinary RNA with the quality required for next-generation sequencing. This could represent an advantageous alternative for the diagnosis and prognosis of renal allograft rejection in transplant patients.

**Keywords:** Kidney transplantation, RNA isolation, RNA Sequencing, Biomarkers.

**Abbreviations:** RNA, ribonucleic acid; DV200, percentage of transcripts with length higher than 200 nucleotides; RNA-Seq, RNA Sequencing; cDNA, DNA complementary.

**Funding:** This work was supported by the Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias), Colombia and the Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

## 2.2 Introduction

Research on gene expression, particularly the differential expression of many genes under various environmental, pathological, or experimental conditions, provides insight into the relationships between genotype and phenotype [1]. In addition, functional analysis of transcriptional data allows the identification of possible molecular and metabolic effects at the cellular level as well as their correlation with a disease or condition of interest [2]. Gene expression can be studied using several tools, such as RT-qPCR, microarrays, and next-generation RNA sequencing (NGS) (RNA-seq). The latter is a highly sensitive tool and facilitates a more global exploration of the transcriptome, as it does not rely on probes to identify specific genes [3]. In addition, microRNA (miRNA) sequencing by RNA-seq is also helpful in identifying some post-transcriptional regulatory mechanisms [4]. Because RNA-seq methodology at the bulk and single-cell level is rigorous, the biological samples to be analyzed must fulfill several quality parameters [5], [6] to obtain results that lead to reliable biological information. These parameters include an optimal initial RNA concentration, low levels of contaminating molecules arising during the nucleic acid extraction process, and a high level of integrity [7]. RNA integrity is evaluated by parameters such as the RNA integrity number (RIN) and the DV200 index. The RIN, the most commonly used metric, is a software algorithm that generates an evaluation scale ranging from 1 (degraded) to 10 (intact) [8]. The DV200 index corresponds to the percentage of transcripts with a size larger than 200 nucleotides. DV200 values above 30% indicate high-quality RNA; the higher the DV200, the higher the integrity of the RNA [9], [10].

Renal allograft transplantation poses an immunological challenge to recipients because their immune systems may respond to multiple alloantigens in the donor tissue [11]–[13]. Therefore, the recipient's cellular metabolism must be adjusted by changes linked to modifications in gene regulation. These changes directly impact the graft since they can favor its lasting function without significant inflammatory changes or, on the contrary, cause its rejection with consequent damage or even loss of the graft [14]. Therefore, it is necessary to evaluate the changes in gene expression in the context of renal transplantation and the associated functional processes to understand the immune mechanisms and signaling pathways triggered after transplantation, which may influence graft acceptance or rejection.

The gold standard for diagnosing transplant rejection is the histopathological study of an allograft biopsy. However, this invasive procedure compromises organ function and involves a high error rate due to observer subjectivity and inter-observer variability [15]. Therefore, it is necessary to develop alternative sensitive and noninvasive diagnostic and prognostic tools for renal allograft rejection and to search for new biomarkers of the process. Biomarkers are objectively measured biological characteristics that indicate the existence of normal or abnormal biological processes, pathological conditions, or pharmacological or therapy-associated responses. Currently, there is great interest in the search for biomarkers of allograft rejection [16], [17]. For example, the transcriptome of a kidney transplant patient becomes a valuable tool. Indeed, the assessment of variables such as the abundance and differential expression level of genes associated with renal allograft outcomes might be used to follow renal function, predict allograft rejection, and even, the possible outcome of an allograft before surgery. Thus, RNA profiling of samples collected by noninvasive procedures, such as urine, opens the door to assessing kidney function and clinical outcomes after renal allografting. Given its direct contact with the transplanted kidney, urine becomes a carrier matrix for transcripts associated with the biological processes of the organ. However, optimal RNA isolation from urinary sediment is challenging due to its high RNase content and RNA lability. These issues hinder the implementation of urine as a sample for bulk sequencing methodologies. The present work describes the optimization of an RNA isolation procedure from urinary sediment for subsequent sequencing using NGS technology.

The protocol was adapted from the procedure described by Monteiro *et al.* [18] for isolating RNA from urinary sediment. The optimized protocol was used to isolate RNA not only from urine but also from peripheral blood and renal tissue samples from healthy controls and kidney transplant patients.

The protocol intended to obtain higher RNA yields than silica column-based methodologies from limiting samples such as urine. For this purpose, sodium acetate and glycogen were used to precipitate higher amounts of nucleic acid. Sodium acetate helps to neutralize the negative charges of the phosphate groups of RNA, thus decreasing its solubility in aqueous solution. In turn, due to its ribose-like structure, glycogen interacts with RNA without causing any alteration, thus increasing the molecular weight of RNA and favoring its enrichment and precipitation. The isolation of RNA from urine, blood, and renal biopsy of kidney transplant patients, using the optimized extraction protocol, is described below, as well as the implementation of the RNA extracts obtained for NGS sequencing. The parameters used to assess the quality of nucleic acids throughout the process are highlighted. In particular, the quantity and integrity of RNA extracts, the derived cDNA libraries and the sequencing reads were evaluated. In addition, basic bioinformatics analyses were performed to assess the

functionality of the isolated RNA according to the optimized protocol, which demonstrated its suitability for sequencing by the NGS technology.

## **2.3 Materials and methods**

The protocol was optimized to extract total RNA from limiting samples such as urine but also from peripheral blood and biopsies. RNA extracts were then used for RNA Seq.

### **2.3.1 Patients and study groups**

Different biological samples were collected from kidney transplant and non-transplant patients. The group of transplanted individuals included patients with histopathological evidence of acute rejection (AcR, n = 4), chronic rejection (Chr, n = 3), and without rejection, with long-term graft survival (Sta, n = 5). The group of non-transplanted individuals included patients on hemodialysis, registered on the kidney transplant waiting list (Hd, n = 4), and healthy individuals without chronic kidney disease or other conditions compromising renal function (HC, n = 2). All patients signed an informed consent approved by the Ethics Committee from the Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

### **2.3.2 Samples**

**Peripheral blood:** EDTA-anticoagulated whole blood samples (4 mL) were drawn from all patients and controls. The samples from patients in the AcR group were taken at the time of biopsy on suspicion of rejection and three weeks after administration of rejection reversal therapy (AcRpt).

**Renal biopsy:** Renal biopsies (two cylinders of tissue) were taken from patients in the AcR group on suspicion of rejection, for histopathological diagnosis, and from those in the ChR group. The samples were immediately transferred to 1 mL of TriReagent (#93289, Sigma-Aldrich) and transported in liquid nitrogen to the laboratory. No renal biopsies were taken from other patients or healthy controls.

**Urine:** Urine samples (200 mL) were collected from all patients except those on hemodialysis. Samples were collected in conic tubes of 50mL and placed in liquid nitrogen until processing. The samples from patients in the AcR group were collected at the time of biopsy on suspicion of rejection and three weeks after administration of rejection reversal therapy (AcRpt).

### 2.3.3 Sample processing for RNA extraction

All samples were processed immediately after collection.

**Peripheral blood:** An aliquot of the blood sample of approximately 1.5 mL, containing about  $16 \times 10^6$  leukocytes, was mixed with Buffer EL (#79217, Qiagen) (1:5), vortexed vigorously for 20 s, and centrifuged at  $400 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . After, the supernatant was discarded, and the pellet was homogenized in EL Buffer (1:2) and centrifuged again at  $400 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The pellet was resuspended in 1 mL of Tri Reagent and vortexed until the cells were completely lysed.

**Renal tissue:** Renal biopsies were completely disaggregated in TriReagent in a rotary homogenizer (Biobase BK-HG Series, China) at 8000 rpm at  $4^\circ\text{C}$ . The whole tissue homogenate volume was transferred to a new 1.5 ml tube and centrifuged at 12,000 rpm at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min to remove cell debris. The supernatant was transferred to a new 1.5 mL tube.

**Urine:** Urine samples were centrifuged at  $3000 \times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The sediment ( $\sim 200 \mu\text{L}$ ) was suspended in 1 mL of TriReagent and  $2 \mu\text{L}$  of glycogen (#R0551, Thermo Scientific) and vortexed until complete lysis.

Total RNA was extracted from all samples as follows. The biological matrix (blood, urine, renal biopsy) previously treated with TriReagent was mixed with  $200 \mu\text{L}$  of chloroform and incubated at room temperature for 3 min. It was then vortexed for 15 s and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . After, the aqueous phase was transferred to a 1.5 mL tube, mixed with an equal volume of prechilled absolute isopropanol and  $100 \mu\text{L}$  of 3M sodium acetate (pH = 5.5), incubated at  $-20^\circ\text{C}$  for 30 min, and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 15 min. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. After removing the supernatant, the RNA was resuspended in  $50 \mu\text{L}$  of nuclease-free water and frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis.

### 2.3.4 RNA quantification and integrity

The quality of the RNA extracted according to the optimized protocol was evaluated by quantifying its concentration (ng/ $\mu\text{L}$ ) and assessing its integrity using the DV200 index. This index corresponds to the percentage of transcripts with a size equal to or greater than 200 nucleotides. It has been previously validated for RNA extracted from paraffin-embedded tissues and, in general, for limiting samples due to a high probability of RNA degradation, such as urine. An RNA sample must have a

DV200  $\geq$  30% to be suitable for sequencing. Measures were made using the 4200 TapeStation (Agilent).

### **2.3.5 Generation, quantification, and validation of cDNA libraries**

cDNA libraries were generated at Macrogen Inc., Seoul, South Korea using the SureSelect<sup>XT</sup> RNA Direct Kit (#G7564A, Agilent). This kit has been validated for samples with a high probability of RNA degradation, where DV200 is used as a metric of nucleic acid integrity. The cDNA concentration (ng/ $\mu$ L) and validation of the libraries, according to the average size (bp) of the generated fragments, were determined by automated electrophoresis on a 4200 TapeStation (Agilent).

### **2.3.6 cDNA libraries sequencing and evaluation by the Phred score**

Paired-end sequencing of the cDNA fragments in the libraries was carried out at Macrogen Inc., Seoul, South Korea, on the NovaSeq6000 system (Illumina). Sequencing quality was assessed by the Phred quality (Q) score, which measures the probability of a base being called incorrectly. A Q30 score indicates that the probability of an incorrect base call is 1 in 1000 bases.

### **2.3.7 Primary and secondary bioinformatic analyses**

The functionality of RNA extracts obtained according to the optimized protocol and their suitability for differential expression analysis was assessed by basic bioinformatics approaches, including primary and secondary analyses.

**Primary analysis:** Raw data were cleaned and mapped against the human reference genome assembly GRCh38/hg38 using the Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) software [19]. The counts derived from the mapping were used to construct a table of raw counts for each gene in all sequenced libraries. This table was the input for initial data exploration.

**Secondary analyses:** These analyses were done in R using the EdgeR in RStudio software package [20]. Initially, the table of counts was formatted as necessary, and counts per million (CPM) were calculated; data with counts below 0.5 were excluded. Then, an initial data scan was done using the Multidimensional Scaling (MDS) statistical software. The data were normalized by the calcNormFactors function using the Trimmed Mean of the M-values (TMM) approach, and the table of effective counts was built to perform for further analysis.

## **2.4 Results**

### **2.4.1 RNA concentration and integrity**

The concentration of RNA isolated from the different samples was highly variable. For whole blood samples ( $10 \times 10^6$  leukocytes), the median concentration of RNA extracted was 113.3 ng/ $\mu$ L (23.388 – 249.727 ng/ $\mu$ L) (Table 1, Figure 1A), regardless of the study group. The purity of RNA extracted from all blood samples was adequate except for sample Sta04. This sample did not meet the purity criteria determined by the 260/230 and 260/280 ratios and was discarded. Moreover, all RNA samples isolated from blood showed adequate integrity, as evidenced by a median DV200 of 89.315 (74.66% – 95.35%) (Table 1, Figure 1B).

The amount and integrity of RNA isolated from renal biopsies (two tissue cylinders) were adequate. Specifically, the median RNA concentration was 146.493 ng/ $\mu$ L (50.117 – 318.285 ng/ $\mu$ L), and the median DV200 was 72.68% (65.44% – 85.55%) (Table 2, Figure 2).

Extracting adequate amounts of RNA from urine samples (200 mL) was more challenging, and samples Sta02, Sta04, AcR02, and HC02 had to be discarded from the study (Table 3). The other samples met the quality requirements. The median RNA concentration was 41.0805 ng/ $\mu$ L (8.028 – 594.061 ng/ $\mu$ L), and the median DV200 was 48.66% (31.7% – 81.16%) (Table 3, Figure 3).

Urinary RNA extracts contained nucleic acid of lower concentration and integrity than blood and biopsy RNA extracts. In addition, the RNA concentration in urinary extracts was highly variable among urine samples (Figure 4). Nevertheless, all urinary RNA extracts that met the criteria required for cDNA library generation were included in the subsequent study phases.

All blood, biopsy, and urine RNA extracts that met the required concentration and integrity parameters were used to generate cDNA libraries (Tables 1 – 3).

### **2.4.2 Validation of cDNA libraries**

MacroGen Inc. validated all cDNA libraries generated from blood, biopsy, and urinary RNA extracts. All libraries were suitable for sequencing as evidenced by total cDNA concentration and fragment size (Tables 1 – 3).

### **2.4.3 Quality control analysis of cDNA library sequencing using the Phred score**

The Q30 score of all cDNA libraries was above 90%, except for the library generated from the urinary RNA extract Sta01, with a Q30 of 89.21% (Tables 1 – 3). However, since this value was not

significantly different from that of the libraries generated from other urinary RNA extracts, it was included for further analysis.

#### **2.4.4 Initial data exploration by bioinformatics analysis**

The functionality of the starting RNA, and sequencing of cDNA libraries, was assessed by an initial data scan using primary and secondary bioinformatics analyses. The table of raw counts, built from mapping against the GRCh38/hg38 reference genome, was used as input to the EdgeR in RStudio software package to calculate unnormalized counts per million (CPM). Analysis of the unnormalized CPMs using the MDS software showed the formation of three clusters corresponding to the blood, renal biopsy, and urine samples used for RNA extraction; *i.e.*, transcriptional differences between samples caused the cDNA libraries to cluster according to the type of starting biological matrix (Figure 5). As observed for the starting RNA concentrations and DV200 percentages in the cDNA libraries, the urine libraries showed greater heterogeneity than the blood and renal biopsy libraries. Importantly, analysis of the distances between the different biological matrixes showed that the urine and renal biopsy cDNA libraries were closer to each other than to the peripheral blood one (Figure 5).

Normalization of the blood, urinary, and biopsy cDNA libraries by the EdgeR's TMM function also evidenced higher dispersion data in the urinary cDNA libraries. However, when comparing the unnormalized urinary cDNA libraries with the normalized ones, it was concluded that normalization had been adequate, as well as for the blood and biopsy cDNA libraries (Figure 6).

#### **2.5 Discussion and analyses**

Identifying differentially expressed genes and associated functional pathways could be a helpful tool to understand better the immunological mechanisms responsible for renal allograft acceptance or rejection and discover molecules potentially useful as diagnostic or prognostic biomarkers of such processes. Urine is an ideal sample to evaluate genes differentially expressed in the setting of renal transplantation. Given its close contact with the transplanted kidney, urine is a valuable source of information on the level of regulation of different genes in that organ.

In addition, urine sampling is easy and noninvasive compared to renal biopsy. However, extracting an adequate concentration of high-quality RNA for next-generation sequencing from urine is challenging, given its low cellularity and high nuclease content [21]. Many commercial kits are available to extract high-quality RNA suitable for RT-PCR and sequencing [22]. However, our laboratory still needs to obtain a better RNA yield from urinary sediment. Therefore, we standardized

a protocol to extract RNA from urine samples using TriReagent, sodium acetate, and glycogen. This procedure helped to increase the yield of high-quality RNA suitable for next-generation sequencing.

The procedure for urine RNA extraction optimized in this work was adapted from the protocol published by Monteiro *et al.*, according to which, glycogen, isopropanol, and sodium acetate significantly increased the yield of RNA extraction with Trizol [18]. However, the RIN score evidenced a high rate of RNA degradation, and the nucleic acid could not be used for NGS technology. Therefore, we reviewed alternatives to improve the integrity of urinary RNA, assess its quality, and obtain RNA extracts suitable for sequencing with NGS technology.

The alternative metric chosen to assess RNA integrity was the DV200 index. This parameter was described in 2014 for RNA isolated from paraffin-embedded tissues [10]. However, after the validation of commercial kits to generate cDNA libraries, the DV200 index began to be used to evaluate other specimens with a high probability of RNA degradation. Following the adoption of the DV200 index, the SureSelect<sup>XT</sup> RNA Direct kit was selected to prepare cDNA libraries. According to Illumina technical reports and articles by several authors published after that, the minimum acceptable value of DV200 is considered to be 30%. However, in this case, it is necessary to use a higher amount of RNA, given the direct relationship between DV200 and the amount of nucleic acid [23]. Other studies have also reported that the DV200 index is superior to the RIN score, especially for problematic specimens with a higher probability of nucleic acid degradation [10].

The urinary, blood, and renal biopsy RNA extracts had DV200 values above 30%, indicating they were suitable for cDNA library preparation. Of note, DV200 values of the urinary RNA extracts were lower and showed greater variability than the blood or renal biopsy RNA extracts.

After cDNA library sequencing, base calling quality was evaluated with the Phred (Q) score. The NovaSeq6000 system sequences by synthesis, so when the new DNA strands are generated, base calling errors can impact sequencing and lead to data analysis biases. A Q30 score implies a base call accuracy of 99.9%, *i.e.*, a probability of error of 1 in 1000 bases. Therefore, high Q30 values indicate that the base-calling process during sequencing is highly accurate [24]. In the present work, 90% or more of the sequencing reads from cDNA libraries derived from urinary, peripheral blood, and renal biopsy RNA extracts achieved the Q30 score.

After completing the quality control analyses, the transcriptional behavior of the libraries was evaluated globally by basic bioinformatics approaches. The analyses showed that the libraries derived from urinary, blood, and renal biopsy RNA extracts clustered according to the biological matrix,

supporting the consistency of data. The library data were then normalized by TMM so that the homogenized counts could be subjected to differential gene expression analysis to identify some post-transcriptional regulatory mechanisms associated with miRNAs and further functional analyses.

## 2.6 Conclusion

The RNA extraction protocol here described proved to be suitable for generating high-quality cDNA libraries and getting correct sequences for bioinformatic analysis of differential gene expression in blood, renal biopsy, and urine samples. Furthermore, this optimized protocol supports the implementation of urine as an RNA source for NGS in renal transplantation research. Finally, the protocol for RNA extraction using TriReagent, glycogen, and sodium acetate and adopting the DV200 index as a metric of RNA integrity may also help isolate high-quality RNA for NGS technology from other limiting specimens.

## 2.7 References

- [1] E. B. Josephs, “Gene expression links genotype and phenotype during rapid adaptation,” *Mol. Ecol.*, vol. 30, no. 1, pp. 30–32, 2021, doi: 10.1111/mec.15729.
- [2] C. L. Hsu, H. F. Juan, and H. C. Huang, “Functional Analysis and Characterization of Differential Coexpression Networks,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1038/srep13295.
- [3] W. Zhang *et al.*, “Comparison of RNA-seq and microarray-based models for clinical endpoint prediction,” *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0694-1.
- [4] S. Benesova, M. Kubista, and L. Valihrach, “Small rna-sequencing: Approaches and considerations for mirna analysis,” *Diagnostics*, vol. 11, no. 6, pp. 1–19, 2021, doi: 10.3390/diagnostics11060964.
- [5] L. J. Cseke and L. Larka, “DNA Sequencing and Analysis,” *Handb. Mol. Cell. Methods Biol. Med. Third Ed.*, vol. 2015, no. 11, pp. 141–164, 2016, doi: 10.1201/b11351-11.
- [6] A. Haque, J. Engel, S. A. Teichmann, and T. Lönnberg, “A practical guide to single-cell RNA- sequencing for biomedical research and clinical applications,” pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s13073-017-0467-4.

- [7] I. Gallego Romero, A. A. Pai, J. Tung, and Y. Gilad, "RNA-seq: Impact of RNA degradation on transcript quantification," *BMC Biol.*, vol. 12, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/1741-7007-12-42.
- [8] A. Schroeder *et al.*, "The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements," *BMC Mol. Biol.*, vol. 7, pp. 1–14, 2006, doi: 10.1186/1471-2199-7-3.
- [9] B. Lee *et al.*, "Integrated RNA and metabolite profiling of urine liquid biopsies for prostate cancer biomarker discovery," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60616-z.
- [10] T. Matsubara *et al.*, "DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing," *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/9349132.
- [11] A. Bharat and T. Mohanakumar, "Allopeptides and the alloimmune response," *Cell. Immunol.*, vol. 248, no. 1, pp. 31–43, 2007, doi: 10.1016/j.cellimm.2007.03.010.
- [12] C. A. Farrar, J. W. Kupiec-Weglinski, and S. H. Sacks, "The innate immune system and transplantation," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 10, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a015479.
- [13] M. H. Ravindranath, F. El Hilali, and E. J. Filippone, "The Impact of Inflammation on the Immune Responses to Transplantation: Tolerance or Rejection?," *Front. Immunol.*, vol. 12, no. November, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.667834.
- [14] E. Van Loon *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*, vol. 46, pp. 463–472, 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.07.028.
- [15] S. Brachemi and G. Bollée, "Renal biopsy practice: What is the gold standard?," *World J. Nephrol.*, vol. 3, no. 4, pp. 287–94, Nov. 2014, doi: 10.5527/wjn.v3.i4.287.
- [16] K. J. Swanson *et al.*, "Role of novel biomarkers in kidney transplantation," *World J. Transplant.*, vol. 10, no. 9, pp. 230–255, 2020, doi: 10.5500/wjt.v10.i9.230.
- [17] V. Nissaisorakarn, J. R. Lee, M. Lubetzky, and M. Suthanthiran, "Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance," *Hum. Immunol.*, vol. 79, no. 5, pp. 343–355, 2018, doi: 10.1016/j.humimm.2018.01.006.

- [18] M. B. Monteiro *et al.*, “Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 462, pp. 158–161, 2016, doi: 10.1016/j.cca.2016.09.018.
- [19] A. Dobin *et al.*, “STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 1, pp. 15–21, 2013, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- [20] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth, “edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 1, pp. 139–140, 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- [21] 2013 Dien *et al.* and K. Y. H. Pratik K. Mutha, Robert L. Sainburg, “基因的改变 NIH Public Access,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1097/TP.0b013e3181fe12fc.Chemokines.
- [22] K. Dayanand and R. W. R. Olivia E. Atherton<sup>1</sup>, Jennifer L. Tackett<sup>2</sup>, Emilio Ferrer<sup>1</sup>, “乳鼠心肌提取 HHS Public Access,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 5, pp. 139–148, 2018, doi: 10.1016/j.ab.2017.08.003.Methods.
- [23] Illumina, “Evaluating RNA Quality from FFPE Samples,” *Illumina Tech. Note*, pp. 1–4, 2016, [Online]. Available: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/evaluating-rna-quality-from-ffpe-samples-technical-note-470-2014-001.pdf>
- [24] Illumina, “Quality Scores for Next-Generation Sequencing: Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring,” *Qual. scores next-generations Seq.*, pp. 1–2, 2011, [Online]. Available: [https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf)

**Table 1. Quality control analyses of blood RNA extracts, derived cDNA libraries, and sequencing reads**

Blood RNA extracts – Quality control analyses						
	RNA isolation		Library generation		Sequencing	
Sample ID	Final RNA conc (ng/μL)	RNA integrity DV200 (%)	cDNA conc (ng/μL)	Fragment size (pb)	Q30 (%)	Reads (number)
Sta01	42.101	86.05	80.83	324	95.16	104,527,226
Sta02	85.444	88.31	78.83	349	95.94	91,239,750
Sta03	73.968	85.02	73.95	328	96.12	74,773,796
Sta04	167.913*	NA	NA	NA	NA	NA
Sta05	102.554	89.91	82.37	347	95.65	77,309,018
AcR01	65.738	83.92	82.95	323	93.919	67,244,280
AcR02	90.423	89.59	79.84	363	95.5	82,536,074
AcR03	173.322	91.23	23.6	292	96.13	85,217,608
AcR04	249.727	88.7	22.7	297	95.88	81,179,002
AcRpt01	50.962	89.26	69.65	320	94.146	67,118,226
AcRpt02	203.312	95.35	23.7	280	96.37	80,774,192
AcRpt03	89.727	84.01	23.6	291	96.06	89,079,176
AcRpt04	123.027	89.37	18.1	291	95.69	60,993,492
Chr01	106.91	89.73	105.56	353	95.77	75,015,126
Chr02	181.093	94.42	17.7	289	96.14	79,730,866
Chr03	242.188	89.49	16.5	289	96.28	74,995,686
HC01	23.388	74.66	16.2	280	96.15	77,237,530
HC02	238.789	93.02	19.6	290	95.51	76,114,712
Hd01	119.719	88.59	94.65	354	95.77	80,655,746
Hd02	202.488	89.91	18.4	297	96.19	74,573,558
Hd03	117.443	88.96	21.4	298	96.14	83,360,024
Hd04	118.333	88.96	17.9	290	96.14	84,122,320

**AcR:** kidney transplant patients with acute rejection; **AcRpt:** kidney transplant patients with acute rejection after administration of rejection reversal therapy; **Chr:** kidney transplant patients with chronic rejection; **Sta:** kidney transplant patients with long-term graft survival; **Hd:** patients on hemodialysis and registered in the waiting list for kidney transplantation; **HC:** healthy controls. \*The sample did not meet the purity parameters so it was discarded.

**Table 2. Quality control analyses of renal biopsy RNA extracts, derived cDNA libraries, and sequencing reads**

Renal biopsy RNA extracts – Quality control analyses						
Sample ID	RNA isolation		Library generation		Sequencing	
	Final RNA conc (ng/μL)	RNA integrity DV200 (%)	cDNA conc (ng/μL)	Fragment size (pb)	Q30 (%)	Reads (number)
<b>AcR01</b>	50.117	65.44	68.65	307	93.631	65,268,762
<b>AcR02</b>	146.493	83.48	91.14	327	95.73	72,826,790
<b>AcR03</b>	193.073	68.31	23.9	287	94.20	75,624,774
<b>AcR04</b>	254.449	65.47	32.7	286	95.68	82,824,142
<b>Chr01</b>	107.577	85.55	86.72	314	96.35	72,514,814
<b>Chr02</b>	53.491	73.87	11.7	263	96.01	68,236,589
<b>Chr03</b>	318.285	72.68	27.4	281	94.35	66,598,578

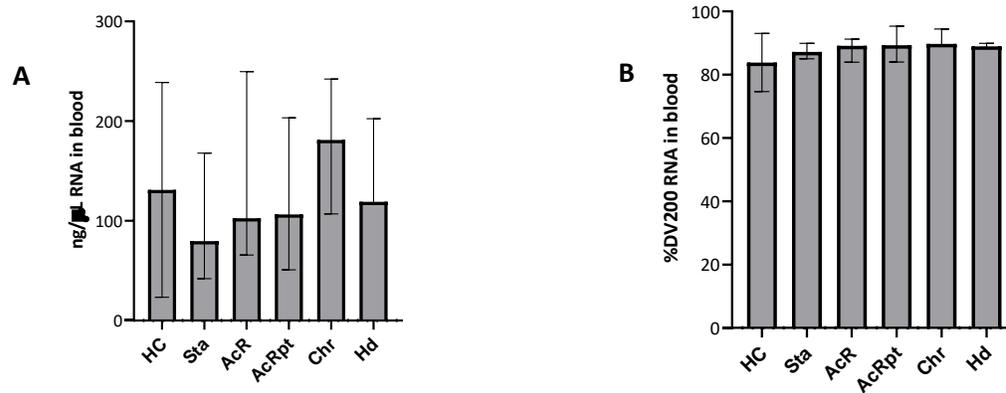
**AcR:** kidney transplant patients with acute rejection; **Chr:** kidney transplant patients with chronic rejection. All samples met the quality parameters required.

**Table 3. Quality control analyses of urinary RNA extracts, derived cDNA libraries, and sequencing reads**

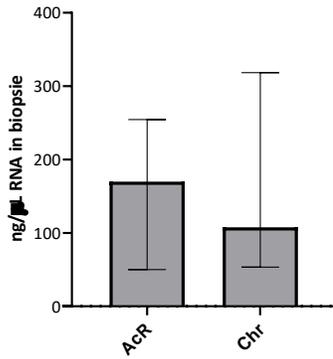
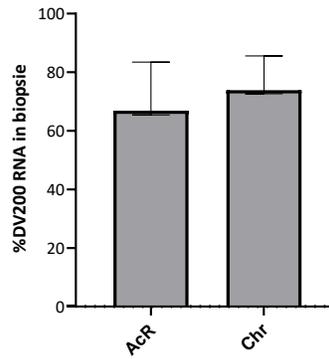
Urinary RNA extracts – Quality control analyses						
Sample ID	RNA isolation		Library generation		Sequencing	
	Final RNA conc (ng/μL)	RNA integrity DV200 (%)	cDNA conc (ng/μL)	Fragment size (pb)	Q30 (%)	Reads (number)
<b>Sta01</b>	133.991	50.61	13.76	334	89.21	65,473,492
<b>Sta02</b>	3.382*	52.4**	NA	NA	NA	NA
<b>Sta03</b>	89.885	48.01	8.82	301	94.47	71,245,280
<b>Sta04</b>	2.523*	59.62**	NA	NA	NA	NA
<b>Sta05</b>	31.599	56	50.1	299	95.97	91,042,172
<b>AcR01</b>	50.562	37.84	39.4	287	94.044	74,681,356
<b>AcR02</b>	3.051*	50.15**	NA	NA	NA	NA
<b>AcR03</b>	84.446	49.31	49	314	95.34	62,298,890
<b>AcR04</b>	20.837	46.3	25.2	275	96.15	85,094,684
<b>AcRpt0 1</b>	126.21	31.86	44.29	307	93.461	66,753,802
<b>AcRpt0 2</b>	178.794	47.45	1.69	250	93.54	88,965,214
<b>AcRpt0 3</b>	594.061	31.7	27.9	295	95.69	62,274,656
<b>AcRpt0 4</b>	10.605	42.54	9.71	278	96.11	78,771,760
<b>Chr01</b>	139.51	81.16	84.13	297	96.07	80,063,570
<b>Chr02</b>	14.471	69.67	40.5	280	96.09	85,526,276
<b>Chr03</b>	59.69	32.54	30.3	272	95.99	79,082,422
<b>HC01</b>	8.028	56.27	6.1	262***	NA	NA
<b>HC02</b>	3.146*	30.01**	NA	NA	NA	NA
<b>Hd01</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Hd02</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Hd03</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Hd04</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA

**AcR:** kidney transplant patients with acute rejection; **AcRpt:** kidney transplant patients with acute rejection after administration of rejection reversal therapy; **Chr:** kidney transplant patients with

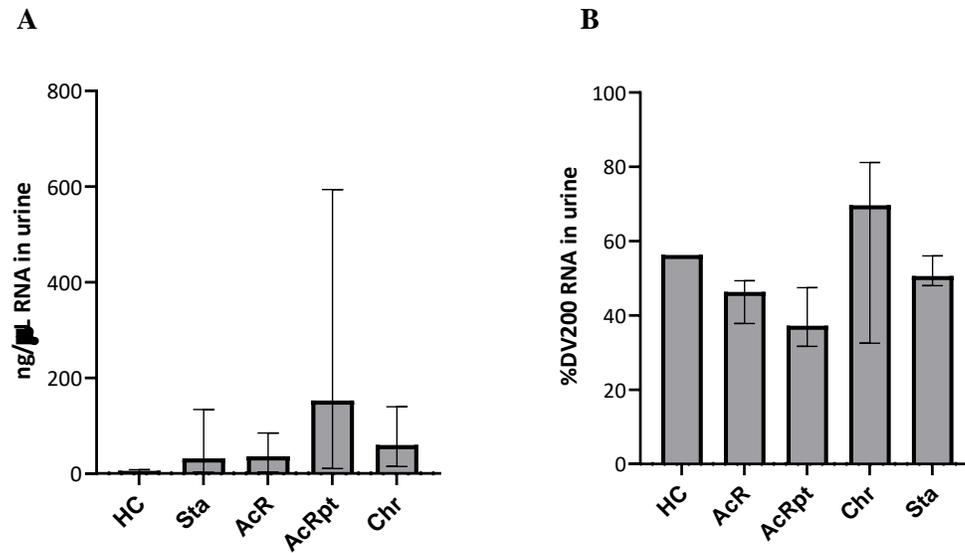
chronic rejection; **Sta**: kidney transplant patients with long-term graft survival; **HC**: healthy controls. \*The sample did not meet the purity parameters (260/230 and 260/280 ratios), so it was discarded. Samples with a low amount of nucleic acid (\*), of adequate integrity but insufficient amount of nucleic acid (\*\*), or that met quality parameters but came from a group where no other samples were available for comparison (\*\*\*) were not sequenced.



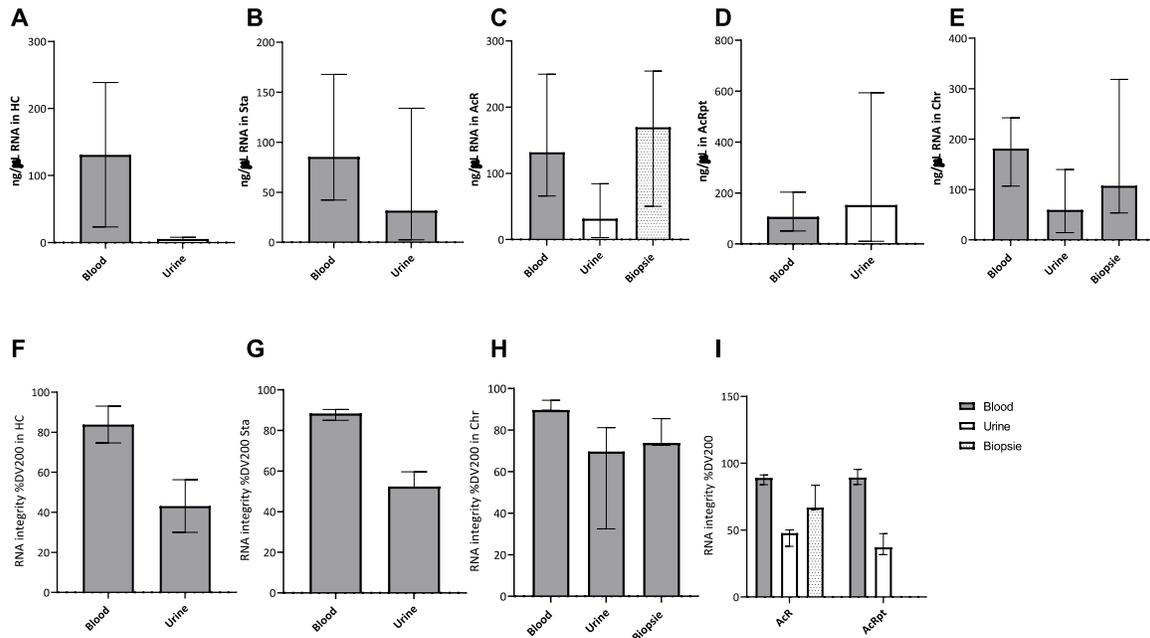
**Figure 1. Quality control analyses of blood RNA extracts.** Peripheral blood samples were drawn from patients and healthy controls grouped as described below. A 1.6  $\mu$ L aliquot (containing approximately  $10 \times 10^6$  leukocytes) was used to extract RNA using the modified TriReagent protocol described in methodology. The concentration of the isolated RNA was determined by, and the integrity by the DV200 index using the 4200 TapeStation. **A.** Concentration and **B.** Integrity of peripheral blood RNA extracts in healthy controls and patients. **AcR**: kidney transplant patients with acute rejection; **AcRpt**: kidney transplant patients with acute rejection after administration of rejection reversal therapy; **Chr**: kidney transplant patients with chronic rejection; **Sta**: kidney transplant patients with long-term graft survival; **Hd**: patients on hemodialysis and registered in the waiting list for kidney transplantation; **HC**: healthy controls. Column graphs represent medians and ranges.

**A****B**

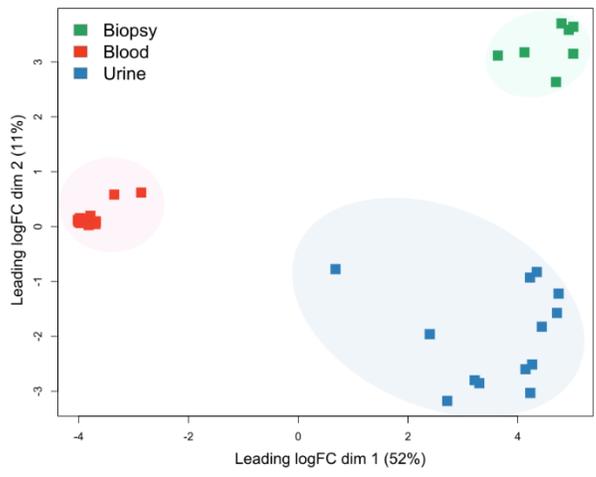
**Figure 2. Quality control analyses of renal biopsy RNA extracts.** Kidney biopsies (two cylinders) were taken from kidney transplant patients with acute (**AcR**) or chronic (**Chr**) rejection. Both tissue cylinders were used to extract RNA using the modified TriReagent protocol described in methodology. The concentration of the isolated RNA and the integrity by the DV200 index, were measured using the 4200 TapeStation. **A.** Concentration and **B.** Integrity of renal biopsy RNA extracts. Column graphs represent medians and ranges.



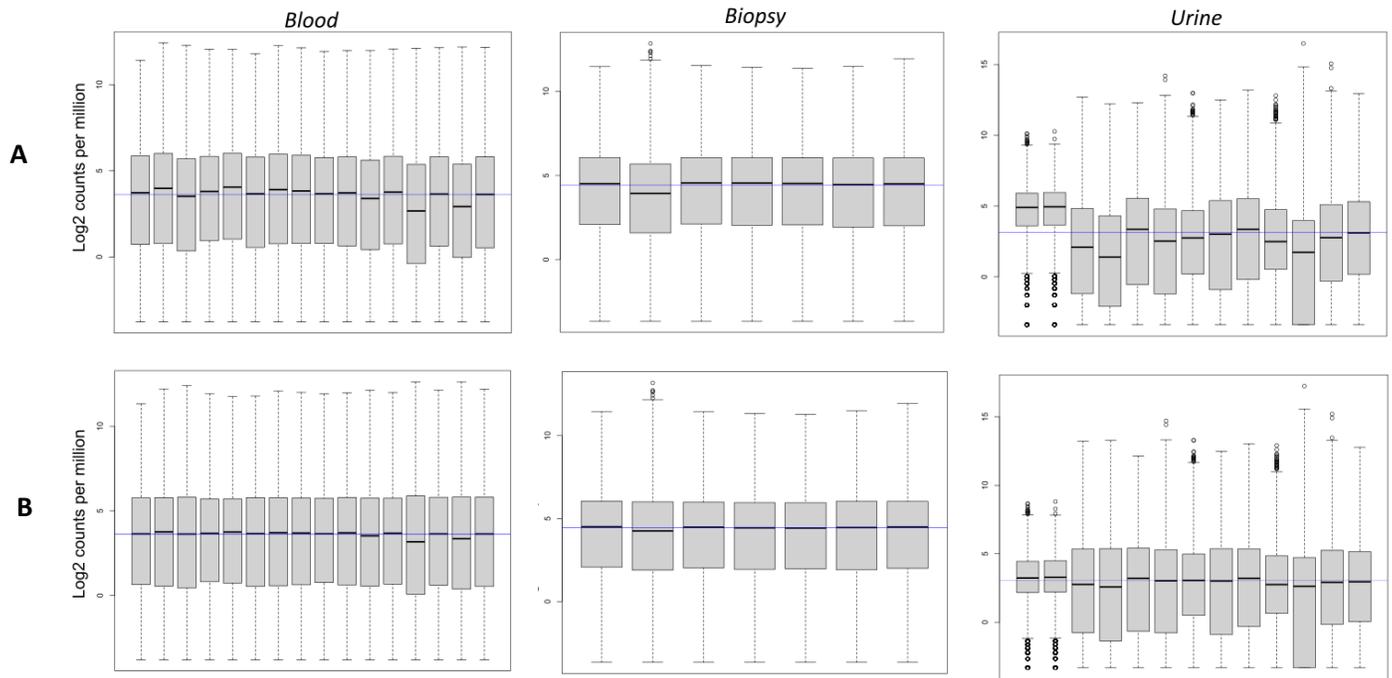
**Figure 3. Quality control analyses of urinary RNA extracts.** Urine samples were collected from patients and healthy controls grouped as described below. Two-hundred mL of urine were used to extract RNA using the modified TriReagent protocol described in methodology. The concentration of the isolated RNA and the integrity by the DV200 index, were measured using the 4200 TapeStation. **A.** Concentration and **B.** Integrity of urinary RNA extracts. **AcR:** kidney transplant patients with acute rejection; **AcRpt:** kidney transplant patients with acute rejection after administration of rejection reversal therapy; **Chr:** kidney transplant patients with chronic rejection; **Sta:** kidney transplant patients with long-term graft survival; **HC:** healthy controls. Column graphs represent medians and ranges.



**Figure 4. Quality control analyses of blood, renal biopsy, and urinary RNA extracts.** Peripheral blood, renal biopsies, and urine samples were collected from patients and controls grouped as described below. The concentration of the isolated RNA and the integrity by the DV200 index, were measured using the 4200 TapeStation. **A – E.** RNA concentration in blood, renal biopsy, and urinary RNA extracts from HC (**A**), Sta (**B**), AcR (**C**), AcRpt (**D**), and Chr (**E**) individuals. **F – I.** Integrity of RNA in blood, renal biopsy, and urinary RNA extracts from HC (**F**), Sta (**G**), Chr individuals, and in AcR vs AcRpt individuals (**I**). **AcR:** kidney transplant patients with acute rejection; **AcRpt:** kidney transplant patients with acute rejection after administration of rejection reversal therapy; **Chr:** kidney transplant patients with chronic rejection; **Sta:** kidney transplant patients with long-term graft survival; **HC:** healthy controls. Column graphs represent medians and ranges.



**Figure 5. Global transcriptional differences between clinical samples.** The degree of between-sample differences was evaluated globally using the multidimensional scaling (MDS) statistical software. Clusters of cDNA libraries prepared from blood, renal biopsy, and urinary RNA extracts are shown.



**Figure 6. DNA library normalization.** Read counts from sequencing of cDNA libraries prepared from blood, renal biopsy, and urinary RNA extracts were normalized by the Trimmed Mean of the M-values (TMM) approach using the EdgeR package. **A.** Unnormalized and **B.** TMM normalized read counts for the three types of cDNA libraries.

**CAPÍTULO III: DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND  
FUNCTIONAL CATEGORIES IN BIOPSY, PERIPHERAL BLOOD,  
AND URINE FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH  
ACUTE AND CHRONIC REJECTION.**

### **3 CAPÍTULO III: DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND FUNCTIONAL CATEGORIES IN BIOPSY, PERIPHERAL BLOOD, AND URINE FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH ACUTE AND CHRONIC REJECTION.**

Carlos Carmona<sup>1</sup>, Marlon Castrillón<sup>1</sup>, John Fredy Nieto<sup>2</sup>, Gustavo Zuluaga<sup>2</sup>, Luis Fernando Arias<sup>3</sup>, Cristian Álvarez<sup>1</sup>

1 Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2 Unidad de Nefrología. Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

3 Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

#### **3.1 Introduction**

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage chronic kidney disease (ESKD). Transplantation, along with dialysis, constitute replacement therapies for patients with ESKD; nevertheless, transplantation is a better therapy, especially for aspects related to improving the quality of life of patients. According to the WHO, the number of patients with ESKD requiring a kidney transplant was of 42935 in the United States (1). In Colombia, 154688 new cases of ESKD were registered in 2020-2021, indicating an increase of 39249 cases versus 2019-2020.

Despite the usefulness of transplantation as replacement therapy, long-term graft survival represents a major challenge for transplant immunology. Some of the limitations to achieve this goal are loss of graft due to damage from calcineurin inhibitor toxicity, recurrent disease, chronic inflammation, increasing rates of diabetes, hypertension, and other medical comorbidities, medication noncompliance, and high rates of premature death.(2). Rejection is a process mediated by the immune response that is triggered after transplantation because the graft constitutes a significant source of inflammatory mediators and alloantigens such as HLA derived peptides, which could activate both innate and adaptive immune responses in the recipient. Inflammatory mediators are increased by processes such as mechanical cell damage caused by organ removal, injury due to ischemia reperfusion (IRI) and blood recirculation after surgical anastomosis (3,4). These antigens, and molecules such as damage-associated molecular pattern (DAMPs), activate antigen-presenting cells (APC) which display donor-derived HLA peptides to recipient's T cells through direct, indirect and semidirect allorecognition pathways (5,6). Allorecognition, culminates in the establishment of an adaptive response against renal tissue mediated by both activation and cellular infiltration to the graft,

as well as the activation of humoral responses where de novo donor-specific antibodies are produced and deposited in the tissue with a subsequent activation of lytic pathways such as the complement (7). Activation of this response requires the mobilization of effector immune cells to renal tissue from the bloodstream, as well as activation of tissue-resident effector cells. Likewise, cell migration from the blood circulation to the tissue requires endothelial activation that allows the transmigration of effector cells to and from the graft. To counteract the immunological effects on the graft, and help maintenance of renal function and integrity, there are several check-points that begin prior to transplantation, such as ensuring donor-recipient compatibility, induction therapies, and maintenance immunomodulatory therapies post transplantation (8,9).

Although nowadays there has been an advance in understanding immunological mechanisms mediating rejection, and the improvement of immunomodulation therapies, there are still underlying molecular processes marking an important variability among patients, and presumably influencing allograft rejection. Several authors have suggested that this intra- and inter-individual variability may be related to molecular regulation that ultimately influence cell metabolism (10,11).

The gold standard for rejection diagnosis and confirmation is the histopathological study from renal biopsy which represents a direct identification of the effector mechanisms mediating graft rejection or acceptance, whether mediated by cells (TCMR) or by antibodies (ABMR). However, it is at the same time an invasive procedure that might negatively impact both the graft and the patient. Thus, it has been proposed that biological matrices such as urine may represent a non-invasive source of transcripts or proteins accounting for allograft state (12–14). However, the isolation of these molecules, particularly RNA, from urinary sediment has been limited due to the high rate of degradation in urine and the poor reproducibility of transcriptional findings in this sample.

Based on the above, with our research proposal we seek to analyze molecular mechanisms mediating rejection by exploring the transcriptome in peripheral blood, biopsy, and urine from kidney transplant patients with acute or chronic rejection. The choice of these samples was essentially due to the fact that they represent anatomical sites where effector immune mechanisms take place. Firstly, blood circulation allows the mobilization of cells and immune mediators to and from the graft and secondly, urine could carry RNA molecules accounting for the level of gene expression in the tissue.

With the analysis proposed here, we seek to explore differences in gene expression by Next Generation Sequencing implementing RNA-Seq in biopsies, blood and urine from kidney transplant patients with acute and chronic rejection. For this, we performed an intra-outcome analysis simultaneously in acute and chronic rejection, with which we sought: 1. To identify differences in

gene expression between peripheral blood vs renal tissue and peripheral blood vs urine in acute rejection and chronic rejection; 2. To identify the level of agreement in gene expression between renal tissue and urine in acute rejection and chronic rejection and 3. To identify genes and biological processes associated with acute rejection and chronic rejection that could be potentially detected in blood, and simultaneously in urine and biopsy in acute rejection and in chronic rejection.

## **3.2 Materials and methods**

### **3.2.1 Patients**

Patients attending the Renal Facility of the Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia and with histopathology confirmation of acute rejection (AcR, n=4) and chronic rejection (Chr, n=3) were included. Samples were taken at the time of rejection. All individuals were of legal age, without infections at the time of sampling and who agreed to participate voluntarily with the signing of the informed consent, approved by the Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Demographic information about patients is described in table 1.

### **3.2.2 Samples**

**Peripheral blood:** 4 mL of blood were collected in EDTA tubes from all the individuals at the time of biopsy under clinical conditions.

**Biopsy:** four cylinders of tissue were taken by biopsy from patients with AcR and Chr as part of their histopathological study, following the clinical protocols of the Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín. Two of the cylinders were implemented for RNA isolation and library preparation for NGS. Both cylinders were placed in 1 mL of Tri Reagent at the time of biopsy and transported in liquid nitrogen to the laboratory. Histopathologic results of two representative biopsies are described in Figure 2.

**Urine:** 200 mL of urine were collected from all individuals in conic tubes of 50 mL at the time of biopsy, following aseptic protocols. Tubes were previously treated with RNase inhibitor solution. Samples were placed in liquid nitrogen and immediately transported to the laboratory for processing.

### **3.2.3 Sample processing, RNA isolation, quantification, and integrity assessment**

**Peripheral blood:** a volume of blood corresponding to  $16 \times 10^6$  leukocytes (~1.5 mL) was taken from each tube. Buffer EL (Qiagen) was added in a 1:5 ratio, it was vigorously vortexed for 20 S and centrifuged at 400 xg for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded and pellet was homogenized in

Buffer EL (1:2) and centrifuged again at 400 xg for 10 min at 4°C. 1 mL of Tri Reagent (Sigma-Aldrich) was added and vortexed until the cells were completely lysed.

**Biopsy:** sample homogenization was done at 4°C with a rotary homogenizer (Biobase BK-HG Series) at 8000 rpm directly in Tri Reagent. Homogenization was performed until complete tissue disaggregation. The total volume of the homogenate was transferred to a 1.5 mL tube and centrifuged at 12,000 rpm to remove cell debris. Supernatants were then recovered.

**Urine:** samples were centrifuged at 3000 xg for 30 min at 4°C. Pellets (~200µL) were treated with 1 mL of Tri Reagent and vortexed until complete lysis.

For total RNA isolation, the same steps were followed for all samples. Lysates were treated with 200 µL of chloroform, 2 µL glycogen (Thermo Scientific) and incubated at room temperature for 3 min. Subsequently, each tube was vortexed for 15 S and centrifuged at 12,000 xg for 15 min at 4°C. The aqueous phase was then recovered in a 1.5 mL tube and one volume of previously refrigerated absolute isopropanol and 100 µL of 3M sodium acetate, pH 5.2 (Thermo Scientific) were added. Samples were then placed at -20°C for 30 min and centrifuged at 12,000 xg for 15 min, the supernatant was discarded and the pellet washed with 1 mL of 70% ethanol, 10,000 xg for 10 min. The RNA was resuspended in 50 µL of nuclease-free water and deep-frozen.

### **3.2.4 Library preparation and sequencing**

The integrity of the RNA was determined with the percentage of transcripts with a size equal to or greater than 200 nt (%DV200). cDNA libraries were generated at MacroGen with the Sure Select XT Direct Human kit (Agilent) from 200 ng of total RNA. The manufacturer's instructions were followed.

Sequencing was performed at MacroGen with the NovaSeq 6000 platform (Illumina, MacroGen), paired end, 150 base pairs. Total reads, %GC, and Phred Score values (%Q30) were calculated from the generated data to determine sequencing quality.

### **3.2.5 Data analysis and statistics**

Figure 1 is an overview of the methodology implemented for data analysis. Raw data were mapped against the GRCh38/hg38 human reference genome using Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (15). Data cleaning was performed with this tool as well. From mapping, raw counts were obtained and a raw counts table was built listing the number of counts for each gene in each of the sequenced libraries. This table was used as input for the analysis of differential gene expression.

Analysis were performed in R using the EdgeR (16) package in RStudio. Initially, gene annotation was performed using BiomaRt (17). With the annotation, gene SYMBOLS, gene biotypes and descriptions of each one, were obtained. Subsequently, the required format was given to the data table and the counts per million (CPM) were obtained from which the data with counts less than 0.5 were removed. An initial data exploration of the data was then carried out by means of multidimensional scaling (MDS) and hierarchical clustering (HC) of the 200 genes with the greatest variability.

Data were normalized using the calcNormFactors function with the trimmed mean of M-values (TMM) method and the table of effective counts was obtained with which the subsequent analysis were performed.

### **3.2.6 Identification of differentially expressed genes (DEGs)**

To determine differentially expressed genes (DEGs), the Robinson and Smyth Exact Test was applied, with a biological variation coefficient (BVC) of 0.4. Comparisons were made in pairs between samples separately for AcR and Chr (Figure 3A). From this analysis, p values and p.adjust values (FDR, Benjamini-Hochberg test) were obtained and those with a value equal to or lesser than 0.05 were considered significant. Additionally, the Log2 Fold Change (LogFC) values were obtained and genes with LogFC greater than 2 and LogFC less than -2 were considered as positively or negatively regulated, respectively. Genes with negative logFC were considered as positively regulated in the blood in all cases.

### **3.2.7 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)**

Unsupervised GSEA was performed with ClusterProfiler (v3.16) (18) in RStudio, using the gseGO function. The analysis was made from the whole DEGs obtained from each of the comparisons (blood vs biopsy or blood vs urine in both AcR and Chr). The selected ontology was Biological Process, with a p.value cutoff of 0.05 and using the Benjamini Hochberg adjustment method. Subsequently, data were exported with information from the description of the functional category, normalized enrichment score (NES) values, and adjusted p-value (p.adjust).

### **3.2.8 Identification of the most significant immune DEGs**

From DEGs, we selected the up regulated genes in urine and biopsy and down regulated genes (up regulated in blood). Each set of DEGs was analyzed using PANTHER17.0. From this analysis, the immune system process category (GO:0002376) was selected. Subsequently, genes annotated in this functional category were obtained and identified as immune DEGs for subsequent analyses.

### **3.2.9 Calculation of cell fractions in urine of AcR, Chr and Sta**

Transcripts per million (TPM) of blood, biopsy and urine in AcR and Chr were calculated using the DGEobj.utils tool in EdgeR and the convertCounts function. TPM were used as input for the analysis of cell enrichment using xCell in RStudio (19). The analysis yields the fractions of different subtypes of immune and stromal cells.

## **3.3 Results.**

### **3.3.1 Histopathologic analysis of AcR and Chr biopsies**

Representative histopathological results one AcR and one Chr patient are shown (Figure 2). In AcR a significant lymphocytic infiltrate was identified in the tubular epithelium (severe tubulitis, t3 based on the Banff score) compatible with T-cell-mediated acute rejection. Likewise, some C4d deposits indicative of complement activation were identified. On the other hand, in Chr a marked leukocyte margination was identified within the peritubular capillaries, indicative of tubular capillaritis, and compatible with chronic antibody-mediated rejection (Figure 2).

### **3.3.2 Library exploration with Multidimensional Scaling and Hierarchical Clustering**

Sequenced libraries of peripheral blood, urine and biopsy were explored independently in AcR and Chr by Multidimensional Scaling and Hierarchical Clustering, in order to identify transcriptional differences among samples. Euclidean distance was implemented to identify the grouping of libraries in two dimensions. In both AcR and Chr, we observed the formation of three clusters, each constituted according to the type of sample (Figure 3). In AcR, dimensions explained 76% of variance between the sequenced libraries (dim.1=57%, dim.2=19%) (Figure 3B). In Chr, dimensions explained 79% of the variance (dim.1=61%, dim.2=18%) (Figure 3C). The formation of three clusters may be due to homology at the genomic level between the three types of samples, especially considering that the genome of two different individuals only differs by approximately 1%. Strikingly, in both AcR and Chr, Euclidean distance between biopsy and urine was smaller (dim.2) compared to the distance between these two samples and peripheral blood (dim.1), which may be an indicator of the transcriptional similarity between kidney tissue and urine. In the Hierarchical Clustering, the grouping of the libraries according to the type of sample was also observed in both AcR and Chr (Figures 3D and 3E).

### **3.3.3 Differential gene expression analysis**

With the application of the Exact test of Robinson & Smyth in EdgeR, the number of DEGs was identified. To assume the regulation of genes, an  $FDR \leq 0.05$  and a  $LogFC$  value  $\geq 2$  for the up-

regulated genes and  $\leq 2$  for the down-regulated were considered. Analysis was done independently for AcR and Chr. Down regulated genes were assumed to be upregulated in peripheral blood for the following analyses.

In AcR, 4703 and 1950 up regulated genes were observed in biopsy and blood, respectively (Figure 4A, Supplementary Table 1) and 5038 and 1147 genes were up regulated in urine and blood, respectively (Figure 4B, Supplementary Table 1). In Chr, 4671 and 1966 genes were up regulated in biopsy and blood, respectively (Figure 4C, Supplementary Table 1) and 3991 and 755 genes were up regulated in urine and blood, respectively (Figure 4D, Supplementary Table 1). In both AcR and Chr the number of up regulated genes was higher in urine and biopsy than in peripheral blood. This finding could suggest that there is a higher level of positive gene regulation in the graft than in peripheral blood, which could be subsequently reflected in urine.

Next, we performed a global exploration to identify the number of unique DEGs in urine and biopsy and those shared by both samples, both in AcR and Chr. As observed in Figure 4E, 3916 up regulated genes in AcR were found to be shared between biopsy and urine, corresponding to ~48% similarity in upregulation, whereas 578 (~7%) were found to be upregulated in blood in relation to biopsy and urine. Likewise, 1051 genes (~13%) were found to be up-regulated exclusively in urine and 730 (~9%) in biopsy.

A similar scenario was identified in Chr. 3450 genes (~47%) were found to be up regulated simultaneously in urine and biopsy and 485 (~7%) were found to be up regulated in blood relative to biopsy and urine. 489 genes (~7%) were found to be up-regulated only in urine and 1214 (~16%) only in biopsy (Figure 4F, Supplementary Table 1).

### **3.3.4 Gene Set Enrichment Analysis in blood, urine, and biopsy of AcR and Chr**

After identifying the number of regulated genes in biopsy and urine in relation to peripheral blood in AcR and Chr, we performed a GSEA to explore functional categories of Gene Ontology (GO) associated with biological processes (BP).

In biopsy of AcR we found an enrichment of BP related to kidney development and morphogenesis (Figure 5A, left panel). In blood we observed an enrichment for BP such as MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway, response to protozoan, defense response to protozoan, antigen processing and presentation of exogenous peptide, interleukin-12 production, regulation of interleukin-12 production and regulation of CD4-positive alpha-beta T cell activation (Figure 5A, right panel).

In urine of AcR we observed a similar behavior as there was an enrichment for BP related to renal development and morphogenesis (Figure 5B, left panel). On the other hand, in peripheral blood, we observed an enrichment for BP such as monocyte extravasation, regulation of B cell receptor signaling pathway and MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway (Figure 5B, right panel).

BP enriched in Chr did not differ from those observed in AcR. In biopsy, we observed BP involving kidney development (Figure 5C, left panel). Among the BP enriched in blood versus biopsy were found regulation of B cell receptor signaling pathway, alpha-beta T cell activation involved in immune response, CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation, MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway, B cell proliferation, leukocyte homeostasis and B cell activation involved in immune response (Figure 5C, right panel).

in urine we observed a similar landscape as BP related to kidney development were enriched (Figure 5D, left panel). The main BP enriched in blood included rRNA modification, somatic diversification of T cell receptor genes, somatic recombination of T cell receptor gene segments, T cell receptor V(D)J recombination, regulation of B cell receptor signaling pathway, regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity and regulation of natural killer cell mediated immunity (Figure 5C, right panel).

Based on the previous findings, in biopsy and urine of both AcR and Chr, a greater enrichment of BP associated with renal development and morphology was observed, whereas in peripheral blood there was a greater enrichment of BP associated with the immune response. However, it is known that immunological mechanisms have a direct effect on the renal graft. To address this discrepancy, we hypothesized that both in peripheral blood and renal tissue there is a high level of expression of genes involved in the activation of the immune response. Nevertheless, in the graft there could be a superimposition of processes related to renal development over those associated with the immune response, that is, in the tissue a process of tissue remodeling may be taking place which is known to be mediated by the same inflammatory mechanisms. This hypothesis might explain the higher enrichment of BP such as cornification and keratinization.

### **3.3.5 Identification of immune DEGs and functional analysis**

To delve into DEGs and the immune mechanisms taking place in the graft, and to identify if they are also observable in urine, we focused on the identification of immune genes (which we called immune DEGs) and enriched GO BP in both biopsy and urine. Although the unsupervised GSEA identified a significant enrichment of effector immunological mechanisms in peripheral blood in AcR and Chr, it is important to highlight that in urine for both AcR and Chr we also identified enrichment for

monocyte chemotaxis (Figures 4E, F, Supplementary Table 2), which suggests that although a greater immune enrichment was observed in peripheral blood, some of the mechanisms in the tissue are detected based on the positive regulation of some genes in urine.

To address this analysis, we specifically identified genes in the BP *Immune system process* (GO:0002376) along the genes shared by urine and biopsy and those up regulated in blood in both AcR and Chr (Figures 4E, 4F). From genes shared by biopsy and urine in AcR we identified 67 immune DEGs. The remaining 3849 genes were associated with other biological processes. In peripheral blood, 51 immune DEGs were identified and 527 were associated with other biological processes. From genes shared by biopsy and urine in Chr, 64 immune DEGs were identified while 62 were identified in blood; the remaining 3386 and 423 genes, respectively, were associated with other biological processes (Figure 6A). In general, the fraction of positively regulated immune DEGs in peripheral blood compared to urine and biopsy was higher in both AcR and Chr, which agrees with previous results in which a greater enrichment of functional categories associated with the immune response in blood was identified.

Next, immune DEGs obtained in each case were analyzed to identify the most enriched immunological processes. In urine and biopsy of AcR and Chr, we observed an enrichment of *immune response* (GO:0006955) with 49 and 46 genes for AcR and Chr, respectively; and *leukocyte migration* (GO:0050900) with 29 and 28 genes for AcR and Chr, respectively (Figure 6B). This finding suggests that together with tissue remodeling processes associated with the enrichment of BP such as renal development and morphogenesis, it is possible to observe a level of immunological activation from a transcriptional perspective, specifically associated with chemotaxis.

In peripheral blood of AcR and Chr, the immunological process with the highest enrichment was *immune response* (GO: 0006955) with 35 and 48 genes, respectively, followed by *leukocyte migration* (GO: 0050900) and *immune system development* (GO: 0002520) in blood of AcR, and *leukocyte activation* (GO:0045321) and *immune effector process* (GO:0002252) in Chr (Figure 6B). Additionally, we identified a set of genes associated with antigen processing and presentation which were more enriched in biopsy and urine relative to peripheral blood (Figure 6B).

Next, we identified the genes associated with immune processes previously described as more enriched in biopsy, urine, and blood in both AcR and Chr. Within the leukocyte migration process, we identified encoding genes for chemokines such as *CCL13*, *CCL14*, *CCL15*, *CCL17*, *CCL19*, *CCL2*, *CCL20*, *CCL22*, *CCL24*, *CCL8*, *CX3CL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL2*, *CXCL6* and *CXCL9* in both AcR and Chr; *CCL11* and *CCL16* only in AcR and *CCL21* only in Chr. Interestingly,

in peripheral blood were found differentially expressed genes encoding chemokine receptors, such as *CCR2*, *CCR3*, *CX3CR1*, *CXCR1*, *CXCR2* in AcR and *CCR2*, *CCR4*, *CCR6*, *CCR7* and *CXCR5* in blood in Chr (Tables 2-5).

### **3.3.6 Cell enrichment analysis**

From sequencing data, we performed a cell enrichment analysis using the Xcell package in R. In AcR we identified the enrichment of B cells and class-switched memory B cells in peripheral blood (Figures 7A, 7D, 7E). Likewise, although no significant differences were identified, a tendency towards TCD8+ cell enrichment was observed. On the other hand, the enrichment of fibroblasts was observed both in biopsy and urine in AcR. Subtle changes were also observed in cell groups such as mast cells and naive B cells, which tended to be more enriched in blood, and monocytes and neutrophils, in which a trend towards enrichment in blood and urine was observed (Figure 7A). In Chr, we identified a trend enrichment of TCD8+ cells and class-switched memory B cells in blood and biopsy, as well as subtle enrichment of neutrophils and B cells in both samples. We also identified the enrichment of fibroblasts, and the tendency towards the enrichment of macrophages and monocytes in Chr urine (figure 7A).

When comparing the immune score and the stroma score in blood, biopsy, and urine in AcR and Chr, it was observed that in both cases the immune score was higher than the stroma score in peripheral blood, whereas in biopsy and urine we observed a balance between both scores.

These findings allow us to strengthen the previously raised hypothesis that a greater enrichment of biological processes such as kidney development and morphogenesis was observed at the graft level due to tissue remodeling associated with inflammation that occurs in rejection.

## **3.4 Discussion and analysis**

Although kidney transplantation represents an optimal therapy for patients with chronic kidney disease, there are still limitations that condition stable long-term graft survival, including rejection, even when transplanted patients are subjected to immunomodulatory therapies of maintenance. At present, many efforts have been made to overcome these limitations by understanding the immunomolecular mechanisms that take place in transplantation, since graft rejection and acceptance are processes dependent on specific effector immune mechanisms that occur after allorecognition.

The establishment of molecular profiles made up of genes regulated in kidney transplant patients, which could influence the effector cellular mechanisms has been an important focus of research, since its approach would also allow the identification of intra- and inter-individual differences involved in either rejection or graft acceptance. Likewise, transcriptional profiles could have clinical utility since their analysis in biological matrices such as blood, kidney tissue or urine, could be implemented in risk prediction prior to transplantation, in the follow-up of transplant patients and in the rapid and sensitive diagnosis of rejection. However, although positively regulated genes in transplant patients have been proposed as potential biomarkers, in clinical practice there is still no molecular profile that makes it possible to differentiate between outcomes such as acute rejection, chronic rejection or graft acceptance.

Motivated by trying to understand the effector immunological mechanisms involved in acute rejection and chronic rejection, and in turn, by exploring differentially expressed genes in patients with these outcomes, we set out to evaluate the transcriptome of kidney transplant patients with acute rejection (AcR) and chronic rejection (Chr), by means of RNA sequencing and analysis of differential and functional expression from the previously mentioned biological matrices. Our hypothesis was that the immunological processes that mediate the response to the graft are differential between peripheral blood and tissue, since the migration of circulating effector cells to the kidney is required, where cellular or humoral mechanisms mediating rejection take place. Based on this, our second hypothesis was that the processes and differentially expressed genes (DEGs) that are observed at the tissue level could be subsequently evidenced in urine.

Based on our findings, we identified four relevant aspects: firstly, the transcriptional similarity identified between biopsy and urine. Secondly, the enrichment of renal developmental processes and renal morphogenesis on immune processes in the graft. Thirdly, the positive regulation of genes associated with chemotaxis in the different samples and fourthly, the similarity of the findings between AcR and Chr.

Different authors have previously proposed the implementation of urine as a non-invasive alternative for the identification of biomarkers associated with the state of the graft, since its direct contact with renal tissue increases the probability of detecting DNA, RNA, proteins, or cells collected from the tissue. However, it has not been possible to establish the level of concordance between the biopsy and urine molecular profiles. Verma et al. conducted a study in 2020 in which they evaluated differential expression levels in biopsy and urine samples from kidney transplant patients undergoing either T cell-mediated rejection (TCMR) or antibody-mediated rejection (AMR) using RNA Seq. In the study, both rejection groups were compared with transplant patients with no rejection, and the

number of genes shared between biopsy and urine was identified. In TCMR there were identified 75 genes shared by both samples, out of a total of 356 up-regulated genes in biopsy and 102 in urine. In AMR, 187 genes shared by both samples were identified, out of a total of 536 up-regulated genes in biopsy and 347 in urine (20). Additionally, in another study by Jung-Woo Seo et al., the expression levels of 14 genes including *CXCL9*, *CIQB*, *LCK* and *FOXP3* were evaluated in biopsy and urine samples from patients with stable graft function and patients with acute rejection. Findings showed an increase in the mRNA levels of these genes in patients with rejection; additionally, an increase in *CXCL9* was observed by in situ hybridization (21). This finding is consistent with the increased expression of chemokines identified in our results. In line with previous reports, in our results we identified that approximately 48% of DEGs were shared by biopsy and urine relative to blood, in both AcR and Chr. Considering this finding, it is possible to propose, and as discussed by Verma, that the graft functions as a molecular sorter, whose products are subsequently detected in urine.

To address the level of transcriptional similarity between biopsy and urine, we also performed functional analysis in which we identified that some biological processes obtained based on the DEGs are shared by both matrices. When reviewing the BP of the GSEA, we observed that processes such as kidney development, renal morphogenesis, keratinization, or cornification were more enriched both in biopsy and in urine for AcR and Chr. In addition to this finding, immune processes such as activation of T cells and activation of B cells were more enriched in blood in AcR and Chr, respectively, compared to both biopsy and urine. Although this seems to be contradictory, considering that rejection is an immune-mediated process against the graft, our hypothesis regarding this finding is that the inflammatory processes triggered by the innate and adaptive response in the graft, progressively induce tissue remodeling. First, the graft has high cell diversity and the number of cells that make up the kidney tissue can frequently exceed the number of immune cells. Secondly, tissue remodeling stimulated by the inflammatory processes associated with rejection induces the proliferation of cells such as fibroblasts and processes as angiogenesis (22–24). Likewise, it is known that the inflammatory processes given in humoral rejection can lead to the generation of fibrosis (25). These tissue remodeling could then superimpose immune BP, which is why the findings show a greater enrichment of the previously mentioned processes. In fact, this hypothesis is in line with observations such as the enrichment of cells such as fibroblasts in urine and in biopsies of rejection patients, and with the up regulation of genes such as VEGF in both samples. It is known that this is an angiogenic factor, which promotes endothelial proliferation, differentiation and survival, and is also involved in vasodilation, which is required in the endothelial activation process for leukocyte migration (26).

As part of our objective, we wanted to deepen the search for DEGs and BP associated with the immune system in biopsy and urine, in comparison with peripheral blood. For this, from functional analysis we selected DEGs associated with the GO Immune system process. Within this, DEGs corresponding mainly to chemokines in biopsy and urine, and chemokine receptors in peripheral blood were found. This finding is noteworthy since due to the role of chemokines in the response to the graft, different authors have focused on determining the expression levels of these molecules to assess their diagnostic potential (27,28). In biopsy and urine, an up-regulation was observed, among others, of chemokines such as *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11*. These molecules play an essential role in the migration of CD4+ and CD8+ T cells, as well as NK cells towards the graft by interacting with their common receptor *CXCR3* (28). *CXCL10* mRNA has been previously reported as a diagnostic marker for the detection of rejection in the urine of transplant patients (29), while the urine levels of the three proteins (as *CXCL9*, *CXCL10* and *CXCL11*) have been found to be increased both in cellular and humoral rejection (28).

In peripheral blood, we observed up regulated chemokine receptors, such as *CCR3* in AcR, and *CCR4*, *CCR6*, *CCR7* and *CXCR5* in Chr. Interestingly, in biopsy and urine, we identified the up regulation of *CCL13*, which is the ligand for *CCR3*; *CCL17* for *CCR4*, *CCL19* and *CCL21* (the latter only in Chr) for *CCR7* and *CXCL13* for *CXCR5* (30).

Regarding the transcriptional similarity observed between AcR and Chr in blood, biopsy, and urine, it is suggested that common immunological mechanisms may be activated in both outcomes. In fact, in Figure 2 it was possible to observe that although a cellular response predominates in acute rejection, C4d deposits were also observed, compatible with complement activation and therefore with the formation of immune complexes in the graft; that is, although the humoral response is predominant in Chr, it can also occur in AcR.

In conclusion, based on the results described, it is important to highlight, firstly and which could be the most relevant finding of the study, the similarity in the MDS and in the number of DEGs identified between biopsy and urine. Although this possibility has already been proposed in previous studies, with our analysis we identified that approximately 48% of the differentially expressed genes in the kidney graft can be subsequently detected in urine, which indicates that it could indeed be a suitable sample for detection of molecules associated with either acute or chronic rejection. Secondly, we identified that not only exist a similarity in the number of DEGs between biopsy and urine, but it was also possible to identify that DEGs are associated with similar biological processes, and that they could be relevant to deepen in the immune mechanisms triggered in the graft. The most important finding was the increase in the expression of chemokines encoding genes in the graft and urine while

in blood the expression of chemokine receptors was increased. This could be associated with the migration of immune cells from blood circulation to the graft, mediated in turn by endothelial activation. In the graft, a proinflammatory environment is generated promoting either AcR or Chr, which over time promotes tissue regeneration and remodeling through fibrosis and keratinization. However, immune response against the graft remains active, with a predominance of a cellular response in AcR and a humoral response in Chr as observed in Figure 2. Additionally, it is important to highlight that based on the findings it is possible to propose urine as a relevant biological matrix for the identification of molecules and biological processes associated with kidney graft rejection. However, validation of the molecules and processes identified requires further investigation including a larger number of patients.

### 3.5 References

1. Lentine KL, Smith JM, Hart A, Miller J, Skeans MA, Larkin L, et al. OPTN/SRTR 2020 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* [Internet]. 2022;22(S2):21–136. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajt.16982>
2. Joosten SA, Sijpkens YWJ, Van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. Vol. 68, *Kidney International*. 2005. p. 1–13.
3. Etxebarria A, Díez-Martín E, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. Role of the Immune System in Renal Transplantation, Types of Response, Technical Approaches and Current Challenges. *Immuno*. 2022;2(4):548–70.
4. Farrar CA, Kupiec-Weglinski JW, Sacks SH. The innate immune system and transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(10).
5. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. 2018;9(November):1–14.
6. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thaunat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. 2022;101(4):692–710.
7. Grafals M, Thurman JM. The Role of Complement in Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2019;10(October):1–10.
8. Chia PY, Teo A, Yeo TW. Overview of the Assessment of Endothelial Function in Humans.

2020;7(October):1–15.

9. Kummer L, Zaradzki M, Vijayan V, Arif R, Weigand MA, Immenschuh S, et al. Vascular Signaling in Allogenic Solid Organ Transplantation – The Role of Endothelial Cells. 2020;11(May).
10. 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* [Internet]. 2014 Nov [cited 2017 Aug 10];14(11):2565–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219326>
11. Wang Y, Zhang D, Hu X. A Three-Gene Peripheral Blood Potential Diagnosis Signature for Acute Rejection in Renal Transplantation. *Front Mol Biosci*. 2021;8(May):1–12.
12. Trajceska L, Severova-Andreevska G, Dzekova-Vidimliski P, Nikolov I, Selim G, Spasovski G, et al. Complications and risks of percutaneous renal biopsy. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(6):992–5.
13. Sakai K, Oguchi H, Muramatsu M, Shishido S. Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology*. 2018;23:38–44.
14. Brachemi S, Bollée G. Renal biopsy practice: What is the gold standard? *World J Nephrol* [Internet]. 2014 Nov 6 [cited 2017 Aug 10];3(4):287–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374824>
15. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
16. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1):139–40.
17. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G, et al. BioMart - Biological queries made easy. *BMC Genomics*. 2009;10:1–12.
18. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012;16(5):284–7.
19. Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol*. 2017;18(1):1–14.
20. Snopkowski C, Salinas T, Li C, Stryjniak G, Ding R, Sharma V, et al. Urinary cell mRNA

Profiling of Kidney Allograft Recipients: A Systematic Investigation of a Filtration Based Protocol for the Simplification of Urine Processing. *J Immunol Methods* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 May 1];498:113132. Available from: [/pmc/articles/PMC8487946/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3487946/)

21. Seo JW, Lee YH, Tae DH, Park SH, Moon JY, Jeong KH, et al. Non-Invasive Diagnosis for Acute Rejection Using Urinary mRNA Signature Reflecting Allograft Status in Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12(June):1–12.
22. Frangogiannis NG. The Inflammatory Response in Tissue Repair 60 . 2 Initiation of the Inflammatory Response Following Injury : The Alarmins. 2018;1517–37.
23. Soliman AM, Barreda DR. Acute Inflammation in Tissue Healing. *Int J Mol Sci*. 2023;24(1).
24. Mata R, Yao Y, Cao W, Ding J, Zhou T, Zhai Z, et al. The Dynamic Inflammatory Tissue Microenvironment: Signaling and Disease Therapy by Biomaterials. *Research*. 2021;2021.
25. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
26. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D, De Zeeuw AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*. 2004;65(6):2003–17.
27. Gielis EM, Anholts JDH, Van Beelen E, Haasnoot GW, De Fijter HW, Bajema I, et al. A Combined microRNA and Chemokine Profile in Urine to Identify Rejection after Kidney Transplantation. *Transplant Direct*. 2021;7(7):E711.
28. Mühlbacher J, Doberer K, Kozakowski N, Regele H, Camovic S, Haindl S, et al. Non-invasive Chemokine Detection: Improved Prediction of Antibody-Mediated Rejection in Donor-Specific Antibody-Positive Renal Allograft Recipients. *Front Med*. 2020;7(April):1–10.
29. Handschin J, Wehmeier C, Amico P, Hopfer H, Dickenmann M, Schaub S, et al. Urinary CXCL10 Measurement in Late Renal Allograft Biopsies Predicts Outcome Even in Histologically Quiescent Patients. *Transplant Proc*. 2021;53(7):2168–79.
30. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018;285(16):2944–71.

	<b>Group of study</b>	
	AcR (n=4)	Chr (n=3)
<b>Age*</b>	39 (29-42)	42 (25-46)
<b>Sex</b>		
<b>M</b>	0	3
<b>F</b>	4	0
<b>Years post transplantation*</b>	4,5 (1-11)	10 (5-23)
<b>HLA-A+B+DR mismatches*</b>	4 (4-5)	4 (3-4)
<b>Immunosuppression</b>		
P/C/S	1	NA
T/M	2	NA
P/T	1	NA
T/P/M	NA	3

**Table 1.** Demographic characteristics of patients. \*data are presented as median (range). AcR=patients with acute rejection; Chr=patients with chronic rejection. P=prednisolone; C=Cyclosporine; S=Sirolimus; T=Tacrolimus; M=Mycophenolate mofetil;

**SHARED BY BIOPSY AND URINE AFTER COMPARISSON WITH BLOOD=29**

<i>SYMBOL</i>	BIOPSY			URINE			<i>SYMBOL</i>	BIOPSY			URINE		
	logFC	PValue	FDR	logFC	PValue	FDR		logFC	PValue	FDR	logFC	PValue	FDR
<i>CCL11</i>	8.7156813	1.1768E-19	1.03E-18	4.3306479	0.0092175	0.0184714	<i>CXCL13</i>	6.0817965	5.199E-29	7.933E-28	5.4777924	1.59E-23	1.99E-22
<i>CCL13</i>	7.096344	1.1966E-10	5.597E-10	5.7761854	7.569E-06	2.598E-05	<i>CXCL2</i>	2.0010936	4.802E-06	1.434E-05	6.1495725	1.29E-31	2.88E-30
<i>CCL14</i>	8.5700779	1.0081E-18	8.271E-18	6.0015723	1.053E-06	3.995E-06	<i>CXCL6</i>	3.0585714	1.531E-11	7.706E-11	5.4747828	1.22E-26	1.9E-25
<i>CCL15</i>	5.9686964	3.4784E-07	1.188E-06	6.0426511	1.053E-06	3.995E-06	<i>CXCL9</i>	5.5380378	3.356E-28	4.894E-27	3.8105678	2.03E-15	1.49E-14
<i>CCL16</i>	6.7777431	3.1348E-09	1.301E-08	5.9848986	1.699E-06	6.31E-06	<i>GP2</i>	11.979201	2.449E-41	8.957E-40	9.1010299	1.99E-22	2.31E-21
<i>CCL17</i>	7.998037	2.1918E-15	1.454E-14	10.322337	1.056E-30	2.211E-29	<i>ITGA3</i>	6.4947774	1.932E-35	4.482E-34	6.1116722	1.19E-31	2.67E-30
<i>CCL19</i>	10.99535	3.3227E-46	1.885E-44	5.4658629	1.755E-09	8.644E-09	<i>PGF</i>	5.7869284	1.896E-15	1.265E-14	6.3413679	3.3E-17	2.73E-16
<i>CCL2</i>	6.3832253	1.3921E-32	2.715E-31	5.7299541	6.739E-27	1.076E-25	<i>PLVAP</i>	6.9921032	5.898E-37	1.534E-35	3.1996079	2.76E-10	1.45E-09
<i>CCL20</i>	2.2862901	9.1853E-07	3.006E-06	5.4777878	2.071E-25	2.973E-24	<i>SI00A14</i>	6.7152402	1.286E-22	1.344E-21	9.9806543	1.28E-44	8.12E-43
<i>CCL22</i>	4.7916199	1.0019E-15	6.801E-15	11.182789	4.175E-60	9.418E-58	<i>SELE</i>	11.716125	2.135E-39	6.741E-38	6.3393321	7.15E-08	3.04E-07
<i>CCL24</i>	3.1692812	1.1548E-05	3.291E-05	6.6691178	3.807E-23	4.649E-22	<i>UMOD</i>	16.395563	2.414E-74	1.13E-70	14.021742	5.71E-58	9.54E-56
<i>CCL8</i>	5.7137885	1.4028E-11	7.075E-11	6.1683978	6.698E-13	4.171E-12	<i>VEGFA</i>	2.2601304	1.493E-07	5.277E-07	3.2879477	1.17E-12	7.14E-12
<i>CX3CL1</i>	12.866516	6.6922E-48	4.427E-46	13.137273	2.342E-51	2.55E-49	<i>VEGFC</i>	3.3995726	8.253E-13	4.54E-12	2.76859	1.52E-08	6.9E-08
<i>CXCL10</i>	2.8882814	7.3579E-11	3.503E-10	3.2603817	2.556E-12	1.533E-11	<i>VEGFD</i>	6.7086152	3.002E-17	2.236E-16	4.2812606	2.52E-05	8.09E-05
<i>CXCL11</i>	4.9310931	1.5632E-22	1.622E-21	4.0591348	1.058E-15	7.924E-15							

**Table 1.** Up regulated genes in AcR biopsy and urine associated with the leukocyte migration process (GO:0050900), which was the process with the highest enrichment. The 29 genes associated with this process were obtained from the 67 immune DEGs identified in AcR biopsy and urine. The levels of expression and statistical significance are shown as a function of the logFC and the FDR, respectively, for each of the samples.

**OVERLAPPED IN BLOOD AFTER COMPARISONS WITH BIOPSY AND URINE=29**

<i>SYMBOL</i>	<i>VS BIOPSY</i>			<i>VS URINE</i>			<i>SYMBOL</i>	<i>VS BIOPSY</i>			<i>VS URINE</i>		
	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>		<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>
<i>AIM2</i>	-2.753504	4.3631E-10	1.954E-09	-2.194865	6.412E-06	2.221E-05	<i>DEFA4</i>	-7.443987	4.177E-29	6.437E-28	-2.282782	4.44E-06	1.57E-05
<i>BMX</i>	-6.279052	3.2655E-32	6.207E-31	-5.04559	9.918E-19	9.063E-18	<i>FCER2</i>	-2.030851	3.174E-06	9.696E-06	-3.804323	2.53E-11	1.44E-10
<i>BTK</i>	-2.714952	5.5386E-10	2.459E-09	-2.816652	1.272E-08	5.839E-08	<i>IGHV3-35</i>	-2.622613	3.523E-07	1.203E-06	-2.896981	1.75E-05	5.75E-05
<i>C4BPA</i>	-4.808549	1.7839E-21	1.753E-20	-3.632283	3.879E-11	2.17E-10	<i>LY96</i>	-3.053999	6.328E-12	3.27E-11	-3.764548	6.63E-13	4.13E-12
<i>CAMP</i>	-7.36075	7.8102E-36	1.868E-34	-3.680926	3.519E-12	2.097E-11	<i>MNDA</i>	-4.439937	5.907E-21	5.609E-20	-3.18498	2.42E-10	1.27E-09
<i>CCR2</i>	-2.14814	5.352E-07	1.793E-06	-3.940119	6.456E-14	4.291E-13	<i>MPL</i>	-4.307712	9.965E-19	8.186E-18	-3.922734	6.29E-13	3.93E-12
<i>CCR3</i>	-6.246814	1.1217E-30	1.914E-29	-3.204339	4.694E-10	2.411E-09	<i>PF4</i>	-6.739937	1.6E-36	4.016E-35	-5.212695	1.28E-20	1.33E-19
<i>CD1D</i>	-2.97302	2.2812E-11	1.131E-10	-3.178907	4.241E-10	2.186E-09	<i>PF4VI</i>	-5.642268	4.546E-28	6.552E-27	-5.117641	1.19E-19	1.14E-18
<i>CD244</i>	-2.873955	9.5383E-11	4.498E-10	-2.155391	7.542E-06	2.592E-05	<i>PPBP</i>	-5.955418	2.112E-31	3.794E-30	-5.104685	4.09E-20	4.08E-19
<i>CLEC12B</i>	-5.566245	2.051E-27	2.842E-26	-4.586377	6.942E-17	5.593E-16	<i>RNASE2</i>	-2.913874	6.005E-11	2.873E-10	-4.408641	1.08E-15	8.12E-15
<i>CLEC4A</i>	-3.432099	5.1595E-14	3.11E-13	-2.220727	4.818E-06	1.696E-05	<i>RNASE3</i>	-4.400561	2.674E-17	1.998E-16	-3.214088	3.23E-09	1.55E-08
<i>CLEC4C</i>	-4.609161	4.0588E-20	3.664E-19	-4.592818	1.437E-14	9.991E-14	<i>TLR1</i>	-3.756731	2.261E-16	1.604E-15	-3.028474	1.29E-09	6.44E-09
<i>CLEC4D</i>	-5.515355	3.3906E-28	4.94E-27	-2.342884	1.291E-06	4.863E-06	<i>TLR10</i>	-3.240619	4.629E-13	2.593E-12	-4.662518	2.25E-17	1.87E-16
<i>CLEC6A</i>	-3.469334	4.94E-13	2.763E-12	-2.0689	7.968E-05	0.0002377	<i>TLR5</i>	-3.406638	4.169E-14	2.532E-13	-3.83319	2.07E-13	1.33E-12
<i>CRI</i>	-4.330035	3.2739E-20	2.976E-19	-2.093698	1.148E-05	3.849E-05	<i>TLR6</i>	-3.833046	7.624E-17	5.567E-16	-3.287655	8.65E-11	4.7E-10
<i>CX3CRI</i>	-3.234458	4.9594E-13	2.773E-12	-3.332501	5.191E-11	2.874E-10	<i>TLR8</i>	-4.502002	2.191E-21	2.138E-20	-4.005471	2.36E-14	1.62E-13
<i>CXCR1</i>	-7.172233	1.8123E-40	6.203E-39	-2.172696	5.679E-06	1.979E-05	<i>TLR9</i>	-4.303398	2.411E-11	1.192E-10	-2.382399	0.000143	0.000411
<i>CXCR2</i>	-7.386105	4.0556E-42	1.569E-40	-2.695608	3.928E-08	1.714E-07							

**Table 2.** AcR peripheral blood regulated Up genes, associated with the immune response process (GO:0006955), which was the process with the highest enrichment. The 35 genes associated with this process were obtained from the 51 immune DEGs identified in AcR blood. The levels of expression and statistical significance are shown as a function of the logFC and the FDR, respectively, for each of the samples.

**SHARED BY BIOPSY AND URINE AFTER COMPARISSON WITH BLOOD=28**

<i>SYMBOL</i>	<i>BIOPSY</i>			<i>URINE</i>			<i>SYMBOL</i>	<i>BIOPSY</i>			<i>URINE</i>		
	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>		<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>
<i>CCL13</i>	8.3266613	3.5733E-14	2.47E-13	6.8091172	9.947E-08	5.767E-07	<i>CXCL11</i>	5.5178667	4.762E-21	5.594E-20	3.4216402	2.32E-10	1.72E-09
<i>CCL14</i>	7.6147828	4.2167E-11	2.28E-10	4.9000412	0.0030996	0.0099414	<i>CXCL13</i>	4.2257503	1.391E-09	6.564E-09	3.9347518	5.45E-08	3.25E-07
<i>CCL15</i>	6.5501484	4.3403E-07	1.586E-06	5.7668793	8.565E-05	0.0003511	<i>CXCL2</i>	2.6073743	6.339E-07	2.28E-06	5.8310244	9.88E-23	1.94E-21
<i>CCL17</i>	6.0150164	1.2384E-05	3.855E-05	9.9520667	4.958E-22	9.167E-21	<i>CXCL6</i>	2.2015086	1.449E-05	4.471E-05	5.4360902	6.69E-21	1.12E-19
<i>CCL18</i>	3.7059707	4.0131E-08	1.637E-07	10.091675	8.598E-41	7.9E-39	<i>CXCL9</i>	5.2657072	3.889E-20	4.285E-19	3.5982619	1.34E-11	1.11E-10
<i>CCL19</i>	8.142524	4.2892E-28	8.545E-27	4.5793666	2.522E-09	1.702E-08	<i>GP2</i>	13.397512	7.75E-40	5.102E-38	9.8691154	1.42E-21	2.52E-20
<i>CCL2</i>	6.3508886	7.9471E-25	1.239E-23	6.4563909	2.497E-25	6.01E-24	<i>ITGA3</i>	6.242036	1.214E-25	2.014E-24	6.4030272	1.6E-26	4.23E-25
<i>CCL20</i>	2.0150451	0.00049334	0.0012407	5.4283821	1.23E-18	1.74E-17	<i>PGF</i>	2.6200069	6.726E-06	2.154E-05	2.4357218	4.12E-05	0.000177
<i>CCL21</i>	12.637463	1.3697E-35	5.82E-34	7.906901	5.072E-12	4.316E-11	<i>PLVAP</i>	5.8969919	2.323E-23	3.208E-22	2.056005	6.04E-05	0.000253
<i>CCL22</i>	3.0336672	1.9503E-05	5.93E-05	8.1129962	2.595E-29	8.506E-28	<i>SI00A14</i>	11.112261	3.603E-27	6.655E-26	14.387069	1.57E-46	2.7E-44
<i>CCL24</i>	3.7695502	5.0333E-05	0.0001449	7.0155517	5.4E-19	7.89E-18	<i>SELE</i>	11.006575	1.329E-26	2.356E-25	7.3622851	8.79E-10	6.12E-09
<i>CCL8</i>	4.3755236	5.5061E-12	3.204E-11	3.2733624	5.546E-07	2.976E-06	<i>UMOD</i>	18.750467	5.436E-70	9.84E-66	15.446517	1.69E-52	5.67E-50
<i>CX3CL1</i>	14.15406	4.403E-44	5.574E-42	12.821656	9.466E-38	6.418E-36	<i>VEGFA</i>	2.8303863	2.622E-08	1.09E-07	3.8199018	6.35E-13	5.79E-12
<i>CXCL10</i>	2.4584281	1.0225E-06	3.606E-06	2.0687822	3.125E-05	0.0001361	<i>VEGFD</i>	7.5690719	4.418E-18	4.161E-17	3.2662794	0.016281	0.043643

**Table 3.** Up-regulated genes in Chr biopsy and urine associated with the leukocyte migration process (GO:0050900), which was the process with the highest enrichment. The 29 genes associated with this process were obtained from the 67 immune DEGs identified in Chr biopsy and urine. The levels of expression and statistical significance are shown as a function of logFC and FDR, respectively, for each of the samples.

**OVERLAPPED IN BLOOD AFTER COMPARISONS WITH BIOPSY AND URINE=48**

<i>SYMBOL</i>	<i>VS BIOPSY</i>			<i>VS URINE</i>			<i>SYMBOL</i>	<i>VS BIOPSY</i>			<i>VS URINE</i>		
	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>		<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>	<i>logFC</i>	<i>PValue</i>	<i>FDR</i>
<i>BLK</i>	-2.735981	9.5603E-08	3.747E-07	-3.354569	5.292E-10	3.774E-09	<i>KLRC2</i>	-2.45794	3.52E-06	1.168E-05	-4.733172	2.28E-12	1.99E-11
<i>BMX</i>	-4.806428	4.5234E-17	3.914E-16	-2.854845	4.342E-08	2.608E-07	<i>KLRC3</i>	-2.070299	8.505E-05	0.0002374	-5.439703	5.77E-12	4.89E-11
<i>CAMP</i>	-9.390328	5.9028E-38	3.18E-36	-4.593531	1.928E-16	2.305E-15	<i>KLRC4</i>	-2.765875	2.104E-07	7.925E-07	-9.562579	7.79E-19	1.12E-17
<i>CCR2</i>	-3.126313	1.2729E-09	6.019E-09	-2.688371	1.125E-07	6.475E-07	<i>KLRD1</i>	-2.685176	1.219E-07	4.729E-07	-3.448913	8.25E-11	6.36E-10
<i>CCR4</i>	-3.379661	1.0898E-10	5.692E-10	-2.63933	2.304E-07	1.284E-06	<i>LAX1</i>	-2.169977	1.511E-05	4.652E-05	-3.499812	1.35E-10	1.03E-09
<i>CCR6</i>	-2.232944	0.00087551	0.0021171	-2.235805	0.0040528	0.0126556	<i>LCK</i>	-3.188415	6.598E-10	3.202E-09	-2.603251	2.57E-07	1.43E-06
<i>CCR7</i>	-4.805858	7.5138E-18	6.929E-17	-3.719172	2.508E-12	2.185E-11	<i>MARCHF1</i>	-2.707467	8.531E-08	3.355E-07	-2.104167	2.08E-05	9.25E-05
<i>CDID</i>	-2.76864	5.7301E-08	2.289E-07	-2.763984	7.211E-08	4.234E-07	<i>MPL</i>	-3.936649	9.972E-13	6.153E-12	-5.20517	2.76E-17	3.51E-16
<i>CD226</i>	-3.001651	4.5012E-09	2.026E-08	-4.014022	7.531E-14	7.346E-13	<i>PF4</i>	-6.681302	2.015E-27	3.808E-26	-6.174134	1.77E-24	3.99E-23
<i>CD244</i>	-2.590397	3.0932E-07	1.15E-06	-2.586879	3.757E-07	2.047E-06	<i>PF4V1</i>	-6.119931	1.005E-23	1.432E-22	-5.623711	4.79E-21	8.14E-20
<i>CD28</i>	-3.81241	1.1019E-12	6.771E-12	-3.634034	1.254E-11	1.034E-10	<i>PPBP</i>	-7.713572	5.504E-33	1.733E-31	-5.48451	3.06E-21	5.29E-20
<i>CLEC12B</i>	-4.852915	5.7736E-17	4.963E-16	-3.527468	1.328E-10	1.009E-09	<i>RNASE2</i>	-6.318784	4.285E-25	6.822E-24	-3.129025	1.77E-09	1.2E-08
<i>CLEC4C</i>	-4.66964	1.3715E-14	9.77E-14	-4.533076	7.956E-13	7.183E-12	<i>RNASE3</i>	-8.481276	1.099E-31	3.057E-30	-5.252406	1.13E-18	1.6E-17
<i>CRTAM</i>	-2.351819	3.98E-06	1.311E-05	-2.890603	4.651E-08	2.789E-07	<i>THEMIS</i>	-2.697742	9.672E-08	3.787E-07	-4.144192	2.73E-14	2.75E-13
<i>CXCR5</i>	-3.584619	3.244E-11	1.771E-10	-2.758955	2.002E-07	1.125E-06	<i>TRAT1</i>	-4.017354	1.063E-13	7.079E-13	-5.163954	1.15E-18	1.62E-17
<i>DEFA3</i>	-6.786723	7.243E-23	9.634E-22	-4.761302	9.258E-15	9.744E-14	<i>TRAV14DV4</i>	-3.412203	2.773E-09	1.272E-08	-3.219208	2.63E-07	1.45E-06
<i>DEFA4</i>	-7.078787	2.1932E-27	4.118E-26	-5.381772	1.294E-19	1.984E-18	<i>TRAV19</i>	-2.782112	1.786E-07	6.782E-07	-2.725549	1.34E-06	6.88E-06
<i>ELANE</i>	-7.65888	1.8668E-31	5.036E-30	-5.548363	4.071E-21	6.991E-20	<i>TRAV2</i>	-2.841096	1.461E-06	5.058E-06	-4.261147	2.09E-08	1.3E-07
<i>EOMES</i>	-2.402902	1.6453E-06	5.658E-06	-2.826689	3.986E-08	2.406E-07	<i>TRAV38-2DV8</i>	-2.297428	4.056E-05	0.0001182	-3.326287	3.97E-07	2.16E-06
<i>GCSAM</i>	-2.874716	3.0901E-08	1.274E-07	-4.731844	1.235E-15	1.398E-14	<i>TRDVI</i>	-2.810153	1.461E-07	5.608E-07	-4.214977	1.7E-11	1.38E-10
<i>IGHV3-35</i>	-4.495559	2.3245E-09	1.075E-08	-4.29658	1.089E-07	6.279E-07	<i>TREML4</i>	-10.9354	1.869E-27	3.558E-26	-2.544317	6.36E-07	3.39E-06
<i>IGLV3-12</i>	-3.046639	2.3179E-07	8.7E-07	-3.577176	2.547E-07	1.412E-06	<i>TXK</i>	-2.82177	3.04E-08	1.255E-07	-2.727752	8.58E-08	4.99E-07
<i>IL2RB</i>	-2.663203	1.355E-07	5.22E-07	-2.007684	4.926E-05	0.0002091	<i>UBASH3A</i>	-2.691515	1.148E-07	4.463E-07	-3.366637	1.76E-10	1.31E-09
<i>ITK</i>	-3.568642	1.0601E-11	6.018E-11	-4.028378	7.735E-14	7.54E-13	<i>ZAP70</i>	-3.250199	3.353E-10	1.664E-09	-3.880823	3.49E-13	3.25E-12

**Table 4.** Up regulated genes in peripheral blood of Chr associated with the immune response process (GO:0006955), which was the process with the highest enrichment. The 35 genes associated with this process were obtained from the 51 immune DEGs identified in Chr blood. The levels of expression and statistical significance are shown as a function of logFC and FDR, respectively, for each of the samples.

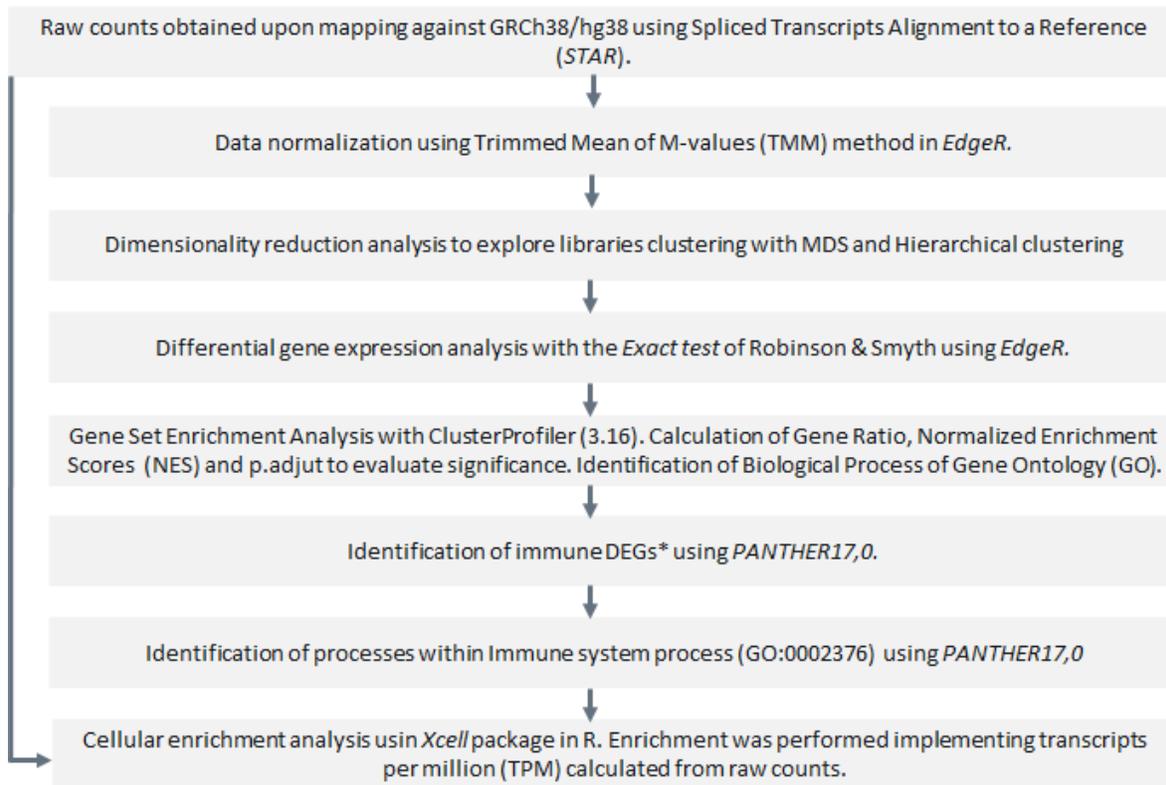
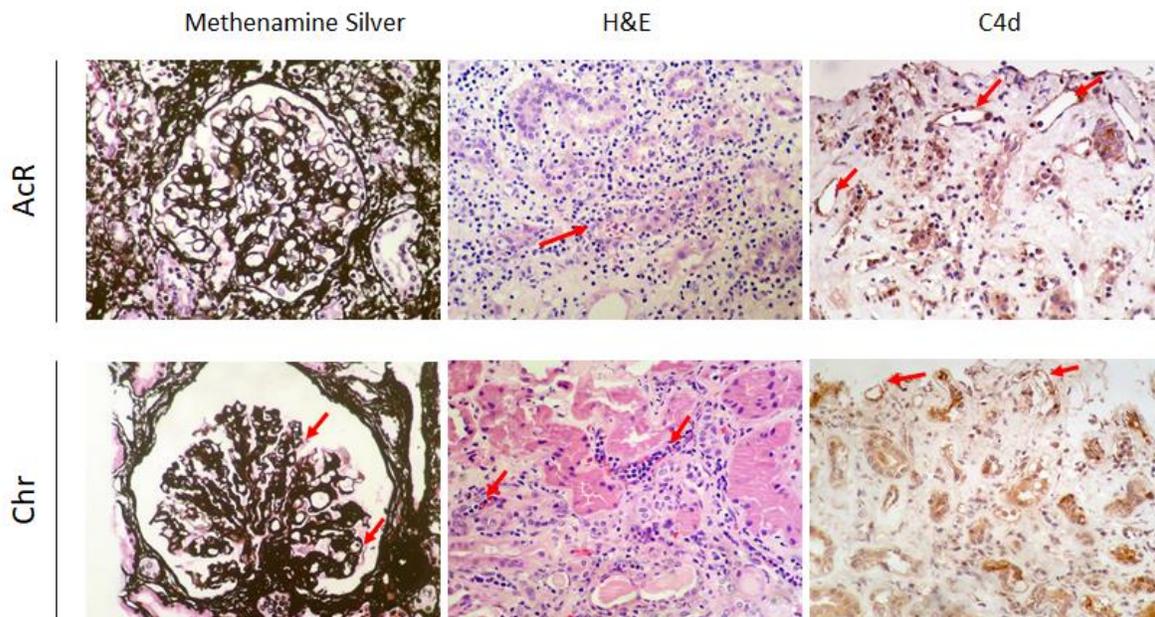
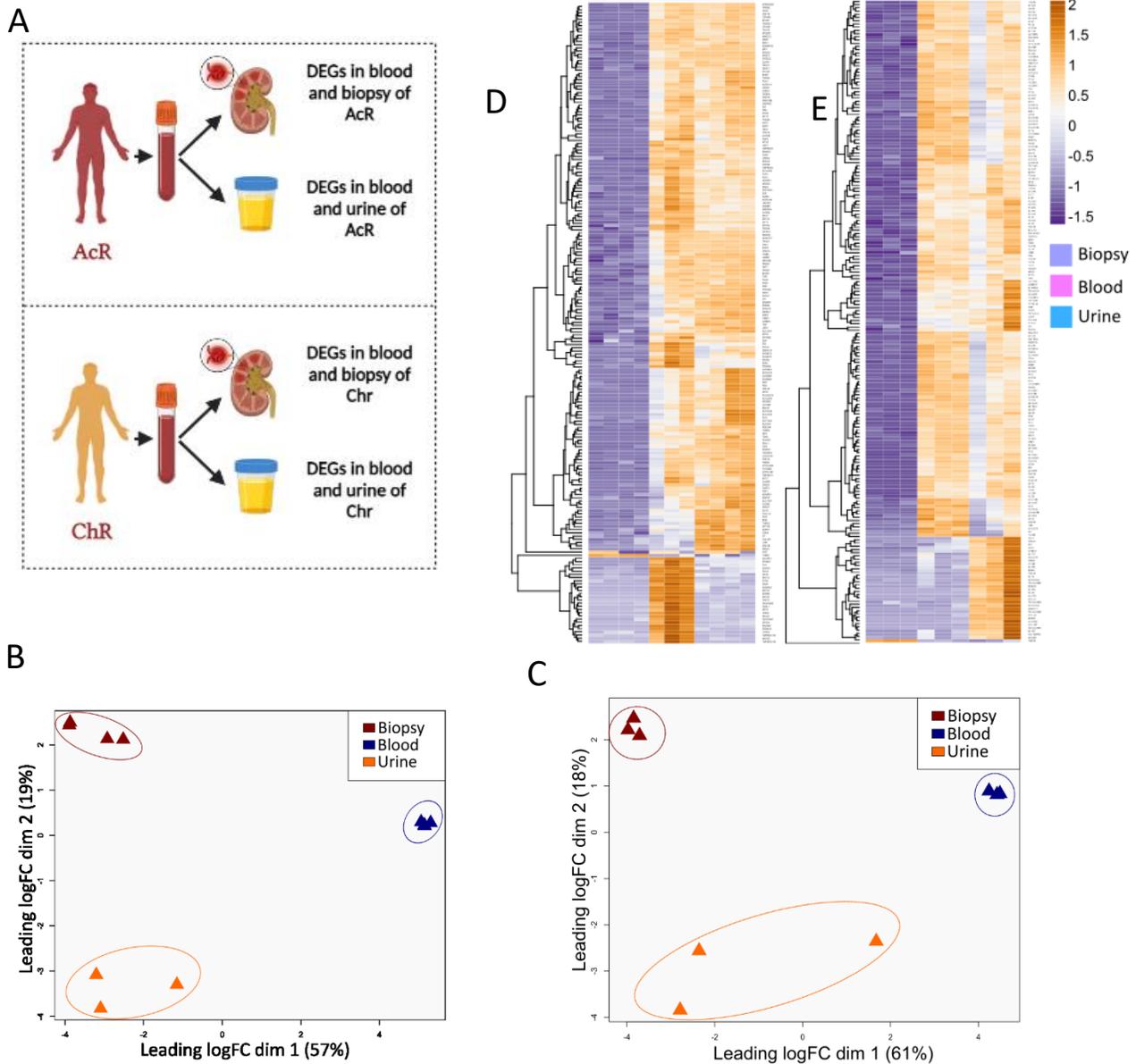


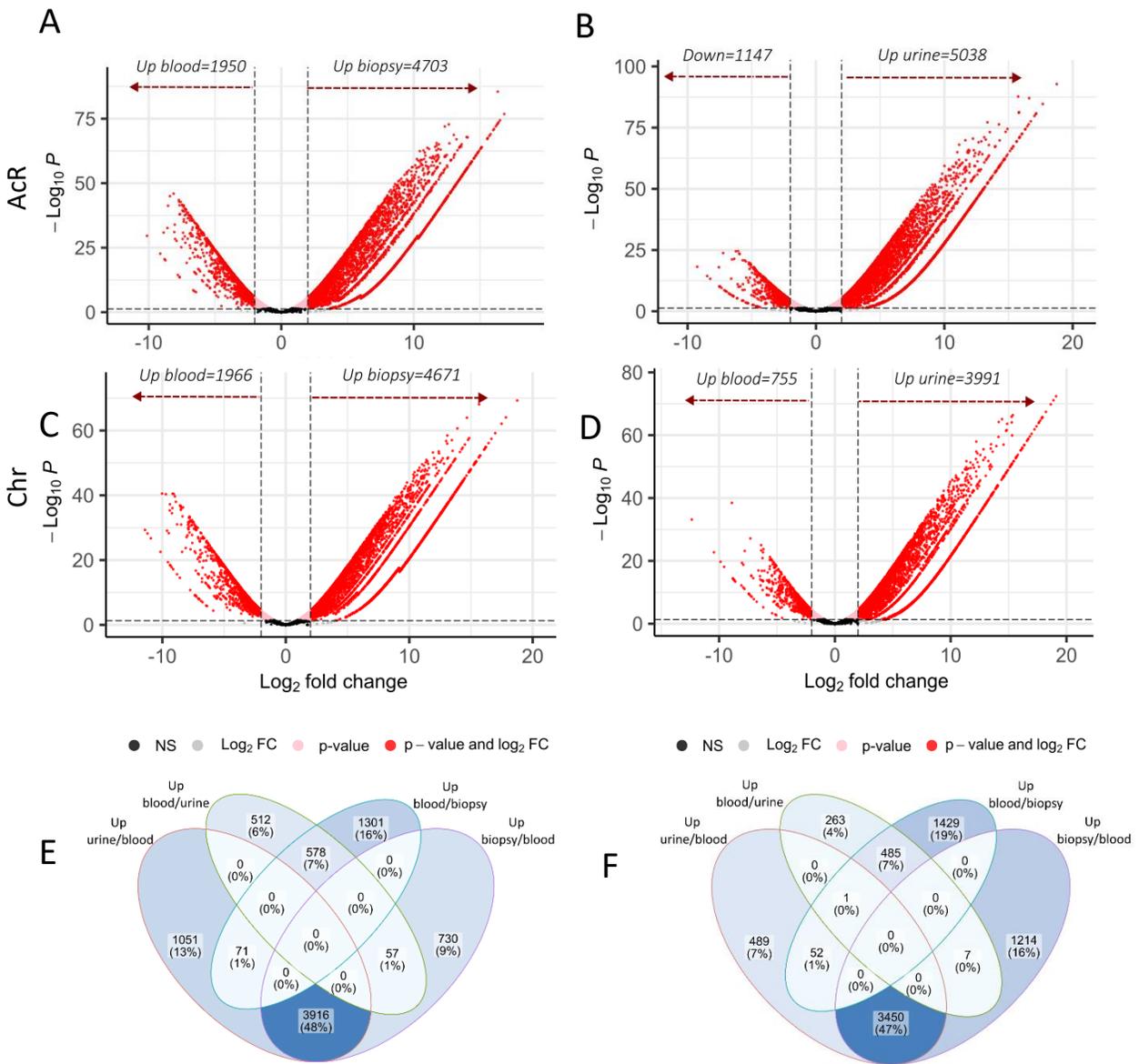
Figure 1. General methodology for library screening, differential gene expression analysis, functional analysis, and cell enrichment analysis. \*The genes annotated in the GO immune system process category (GO: 0002376) were named in this way.



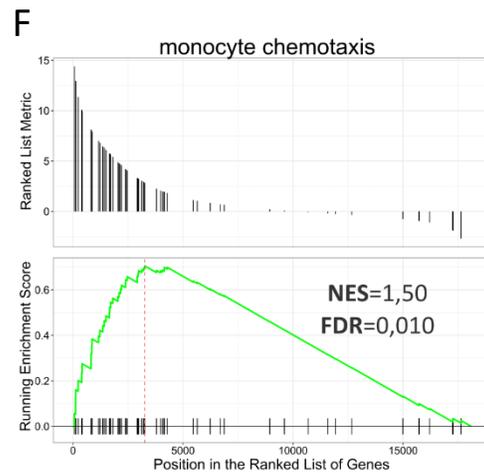
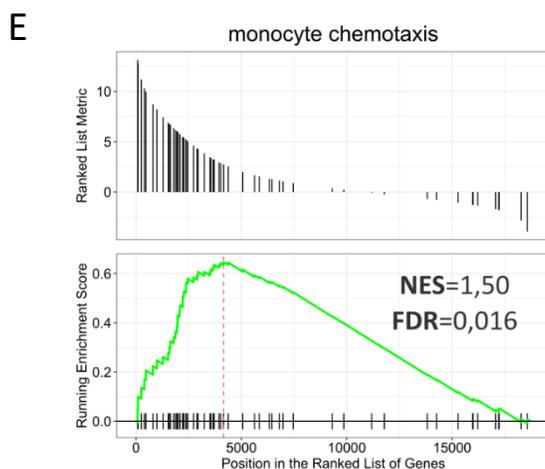
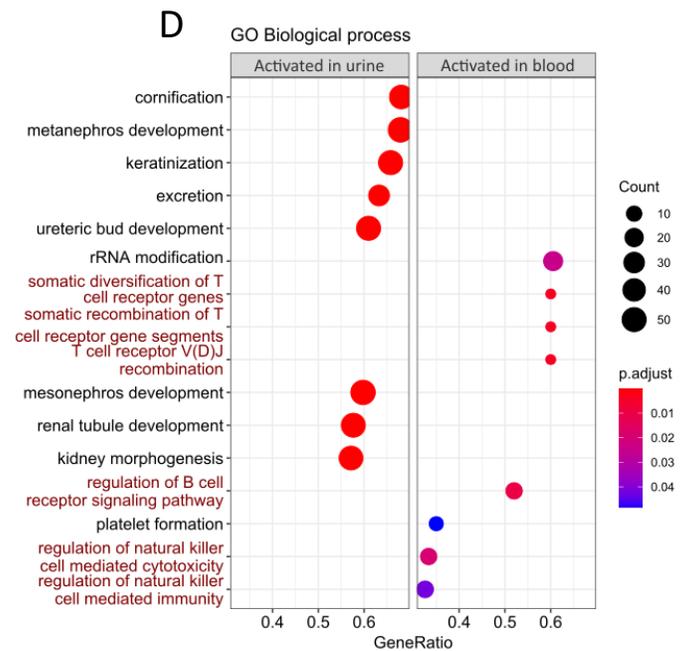
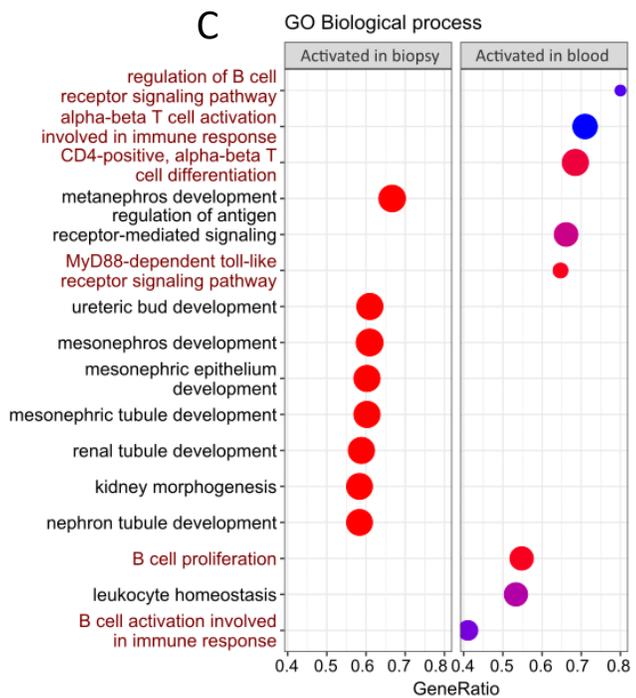
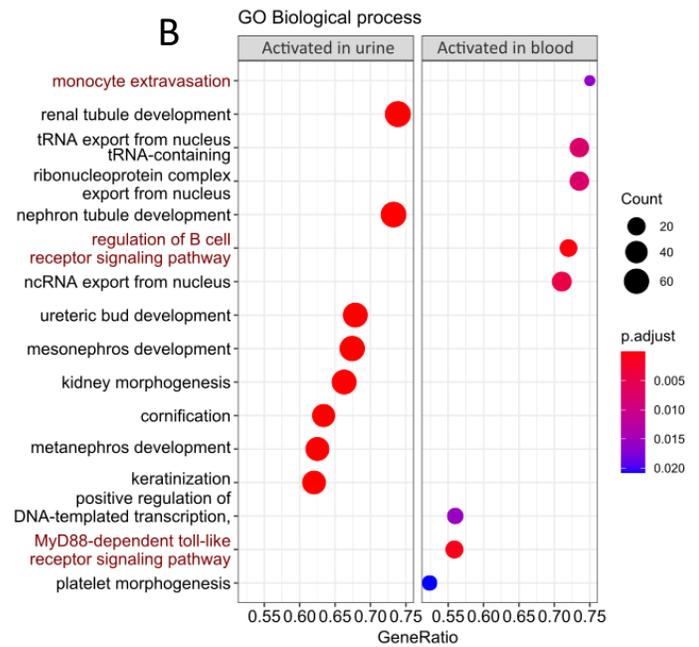
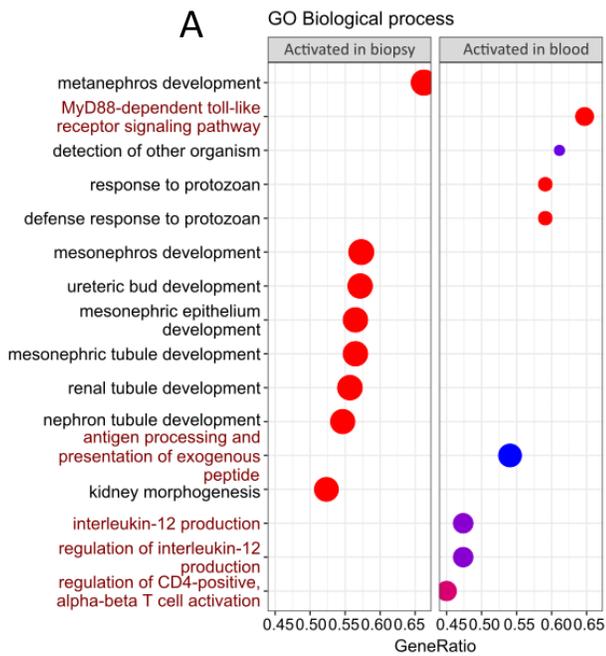
**Figure 2.** Histopathologic findings in AcR and Chr. AcR, methenamine silver staining shows lymphocytic infiltrate within the tubular epithelium, suggestive of tubulitis, indicative of TCMR. In H&E, T-cell-mediated acute rejection is observed in the renal cortex, with dense infiltrate inflammation, tubulitis and inflammatory destruction of some tubules (red arrow), consistent with t3 tubulitis based on the Banff score. C4d positivity is seen in some peritubular capillaries. In Chr, methenamine silver staining shows a glomerulus with thick and wrinkled capillary walls, with some double contours (red arrows) consistent with chronic graft glomerulopathy. This finding is consistent with chronic ABMR. In H&E a noticeable peritubular capillaritis is observed, and C4d deposits in the endothelium of capillaries.



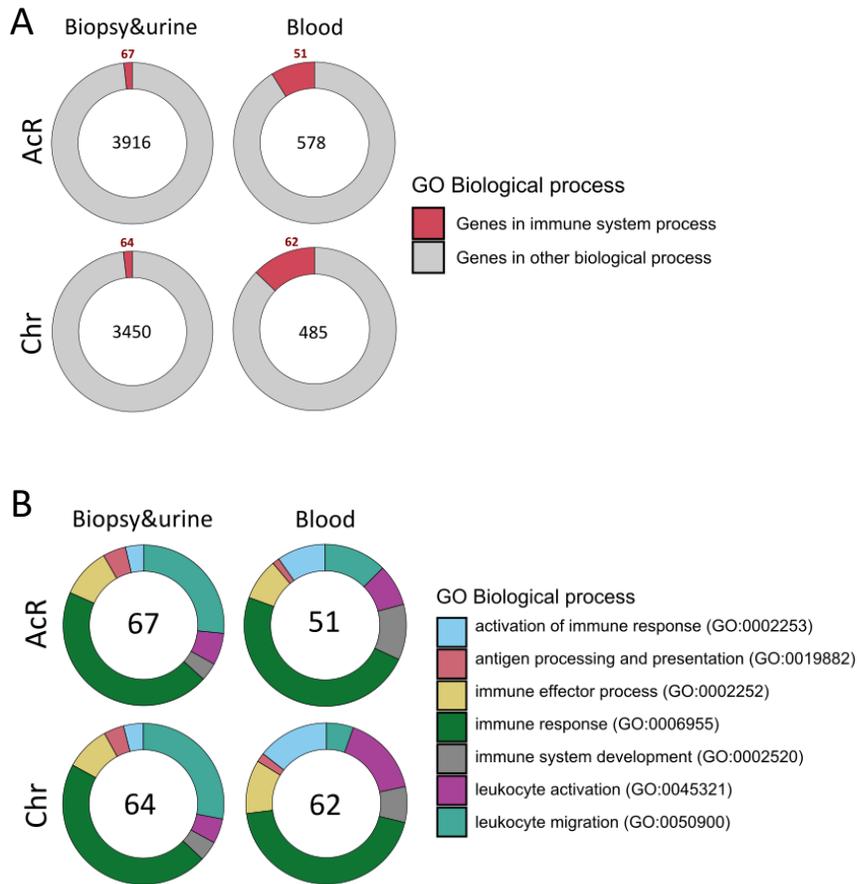
**Figure 3.** TMM normalized data from AcR and Chr sequenced blood, biopsy, and urine libraries were analyzed by dimensionality reduction with Multidimensional Scaling (MDS) and unsupervised Hierarchical Clustering (HC). In both cases, the Euclidean distance was used as the metric. **A.** Comparisons by type of sample for gene expression analysis. **B, C.** MDS from the AcR (B) and Chr (C) patient libraries. In both cases, the formation of three clusters was observed depending on the type of sample. The distance between the biopsy and urine samples was much smaller than the distance between both samples and peripheral blood, suggesting that there is a significant transcriptional signature between kidney tissue and urine. **D, E.** HC from the AcR (D) and Chr (E) patient libraries. As in the MDS, in both heatmaps the grouping of the libraries according to the type of sample was observed, as well as a lower Euclidean distance between the biopsy and urine samples in relation to peripheral blood.



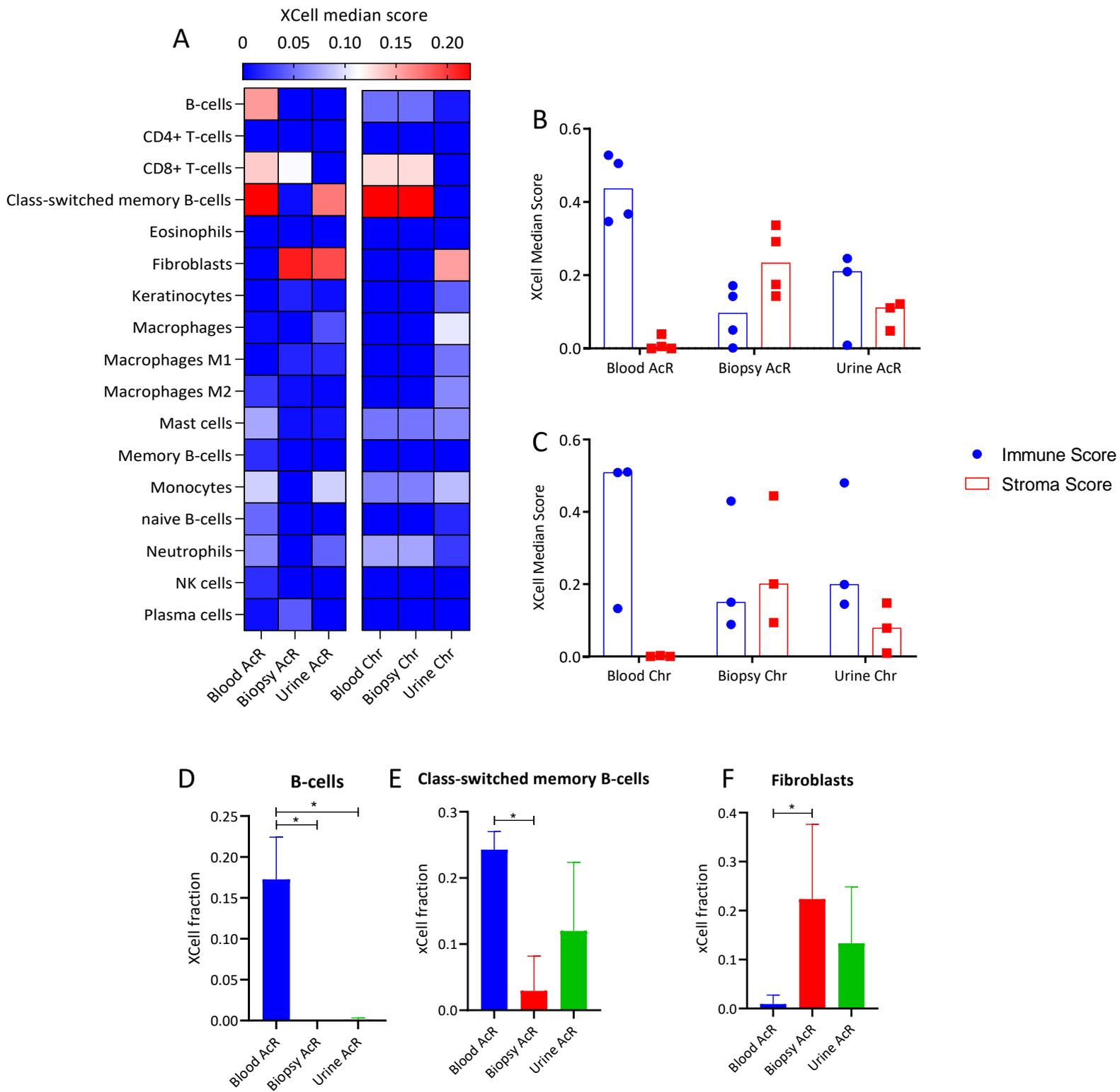
**Figure 4.** Analysis of differential gene expression in blood, biopsy, and urine of AcR and Chr. For each outcome, a comparison was made between peripheral blood and biopsy and peripheral blood and urine using the Robinson and Smyth Exact Test from which they were obtained. differentially expressed genes (DEGs). **A, B.** Volcano plots with the DEGs between peripheral blood and biopsy (A) and peripheral blood and urine (B) of AcR. **C, D.** Volcano plots with the DEGs between peripheral blood and biopsy (D) and peripheral blood and urine (E) of Chr. Expression levels are shown as a function of logFC (X-axis), for which it was considered a minimum value of 2; and  $-\log_{10}p.adjust$  (Y axis), for which there was a minimum value of 0.05. Genes with negative logFC were considered as up-regulated genes in peripheral blood, both in AcR and Chr. **E, F,** Venn diagrams showing up-regulated and down-regulated genes in blood, biopsy, and urine in AcR (E) and Chr (F). For each case, the exclusive genes in each sample are shown, as well as those shared by biopsy and urine, and those that overlap in peripheral blood after the comparison with biopsy and urine.



**Figure 5.** Unsupervised Gene Set Enrichment Analysis from the DEGs obtained in blood, biopsy and urine of AcR and Chr. **A, B.** Dotplots showing the biological processes activated in peripheral blood and biopsy (A) and peripheral blood and urine (B) in AcR. In both cases, a greater enrichment of immunological processes was observed in peripheral blood, while in biopsy and urine, more enriched processes associated with renal morphology and function were found. **C, D.** Dotplots showing activated biological processes in peripheral blood and biopsy (C) and peripheral blood and urine (D) in Chr. In both cases, a greater enrichment of immunological processes is observed in peripheral blood, while in biopsy and urine, more enriched processes associated with renal morphology and function were found. In each plot, the statistical significance based on the adjusted p, and the enrichment of each process based on the number of associated genes are shown. **E, F.** GSEA plots showing enrichment of urinary monocyte chemotaxis category of AcR (E) and Chr (F).



**Figure 6.** Enrichment of immune DEGs in peripheral blood, biopsy and urine of AcR and Chr. **A.** From the up regulated DEGs shared by biopsy and urine and overlapped in peripheral blood from the comparison with biopsy and urine, we obtained the immune DEGs, whose fraction was higher in peripheral blood than in biopsy and urine in AcR and Chr. **B.** The immune DEGs were reanalyzed to identify the immunological processes associated with them. In each figure the number of genes of genes analyzed are shown.



**Figure 7.** Cellular enrichment analysis in peripheral blood, biopsy, and urine of AcR and Chr. **A, B.** Subtypes of immune cells and stromal cells enriched in the different samples in AcR (A) and Chr (B). **C.** scores associated with immune cells, stromal cells and the microenvironment in peripheral

blood, biopsy, and urine of AcR and Chr. The immune score and stromal score were calculated from the sum of the score of the cell subtypes associated with the response immune and stromal. The microenvironment score was obtained from the sum of the immune score and the stromal score. All calculations were made from cell enrichment analysis using XCell. Data is shown based on the average XCell score.

**CAPÍTULO IV: PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA  
DIFERENCIAL Y ANÁLISIS DE PROCESOS Y CATEGORÍAS  
FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RESPUESTA INMUNE EN  
CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN PROCESO DE  
HEMODIÁLISIS Y PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN  
CON RECHAZO AGUDO, RECHAZO CRÓNICO Y  
SUPERVIVENCIA DEL INJERTO A LARGO PLAZO.**

## **4 CAPÍTULO IV: PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL Y ANÁLISIS DE PROCESOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RESPUESTA INMUNE EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN PROCESO DE HEMODIÁLISIS Y PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN CON RECHAZO AGUDO, RECHAZO CRÓNICO Y SUPERVIVENCIA DEL INJERTO A LARGO PLAZO.**

### **4.1 Introducción**

La hemodiálisis es considerada la primera elección de terapia de reemplazo renal en pacientes con enfermedad renal crónica terminal (1). La diálisis y la enfermedad renal crónica generan un nivel de inflamación en los pacientes, caracterizado por el incremento en los niveles séricos de proteína C reactiva e IL-6 (2), lo cual hace muy probable que en los pacientes sometidos a hemodiálisis se genere un ambiente proinflamatorio mediado por la regulación de genes que posteriormente pueden generar procesos inmunológicos como el rechazo agudo o el rechazo crónico, o que por el contrario, estén asociados a un perfil regulador asociado a la supervivencia del injerto. De esta manera, la diálisis y la enfermedad renal crónica marcarían un punto previo importante respecto al posterior desenlace del injerto renal

En el contexto del trasplante renal, la biopsia constituye la muestra de elección para el diagnóstico histopatológico de rechazo y otros eventos que afectan la función del injerto renal, como el rechazo subclínico, nefrotoxicidad por medicamentos, infecciones o recurrencia de glomerulonefritis, entre otras, (3) así como para la identificación de los mecanismos efectores implicados en su desarrollo, como la infiltración celular o el depósito de anticuerpos en el parénquima renal y el endotelio (4). Sin embargo, constituye al mismo tiempo un procedimiento invasivo que puede comprometer la integridad del injerto, ya que el daño mecánico producido puede exacerbar la inflamación (5). Dada la importancia del trasplante como terapia de reemplazo en los pacientes con enfermedad renal crónica y de la necesidad de dar un diagnóstico rápido y certero ante la sospecha de rechazo sin que se vea comprometida la integridad del órgano, se hace necesaria la identificación de biomarcadores en muestras menos invasivas que permitan diferenciar entre desenlaces del injerto, y que al mismo tiempo permitan comprender y elucidar los mecanismos efectores de la respuesta inmune implicados en cada uno desde una perspectiva molecular mediante análisis funcionales a partir de diferencias en la expresión génica.

Dado que los pacientes en diálisis presentan un estado inflamatorio crónico y que el rechazo agudo, el rechazo crónico y la supervivencia del injerto son procesos mediados por mecanismos efectores de

la respuesta inmunológica, el objetivo de este trabajo fue identificar diferencias a nivel transcripcional y funcional analizando el RNA aislado de sangre periférica de pacientes en diálisis y pacientes trasplantados con estos desenlaces, con el fin de proponer moléculas y/o procesos y categorías funcionales. La sangre es por excelencia una muestra idónea para la identificación de biomarcadores debido a su disponibilidad, fácil obtención, alta celularidad y poca invasividad. Además, constituye una muestra de alto valor para el logro del objetivo de este trabajo particularmente con los pacientes en diálisis ya que el estudio a partir de orina se dificulta por la nula o baja micción asociada a su condición clínica.

En estudios previos, enfocados en la identificación de diferencias en la expresión génica en sangre periférica de pacientes trasplantados de riñón, se abordaron los cambios asociados a la regulación de genes y vías funcionales, relacionados con la inmunosupresión en pacientes que no habían tenido episodios de rechazo. En uno de estos, en el que se realizó secuenciación de RNA, se encontró que una semana posterior al trasplante, se regularon positivamente genes como *ABLIM3*, *ADAM15*, *BMP6*, *GNG11*, *MMP8*, *MMP9*, *MYL9*, *PLXNB2*, *PRKAR2B*, *TUBB1*, *TUBB6* y *WNT5B* que desde una perspectiva funcional se encontraron asociados a la migración celular, por lo cual, los autores concluyeron que aún bajo terapias inmunosupresoras existe un nivel de activación inmunológica implicada en la respuesta frente al injerto (6). Otros autores se han enfocado en la identificación de perfiles moleculares asociados al rechazo. Van Loon y colaboradores identificaron un perfil de 8 genes conformado por *CXCL10*, *FCGRIA*, *FCGR1B*, *GBP1*, *GBP4*, *IL15*, *KLRC1* y *TIMP1* en una cohorte de descubrimiento implementando microarreglos. Posteriormente, los genes fueron validados, encontrando que podían diferenciar con una sensibilidad significativa entre pacientes con rechazo mediado por anticuerpos y pacientes sin rechazo (7). Asimismo, Pineda y colaboradores reportaron en una cohorte de descubrimiento un panel de 102 genes (63 codificantes y 39 no codificantes) que permitían diferenciar entre rechazo mediado por anticuerpos, rechazo mediado por células T y pacientes con función estable del injerto en sangre periférica de estos pacientes (8). En general, en estos estudios enfocados en la identificación de diferencias en la expresión génica, se han identificado a su vez procesos asociados a los mecanismos inmunes que median el rechazo, como el proceso de alorreconocimiento. Sin embargo, se desconoce si previo al trasplante, en el momento en el que el paciente es sometido a hemodiálisis, se da la regulación de genes a nivel de sangre periférica, que puedan estar asociados a los mecanismos efectores observados en el rechazo.

Nuestros objetivos en esta parte del trabajo fueron, primero, identificar en sangre periférica genes y procesos biológicos comunes entre los pacientes trasplantados con rechazo y con supervivencia y del injerto, y los pacientes en hemodiálisis y evaluar si en estos últimos se dan procesos inmunológicos

que influyan posteriormente en el desenlace del injerto. Estas diferencias fueron identificadas a partir del análisis de expresión diferencial respecto a un grupo control. Segundo, identificar diferencias en la expresión génica entre pacientes trasplantados con rechazo versus supervivencia del injerto, e identificar posibles perfiles moleculares asociados a cada uno.

Para esto, se secuenció el RNA aislado de sangre total de pacientes trasplantados con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo, y de pacientes con enfermedad renal sometidos a hemodiálisis. Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial y funcional dividido en dos partes: en la primera, el enfoque fueron los pacientes en diálisis y se identificaron diferencias en la expresión génica y a nivel funcional entre individuos sanos no trasplantados y pacientes trasplantados de riñón con rechazo o supervivencia del injerto, y los mismos individuos sanos y pacientes en hemodiálisis. A continuación, se identificaron genes asociados a sistema inmune comunes entre los pacientes trasplantados y los pacientes en hemodiálisis. De esta manera, se identificaron genes comunes a los pacientes en diálisis y los pacientes en rechazo y con supervivencia.

En la segunda los enfoques fueron el rechazo y la supervivencia del injerto y se identificaron diferencias entre los tres grupos de estudio (rechazo agudo, rechazo crónico y supervivientes); a partir de estas comparaciones se seleccionaron genes asociados funcionalmente al sistema inmune que podrían tener un rol fundamental en el rechazo o la aceptación.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Pacientes y controles**

Para la exploración de genes diferencialmente expresados (DEGs) y procesos funcionales asociados a estos, se incluyeron pacientes trasplantados de riñón con diagnóstico histopatológico de rechazo agudo (AcR, n=4), rechazo crónico (Chr, n=3), supervivencia del injerto a largo plazo (Sta, n=3); pacientes con enfermedad renal crónica sometidos a hemodiálisis (HD, n=4) y controles sanos, no trasplantados y sin ningún tipo de compromiso renal o inmunológico (HC, n=2). Los pacientes accedieron a participar voluntariamente mediante la firma del consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Los pacientes en rechazo fueron captados en la Unidad de Nefrología y del Programa de Trasplantes del Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín.

### **4.2.2 Muestras**

Se colectaron 4 mL de sangre periférica en tubos con EDTA de todos los pacientes e individuos de los diferentes grupos de estudio. Las muestras fueron transportadas de inmediato al laboratorio para su

procesamiento. De cada tubo se tomó un volumen de sangre correspondiente a  $16 \times 10^6$  leucocitos ( $\sim 1,5$  mL). A este volumen se adicionó Buffer EL (Qiagen) en proporción 1:5, se agitó vigorosamente en vórtex durante 20 S y se centrifugó a 400 xg por 10 min a 4°C. Seguidamente, se descartó el sobrenadante, se homogenizó el pellet en Buffer EL (1:2) y se centrifugó nuevamente a 400 xg por 10 min a 4°C. Al pellet se adicionó 1 mL de Tri Reagent (Sigma-Aldrich), 2  $\mu$ L de glicógeno y se agitó en vórtex hasta lisar completamente las células.

A cada muestra se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente se agitó en vórtex durante 15 S y se centrifugó a 12000 xg por 15 min a 4°C. Seguidamente se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1,5 mL y se agregó un volumen de isopropanol absoluto previamente refrigerado y 100  $\mu$ L de acetato de sodio. Las muestras fueron puestas a -20°C durante 30 min y se centrifugaron a 12000 xg por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 1 mL de etanol al 70%, 10000 xg por 10 min. El RNA fue resuspendido en 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y puesto en ultracongelación.

#### **4.2.3 Evaluación de la integridad, construcción de librerías y secuenciación**

La integridad del RNA se determinó con el porcentaje de transcritos con un tamaño igual o superior a 200 nt (%DV200). Las librerías de cDNA se prepararon en MacroGen con el kit Sure Select XT Direct Human (Agilent) a partir de 200 ng de RNA total. Para esto, se siguieron las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se realizó en MacroGen en la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, MacroGen), paired end, 150 pares de bases. De los datos generados se calcularon el total de reads, %GC, y los valores de Phred Score (%Q30) para determinar la calidad de la secuenciación.

#### **4.2.4 Análisis de datos**

En la figura 1 se muestra un panorama global de la metodología implementada para el análisis de datos. Los datos crudos fueron mapeados frente al genoma humano de referencia hg38 mediante el software Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (9). Asimismo, se realizó la limpieza de los datos con esta herramienta. A partir del mapeo se obtuvieron las cuentas crudas, con las que se construyó una tabla en la que se relacionan el número de cuentas para cada gen en cada una de las librerías secuenciadas. Esta tabla se utilizó como insumo para el análisis de expresión diferencial.

Los análisis fueron realizados en R (v4.1.2) mediante el paquete EdgeR (10) en RStudio. Inicialmente se realizó la anotación de los genes empleando BiomaRt (11). Con la anotación se obtuvieron los SYMBOLS de los genes, los biotipos génicos y la descripción de cada uno. Posteriormente se dio el

formato requerido a la tabla de datos y se obtuvieron las cuentas por millón (CPM) a partir de las cuales se removieron los datos con cuentas inferiores a 0,5. Seguidamente se realizó una exploración inicial de los datos por agrupamiento jerárquico de los 200 genes con mayor variabilidad.

Los datos fueron normalizados utilizando la función `calcNormFactors` con el método trimmed mean of M-values (TMM) y se obtuvo la tabla de cuentas efectivas con las que se realizaron los análisis subsecuentes.

#### **4.2.5 Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs)**

Para la determinación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) se aplicó el Exact Test de Robinson y Smyth, con un coeficiente de variación biológica de 0,4. Las comparaciones se realizaron por pares entre grupos de estudio (figura 1), en dos partes diferentes. En la primera, se identificaron diferencias entre los grupos de pacientes trasplantados y pacientes en hemodiálisis, con relación a HC. Posteriormente, a partir de los DEGs en cada caso, se identificaron genes comunes entre los pacientes trasplantados y pacientes HD. En el segundo enfoque, se buscaron diferencias en la expresión génica entre pacientes AcR, Chr y Sta, con el fin de identificar genes y procesos biológicos asociados al rechazo y a la supervivencia del injerto. De cada análisis se obtuvieron los valores p ajustados (FDR, test de Benjamini-Hochberg) y se consideraron significativos aquellos con un valor igual o inferior a 0,05. Adicionalmente se obtuvieron los valores del Log2 Fold Change (LogFC) y se consideraron como regulados positiva o negativamente los genes con LogFC mayor a 2 y LogFC menor a -2, respectivamente. Para tener información de los niveles de expresión de los dos grupos comparados con el test estadístico, se consideraron los genes regulados negativamente (valores de logFC negativos) como regulados positivamente en la contraparte.

#### **4.2.6 Análisis de enriquecimiento (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)**

En análisis de enriquecimiento se realizó con ClusterProfiler (v3.16) (12) en RStudio, utilizando la función `gseGO`. El análisis se hizo a partir de los DEGs totales obtenidos de cada una de las comparaciones. (Enfoque 1: AcR vs HC, Chr vs HC, Sta vs HC y HD vs HC. Enfoque 2: AcR vs Sta, Chr vs Sta y AcR vs Chr). La ontología seleccionada fue Biological process, con un cutoff de p.value de 0.05 y empleando el método de ajuste de Benjamini Hochberg. Posteriormente se exportaron los datos con información de la descripción de la categoría funcional, valores de score de enriquecimiento normalizado (NES) y valor p ajustado (p.adjust).

#### 4.2.7 Análisis de STRING

Para la primera parte, se seleccionaron los genes con logFC mayor o igual a 2 y un FDR menor o igual a 0.05 del set de genes, los cuales correspondieron a los genes regulados positivamente en AcR, Chr, Sta y HD en las comparaciones con HC, y los genes con logFC menor o igual a -2 y FDR menor igual a 0.05, los cuales correspondieron a los genes regulados positivamente en HC en relación a los demás grupos de estudio. Para el segundo enfoque, se seleccionaron los genes con logFC mayor o igual a 2 y un FDR menor o igual a 0.05 del set de genes, los cuales correspondieron a los genes regulados positivamente en AcR y Chr, en las comparaciones con Sta, y los genes con logFC menor o igual a -2 y FDR menor igual a 0.05, los cuales correspondieron a los genes regulados positivamente en Sta en relación con AcR y Chr. Estos mismos criterios se aplicaron a la comparación entre AcR y Chr. Cada set de genes se usó como insumo para el análisis en STRING v11 (13). A partir de este análisis se identificaron diferentes categorías funcionales que incluyeron procesos biológicos de Gene Ontology (GO) y categorías funcionales de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG), REACTOME y TISSUE. La selección de categorías con mayor enriquecimiento se hizo con base en el p ajustado (p.adjust). El análisis también se realizó en un segundo momento, posterior a la obtención de los immune DEGs a partir de los DEGs totales. Con esta segunda parte se buscó identificar las categorías funcionales y procesos de GO previamente descritos, asociadas específicamente a los genes anotados en la categoría funcional immune system process (GO:0002376).

#### 4.2.8 Identificación de genes inmunes y análisis de interacción proteína-proteína (P-P)

En la primera parte el total de DEGs en AcR, Chr y Sta, se comparó con el total de DEGs en HD con la función VennDiagram en Rstudio. A partir de esto, se obtuvo el número de genes comunes entre AcR y HD, Chr y HD, y Sta y HD. El número de genes comunes fue analizado mediante PANTHER17.0 y se identificaron los diferentes procesos biológicos de GO asociados. De estos procesos, se seleccionó *immune system process* (GO:0002376) y se identificaron los genes de este proceso biológico (genes inmunes). A continuación, cada set de genes inmunes fue reanalizado en STRING para identificar las principales categorías funcionales relacionadas, así como las interacciones P-P entre estos.

En la segunda parte, el total de DEGs en cada comparación, fue analizado mediante PANTHER17.0, y como se mencionó previamente, se identificaron los genes inmunes. Estos genes, fueron analizados

en STRING para identificar las principales categorías funcionales relacionadas, así como las interacciones P-P entre estos.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Primera parte: genes diferencialmente expresados y análisis funcional entre individuos sanos y pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico, supervivencia del injerto a largo y plazo y pacientes en hemodiálisis.**

##### **4.3.1.1 Exploración de librerías y análisis de expresión diferencial**

Para identificar diferencias transcripcionales entre las librerías secuenciadas se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico a partir de los datos normalizados en función de los 1000 genes con mayor variabilidad. Como se observa en la figura 2A, las librerías con mayor homogeneidad fueron las librerías de pacientes HD e individuos HC, ya que se agruparon cada uno en un único cluster. En los demás grupos, que corresponden a los pacientes trasplantados, se observó mayor heterogeneidad, especialmente en los pacientes AcR.

A continuación, se aplicó el Exact Test de Robinson & Smyth en EdgeR para calcular el número de DEGs. Para asumir la regulación de cada uno de los genes, se tuvo en cuenta un  $fdr \leq 0.05$  y un valor de  $\text{LogFC} \geq 2$  para los genes up-regulated y  $\leq 2$  para los down-regulated.

Para identificar los genes regulados según el desenlace del injerto en los pacientes trasplantados y aquellos que pudieran estar asociados al proceso de diálisis, realizamos en un primer momento el análisis de expresión diferencial en pacientes AcR, Chr, Sta y HD con relación a individuos HC. Para abordar la regulación de los diferentes genes de una manera más general y en la que se tuviera en cuenta a los dos grupos de estudio con los que se hizo cada comparación, los genes con un valor de  $\text{logFC}$  menor a 2 (regulados negativamente) se consideraron regulados positivamente en la contraparte. De esta manera, al realizar la comparación entre AcR y HC se encontraron 489 genes con regulación positiva en AcR y 344 regulados positivamente en HC (figura 2B). En la comparación Chr vs HC se identificaron 217/170 genes regulados positivamente, respectivamente (figura 2C); en la comparación Sta vs HC se encontraron 152/154 genes regulados, respectivamente (figura 2D) y en HD vs HC, 155/101 genes regulados positivamente, respectivamente (figura 2E). Estos resultados preliminares sugieren que en los pacientes AcR y Chr hay mayor nivel de regulación génica a nivel de sangre periférica con relación a los individuos HC, mientras que en los pacientes Sta y HD el nivel es similar a los individuos HC y a su vez, menor que en los pacientes AcR y Chr.

#### **4.3.1.2 Análisis funcional mediante GSEA y STRING en sangre periférica de pacientes AcR, Chr, Sta, HD e individuos HC**

Aunque en el análisis de expresión diferencial se observó que en AcR y Chr puede existir mayor nivel de regulación génica, teniendo en cuenta que en sangre periférica de estos pacientes se observaron más genes regulados positivamente, realizamos un análisis funcional a partir de los DEGs mediante GSEA no supervisado con el fin de identificar procesos biológicos de GO activados en cada uno de los grupos de estudio. A continuación, se describen los diferentes procesos biológicos y categorías funcionales de STRING identificadas a partir de las comparaciones entre los diferentes grupos de pacientes e individuos HC.

##### **4.3.1.2.1 Procesos biológicos de GO en AcR con relación a HC**

Con el análisis de GSEA no supervisado, se identificó que en pacientes AcR hubo un enriquecimiento de procesos asociados principalmente a la respuesta inmune, y específicamente, a la respuesta inflamatoria aguda. Estos procesos incluyeron: migración de neutrófilos, respuesta inmune humoral mediada por péptidos antimicrobianos, respuesta inflamatoria aguda, regulación positiva de la producción de IL-6, regulación positiva de la producción de quimiocinas y regulación positiva de la producción de factor de necrosis tumoral (figura 3A, panel izquierdo). Por su parte, en los individuos HC no se observó el enriquecimiento de procesos inmunes (figura 3 A, panel derecho).

Para ahondar más en las diferentes categorías funcionales asociadas a los DEGs en AcR vs HC, se realizó un análisis en STRING y se seleccionaron las categorías más enriquecidas en función de la significancia dada por el valor p ajustado (p.adjust). Las categorías enriquecidas en AcR vs HC incluyeron procesos como respuesta inflamatoria, activación de neutrófilos, activación de células mieloides, activación de leucocitos, proceso inmune efector, regulación de la producción de IL-1 $\beta$  y actividad del receptor de IL-1 (figura 3B). En HC vs AcR se encontraron enriquecidas categorías como adhesión y diferenciación celular, periferia celular y desarrollo de estructura anatómica. No obstante, no se identificaron enriquecidas categorías asociadas a la respuesta inmune (figura 3C).

##### **4.3.1.2.2 Procesos biológicos de GO en Chr con relación a HC**

A partir del GSEA se observaron enriquecidos en la comparación Chr vs HC proceso biológicos, que como se observó en AcR, estuvieron asociados a la respuesta inmune. Estos incluyeron regulación positiva de la producción de IL-1 $\beta$ , respuesta humoral mediada por péptidos antimicrobianos,

regulación positiva de la producción de IL-8, respuesta inmune humoral, y regulación positiva de la producción de IL-6 y de factor de necrosis tumoral (figura 3D, panel izquierdo). Al revisar las categorías funcionales de STRING, se encontró concordancia con el GSEA ya que se identificó el enriquecimiento de categorías como cascada del complemento y la coagulación, respuesta inmune humoral, activación celular, exocitosis regulada y degranulación de neutrófilos (figura 3E). Por su parte, en la comparación HC vs Chr se identificó el enriquecimiento de dos procesos biológicos asociados a la respuesta inmune, lo cuales fueron fagocitosis y regulación de la activación del complemento (figura 3D, panel derecho). No obstante, al explorar las categorías funcionales en STRING no se observó el enriquecimiento de procesos inmunes (figura 3F).

#### **4.3.1.2.3 Procesos biológicos de GO en Sta con relación a HC**

En el GSEA se observó que en la comparación Sta vs HC se enriqueció el proceso respuesta humoral antimicrobiana (figura 3G, Panel izquierdo), mientras que en HC vs Sta el único proceso inmune enriquecido fue fagocitosis (figura 3G, Panel derecho). Al explorar las categorías de STRING, se observó en Sta vs HC el enriquecimiento de inmunidad mediada por leucocitos, proceso inmune efector, migración de leucocitos y llamativamente, regulación de la respuesta inmune y regulación negativa de la inmunidad mediada por células T (figura 3H). En la comparación HC vs Sta se encontró redundancia en el enriquecimiento de la categoría dominio inmunoglobulina (figura 3I).

#### **4.3.1.2.4 Procesos biológicos de GO en HD con relación a HC**

En el GSEA de la comparación HD vs HC se encontró el enriquecimiento de los procesos respuesta humoral antimicrobiana y quimiotaxis de linfocitos (figura 3J, Panel izquierdo), mientras que en la comparación HC vs HD no se encontraron enriquecidos procesos asociados a la respuesta inmune (figura 3J, Panel derecho). En el análisis de STRING se identificó en los pacientes HD el enriquecimiento de categorías funcionales como organización de la matriz extracelular, regulación de la migración celular, respuesta inmune humoral, inmunidad mediada por leucocitos, degranulación de neutrófilos, regulación negativa de la producción de citoquinas y regulación de la activación del complemento (figura 3K). En los individuos HC no se identificaron enriquecidas categorías funcionales a partir de la comparación con HD.

Este último hallazgo sugiere que en los pacientes en hemodiálisis y que se encuentran en lista de espera para trasplante renal, existe una firma transcripcional que podría estar asociada a genes que se regulan positivamente en procesos como el rechazo o la tolerancia del injerto y que de alguna manera podrían influir en el desenlace del órgano posterior al trasplante. Con base en esto, el siguiente paso

fue identificar similitudes en los genes y procesos biológicos regulados positivamente (en relación con los individuos HC) entre los pacientes AcR, Chr y Sta y los pacientes en HD.

Inicialmente, se seleccionaron los genes regulados positivamente en AcR, Chr, Sta y HD con relación a HC. Posteriormente se compararon los DEGs de AcR, Chr y Sta, cada uno con los DEGs de HD, con el fin de identificar los genes compartidos entre cada desenlace y HD, y aquellos exclusivos de cada grupo de estudio. De esta manera, se identificaron 75 genes regulados positivamente entre AcR y HD, 72 genes entre Chr y HD, y 68 genes entre Sta y HD (figura 4A). Ya que nuestro propósito fue identificar genes y procesos inmunológicos que pudieran estar asociados al desenlace del injerto, cada set de genes compartidos fue re-analizado en PANTHER17.0 para identificar el número de genes asociado a diferentes procesos biológicos, y dentro de estos, a procesos implicados en el sistema inmune. Los procesos biológicos asociados a los genes compartidos por AcR y HD, Chr y HD y Sta y HD, se muestran en las tablas 1, 2 y 3, respectivamente.

#### **4.3.1.2.5 Genes y procesos inmunes asociados a los genes compartidos por AcR y HD**

Como se muestra en la tabla 1, entre AcR y HD se encontraron 6 genes asociados a procesos inmunes. Estos genes fueron: *HLA-DQA2*, *CCL18*, *DEFA4*, *ELANE*, *IGHV2-70D* y *HLA-DQB2* (tabla 4). A su vez, estos genes se encontraron subdivididos en diferentes procesos de la respuesta inmune. Los más enriquecidos fueron proceso inmune efector y activación de leucocitos, cada uno con 3 de los 6 genes (figura 4B). Al analizar los 6 genes inmunes mediante STRING, se encontró que dentro de los procesos inmunes con mayor significancia se encontraron respuesta inmune innata, actividad del receptor MHC de clase II y migración de leucocitos (Tabla 4). En el análisis de interacción proteína-proteína (P-P) se observó la interacción entre *HLA-DQA2* y *HLA-DQB2*, los cuales estuvieron asociados a las categorías respuesta inmune innata y actividad del receptor MHC de clase II, y de *ELANE* y *DEFA4* que se asociaron a respuesta inmune innata y migración de leucocitos (figura 4E).

#### **4.3.1.2.6 Genes y procesos inmunes asociados a los genes compartidos por Chr y HD**

En Chr y HD se identificaron 7 genes inmunes regulados positivamente compartidos por ambos grupos de estudio. Estos genes fueron: *TREML4*, *DEFA4*, *ELANE*, *HLA-DQA2*, *DEFA3*, *IGLV3-12* y *IGHV2-70D* (tabla 5). Estos se mapearon a su vez en diferentes procesos inmunes que incluyeron: proceso inmune efector, activación de leucocitos y producción de mediadores moleculares de la respuesta inmune (figura 4C). Al hacer un análisis de los 7 genes en STRING, se encontraron asociados a respuesta humoral, gránulos azurófilos y disrupción de membranas (Tabla 5). En el análisis de interacción proteína-proteína (P-P) se observó la interacción entre *ELANE*, *DEFA3* y *DEFA4* asociados a todas las categorías enriquecidas (figura 4F).

#### **4.3.1.2.7 Genes y procesos inmunes asociados a los genes compartidos por Sta y HD**

En esta comparación se identificaron 6 genes inmunes regulados positivamente, compartidos por Sta y HD. Los genes fueron: *HLA-DQA2*, *HLA-DQB2*, *DEFA4*, *ELANE*, *DEFA3* y *CLEC4G* (tabla 6). Estos genes se dividieron en diferentes procesos inmunes que incluyeron: presentación antigénica, proceso inmune efector, activación de leucocitos y producción de mediadores moleculares de la respuesta inmune (figura 4D). Al analizar los 6 genes mediante STRING, se encontraron enriquecidas categorías funcionales como respuesta inmune humoral, respuesta inmune innata y regulación de la respuesta inmune (Tabla 6). En el análisis de interacción proteína-proteína (P-P) se observó la interacción entre *ELANE*, *DEFA3* Y *DEFA4*; Y *HLA-DQB2* Y *HLADQA2*. No se observó ninguna interacción entre alguno de los genes y *CLEC4G* (figura 4G).

#### **4.3.2 Segunda parte: genes diferencialmente expresados y categorías funcionales en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo.**

Posterior al análisis de expresión diferencial en los pacientes trasplantados y pacientes en diálisis con relación a los individuos sanos, y a la identificación de perfiles de genes y procesos biológicos compartidos entre los pacientes trasplantados y los pacientes en hemodiálisis, continuamos con el abordaje de los genes diferencialmente expresados y procesos biológicos solo en los pacientes trasplantados con rechazo agudo, rechazo crónico y supervivencia del injerto a largo plazo.

##### **4.3.2.1 Análisis de expresión diferencial**

La identificación de los DEGs y anotación se realizó como se describió previamente. En este caso, el enfoque fue la identificación de genes regulados en las comparaciones AcR vs Sta, Chr vs Sta y AcR vs Chr. De esta manera, se identificaron genes y procesos biológicos que se regulan en sangre periférica en rechazo agudo y rechazo crónico con relación a la supervivencia del injerto a largo plazo y genes que se regulan en el rechazo agudo con relación al rechazo crónico. En cada comparación nuevamente se tuvo en cuenta que los genes regulados negativamente correspondían a los genes regulados positivamente en la contraparte.

En la comparación AcR vs Sta se identificaron 298/142 genes regulados, respectivamente (figura 5A, tabla suplementaria 2). En la comparación Chr vs Sta se identificaron 70/69 genes regulados, respectivamente (figura 5B), y en la comparación AcR vs Chr se identificaron 182/103 genes, respectivamente (figura 5C). En la comparación Chr vs Sta se encontró que del total de genes regulados (139), las fracciones correspondientes a cada desenlace fue similar (figura 5B), mientras

que en las comparaciones AcR/Sta y AcR/Chr del total de genes (440 y 285, respectivamente), la mayor fracción se encontró regulada positivamente en pacientes AcR (figuras 5A y 5C). Esto podría sugerir que a nivel de sangre periférica de pacientes AcR existe mayor nivel de regulación transcripcional, lo que, a su vez, podría estar asociado a un mayor nivel de actividad celular.

#### **4.3.2.2 Análisis funcional mediante GSEA y STRING en sangre periférica de pacientes AcR, Chr y Sta**

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento no supervisado para identificar los procesos biológicos de GO asociados a los DEGs en cada una de las comparaciones realizadas. Simultáneamente, realizamos el análisis en STRING para identificar otras categorías funcionales asociadas a los DEGs.

##### **4.3.2.2.1 Procesos biológicos de GO en AcR con relación a Sta**

Con el análisis de enriquecimiento a partir de los DEGs obtenidos de la comparación AcR vs Sta se encontraron múltiples procesos biológicos enriquecidos. Aunque la mayoría fueron procesos asociados al metabolismo mitocondrial o replicación del ADN, también se encontraron enriquecidos procesos inmunes. En AcR se observó el enriquecimiento de respuesta de fase aguda y regulación positiva de la activación de macrófagos, mientras que en Sta se observó únicamente el enriquecimiento de selección de células T (figura 6 A). Al hacer el análisis mediante STRING, en AcR se identificaron en su mayoría, categorías asociadas al sistema inmune, como actividad del receptor de IL-1, regulación de la respuesta inflamatoria, macrófagos M1 y regulación de la activación de leucocitos (figura 6B). Al realizar este análisis a partir de los DEGs en Sta, no se identificaron categorías asociadas a sistema inmune. Estas incluyeron únicamente matriz extracelular, región extracelular y digestión y absorción de proteínas (figura 6C).

##### **4.3.2.2.2 Procesos biológicos de GO en Chr con relación a Sta**

Al hacer el análisis funcional mediante GSEA a partir de los DEGs en Chr vs Sta, se observó que de los procesos enriquecidos en Chr, solo se encontró un proceso asociado a sistema inmune el cual fue establecimiento de polaridad de linfocitos. No obstante, su nivel de enriquecimiento y significancia estadística fueron bajos. Por su parte, en Sta, también se identificó un único proceso inmune el cual fue regulación de la activación del complemento. Los demás procesos identificados en el top de procesos enriquecidos en el GSEA también incluyeron metabolismo mitocondrial y traducción de

proteínas (figura 6D). Llamativamente, en el análisis en STRING no se encontraron categorías funcionales enriquecidas asociadas a los DEGs obtenidos de la comparación con Sta. En este último, por su parte, se observó el enriquecimiento de categorías funcionales como complejo de trímeros de colágeno, respuesta al estímulo de factor TGF- $\beta$ , regulación negativa de la migración celular y colágeno fibrilar, C-terminal (figura 6E).

#### **4.3.2.2.3 Procesos biológicos de GO en AcR con relación a Chr**

En el análisis de enriquecimiento a partir de esta comparación, se identificó un bajo número de procesos biológicos de GO. Sin embargo, dentro de los procesos se identificaron procesos inmunes tanto en AcR como en Chr. En AcR se observó el enriquecimiento de fagocitosis-reconocimiento y regulación de la activación del complemento. En Chr se observó levemente enriquecido el proceso de activación de neutrófilos y respuesta inmune humoral antimicrobiana (figura 6F). En el análisis en STRING se observó en AcR el enriquecimiento de categorías funcionales como membrana plasmática, macrófagos M1, señalización y quimiotaxis (figura 6G). Por otro lado, en Chr se observó el enriquecimiento de categorías como gránulos azurófilos, degranulación de neutrófilos y respuesta inmune humoral (figura 6H).

#### **4.3.2.3 Identificación de genes inmunes a partir de los DEGs en AcR, Chr y Sta.**

Para abordar específicamente los genes y los procesos inmunes, se seleccionaron los DEGs en cada una de las comparaciones realizadas, y se analizaron mediante PANTHER 17.0. A partir de este análisis, nos enfocamos en el proceso *immune system process* (GO:0002376), e identificamos el número de genes inmunes en cada caso (figura 7).

En la comparación entre AcR y sta se encontraron 10 y 6 genes inmunes, respectivamente. Sin embargo, la fracción de estos genes no difirió entre AcR y Sta respecto al total de genes diferencialmente expresados (figura 7 A). Entre Chr y Sta, se identificaron 4 y 10 genes inmunes, respectivamente. En este caso sí se observó que la fracción de genes inmunes fue mayor en Sta con relación a Chr (figura 7B), lo cual podría explicar la no identificación de categorías funcionales asociadas a la respuesta inmune en el análisis de STRING. Entre AcR y Chr, se identificaron 11 y 10 genes inmunes; las fracciones de estos genes respecto al total de genes diferencialmente expresados en cada caso, fue levemente mayor en Chr que en AcR (figura 7C).

Los genes inmunes fueron nuevamente analizados en STRING y se identificaron las categorías funcionales asociadas a estos. Es importante resaltar que las categorías observadas en cada caso

fueron concordantes con aquellas observadas en el GSEA y en el análisis en STRING con el total de DEGs.

La categoría más enriquecida asociada a los genes inmunes obtenidos de la comparación AcR vs Sta, fue respuesta inmune innata. Estos genes fueron: *CCL18*, *IGHV1-69*, *ITGA7*, *IGHV2-70D*, *CLEC12B*, *TLR5*, *TREM2*, *CCL23*, *TREML4* e *IGHV1-69-2*. De estos, el gen con mayor nivel de expresión y significancia fue *CCL18* (figura 7D, tabla 7).

En la comparación Sta vs AcR se observaron más categorías funcionales enriquecidas, las cuales incluyeron: señalización mediada por citoquinas, regulación de la migración de leucocitos y regulación de la respuesta inmune tipo 2. Los genes inmunes identificados fueron: *XCL1*, *CXCR3*, *PLVAP*, *IFNLI*, *IGKV1-6* e *IGLV7-43*. El gen que tuvo mayor nivel de significancia fue *XCL1* (figura 7E, tabla 8).

A partir de la comparación Chr vs Sta, no se observaron categorías funcionales, lo cual también sucedió en el análisis inicial en STRING. Los genes inmunes que se encontraron regulados fueron: *TREML4*, *IGHV1-69-2*, *IGHV2-70D* e *IGLV3-12*. El gen con mayor nivel de expresión y significancia fue *TREML4* (tabla 9).

De la comparación Sta vs Chr, se identificó la categoría funcional regulación negativa de la inmunidad mediada por células T, la cual estuvo determinada por los genes *CLEC4G* y *XCL1*. Los genes inmunes regulados fueron: *IGLC3*, *IGKVID-8*, *TMEM176B*, *IGHV3-53*, *XCL1*, *IGKVID-13*, *IGLV7-43*, *IGHV3-30*, *CLEC4G* e *IGHV3-64D* (figura 7F).

En AcR con relación a Chr, se observó el enriquecimiento la categoría familia intercrina alfa (pequeña citoquina C-X-C) (quimiocina CXC). Los genes inmunes asociados fueron: *IGHV3-30*, *IGHV4-31*, *IGHV1-69*, *CCL18*, *TMEM176B*, *IGHV5-10-1*, *ITGA7*, *IGHV3-64D*, *FLT3*, *IGKVID-8* y *CCL23* (figura 7G).

Finalmente, de la comparación AcR vs Chr, se encontraron enriquecidas las categorías gránulos azurófilos, respuesta inmune humoral y disrupción de membranas en otros organismos. Los genes inmunes fueron: *TREML4*, *ELANE*, *IGLV3-12*, *DEFA4*, *DEFA3*, *CCL3L3*, *RNASE3*, *TRDV3*, *CCL4L2* y *AHSP*. El gen con mayor nivel de expresión fue *TREML4* (figura 7H).

#### 4.4 Discusión y análisis

Teniendo en cuenta que el trasplante renal es la terapia de reemplazo idónea para los pacientes con enfermedad renal crónica (14), y que aún existen diferentes limitantes como el rechazo crónico que condicionan la supervivencia del injerto a largo plazo, se genera la necesidad tanto de conocer con mayor profundidad los mecanismos biológicos, y específicamente, los mecanismos inmunológicos y moleculares implicados en los desenlaces del injerto, como de identificar estrategias que permitan monitorear a los pacientes antes y después del trasplante, y de dar un diagnóstico certero en caso de que se presenten eventos adversos como el rechazo agudo o el rechazo crónico. Esto, a su vez, permitiría personalizar más las diferentes terapias tanto de mantenimiento para prevenir los desenlaces adversos, como aquellas requeridas para revertir el rechazo.

Con el diseño experimental propuesto en este trabajo, se buscó identificar diferencias en la expresión génica en pacientes trasplantados con rechazo agudo, rechazo crónico, supervivencia del injerto y en pacientes con enfermedad renal crónica que se encuentran en lista de espera para trasplante y que requieren de hemodiálisis, mediante la secuenciación de RNA aislado de sangre. La sangre periférica representa una muestra de interés para la identificación de diferencias en la expresión génica entre los diferentes desenlaces, ya que constituye el vehículo de las células del sistema inmune que median el rechazo y la aceptación del injerto. Además, en nuestros análisis previos identificamos que existen diferencias transcripcionales importantes entre la sangre periférica y el tejido renal, lo que sugiere que dichos cambios en la expresión génica entre un tejido y otro pueden estar asociados a los mecanismos que median el rechazo o la aceptación del injerto renal. Tanto en la primera como en la segunda parte, los análisis estuvieron encaminados a explorar desde lo general a lo específico. De esta manera, se identificaron inicialmente genes diferencialmente expresados (DEGs) y procesos biológicos globales, y a partir de estos los análisis se enfocaron específicamente en genes y procesos inmunes.

La exploración de diferencias en la expresión génica a nivel de sangre periférica en el contexto del trasplante renal se abordó en dos partes: la primera fue la identificación de genes diferencialmente expresados entre individuos sanos (HC), pacientes trasplantados con rechazo agudo (AcR), rechazo crónico (Chr) y supervivencia del injerto a largo plazo (Sta), y entre HC y pacientes en hemodiálisis (HD). De esta manera, se identificaron genes regulados que pudieran estar asociados al trasplante y a la hemodiálisis. Posteriormente, se seleccionaron los genes regulados positivamente en los pacientes trasplantados y se superpusieron con los genes regulados positivamente en los pacientes HD. Esto se hizo con el objetivo de identificar genes en HD que fueran comunes al rechazo y a la supervivencia

del injerto que pudieran estar asociados a un desenlace, previo al trasplante. La segunda parte se basó en la identificación de diferencias a nivel de la expresión génica entre pacientes trasplantados AcR, Chr y Sta con el objetivo de identificar genes y procesos biológicos diferenciales entre el rechazo y la supervivencia.

En el primer enfoque, en el análisis de expresión diferencial, se observó que el número de genes regulados entre HC y Sta y HC y HD fue similar, mientras que entre HC y AcR y HC y Chr fue mayor el número de genes regulados en los pacientes con rechazo. Asimismo, en AcR el número de genes regulados fue mayor con relación a los demás desenlaces. El número de genes regulados se asoció al nivel de actividad celular, lo cual, en los pacientes con rechazo puede estar relacionado a la activación celular requerida en los procesos inflamatorios que median estos desenlaces, ya sea de forma aguda o crónica.

A continuación, para evaluar esta posibilidad desde una perspectiva funcional, se realizó un análisis de enriquecimiento no supervisado y un análisis de categorías funcionales en STRING, en los que se identificaron procesos de Gene Ontology (GO) y otras categorías enriquecidas a partir de los (DEGs). En los hallazgos se observó que, efectivamente, en los pacientes AcR se enriquecieron procesos asociados a la respuesta inflamatoria aguda, a la migración de células como neutrófilos, activación de macrófagos, y producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Los neutrófilos son las células más abundantes en sangre periférica y son las primeras células en migrar al injerto posterior al trasplante (15,16). Los neutrófilos pueden llegar a ser activados por DAMPs producidos durante la lesión por isquemia/reperfusión, o por procesos inflamatorios asociados al trasplante, y tras esta activación pueden captar antígenos, y generar una respuesta mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o la liberación de trampas extracelulares (17,18) los cuales son mecanismos que ha sido previamente descritos en procesos como el rechazo agudo mediado por anticuerpos (19,20). Por su parte, los macrófagos juegan un papel esencial en la inflamación aguda, por su capacidad de fagocitar, procesar y presentar antígenos (21). En el contexto del trasplante, Banas y colaboradores, demostraron que la infiltración de macrófagos al tejido renal se encontraba elevada en un grupo de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo y además, identificaron una correlación entre la infiltración y la presentación antigénica, así como con los niveles de creatinina (22).

En los pacientes Chr se encontraron enriquecidos procesos asociados al sistema inmune que incluyeron respuesta humoral, y producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL8 e IL-6. El rechazo crónico está típicamente mediado por la respuesta humoral, y está asociado a la formación de tejidos linfoides terciarios que facilitan la activación de células B productoras de anticuerpos (23).

El papel de la IL-6 en el rechazo crónico también es de gran importancia. Esta citoquina está implicada en la inducción de la respuesta humoral ya que estimula la producción de IL-21 por parte de células TCD4+, la cual actúa en la activación, expansión clonal y maduración de células B, requeridas para la producción de anticuerpos (24). Asimismo, la IL-21 se ha encontrado asociada a la regulación de rechazo crónico en modelos murinos de trasplante cardiaco (25). Igualmente, la IL-6 se ha propuesto como un blanco terapéutico en pacientes trasplantados de riñón con rechazo crónico mediado por anticuerpos, con el uso de Clazakizumab, ya que tras su uso en pacientes se ha observado una mejoría en las tasas de filtración glomerular y disminución de los depósitos de C4d en biopsias de pacientes (26). Llamativamente, en este análisis se observó que la regulación de activación del complemento estuvo más enriquecida en HC que en Chr. No obstante, al realizar el análisis en STRING, se encontró que en Chr hubo un enriquecimiento de la categoría cascadas de la coagulación y el complemento, lo cual sugiere que, si bien en los individuos HC hay mayor regulación de esta vía, en los pacientes Chr hay mayor nivel de activación de ambas vías, las cuales han sido ampliamente reportadas en rechazo crónico (27,28).

En pacientes Sta se observó el enriquecimiento tanto de procesos asociados a inflamación, como respuesta humoral y migración de leucocitos, como de categorías asociadas a la regulación de la respuesta inmune y de la respuesta mediada por células T. Teniendo en cuenta que el análisis se realizó respecto a individuos sanos, no trasplantados, es posible identificar categorías asociadas a inflamación en estos pacientes. Llamativamente, y en concordancia con este hallazgo, previamente ya se ha reportado que en pacientes con tolerancia operacional del injerto renal se identificó una firma transcripcional asociada con la respuesta de células B, y en la que se encontraron regulados genes codificantes para cadenas de inmunoglobulinas como *IGKV4-1*, *IGLL1* e *IGKVID-13* (29). Adicionalmente en otros trabajos se ha correlacionado la frecuencia de células T reguladoras con aceptación del injerto en trasplante hepático (30). Aunque en nuestro análisis funcional no se identificó que la respuesta observada fuera específicamente de células T reguladoras, es importante resaltar este hallazgo para posteriores validaciones.

Un hallazgo relevante en el análisis funcional fue el enriquecimiento de categorías inmunes en los pacientes HD. Respecto a HC, se encontraron incrementados procesos como respuesta humoral antimicrobiana y quimiotaxis de linfocitos; asimismo, en el análisis en STRING se observaron enriquecidas categorías como desgranulación de neutrófilos, regulación negativa de la producción de citoquinas y regulación de la activación del complemento. La enfermedad renal crónica, así como la diálisis, producen en los pacientes un nivel de inflamación, caracterizada por el incremento de estrés

oxidativo y de los niveles de séricos de proteína C reactiva, IL-6 en aproximadamente el 30-50% de los pacientes (31).

Aunque se ha observado que la hemodiálisis puede repercutir negativamente en la función del injerto, en comparación con la diálisis peritoneal (2), aún no se ha hecho un abordaje desde un enfoque molecular que permita conocer perfiles de genes comunes regulados entre los pacientes en diálisis y aquellos que fueron sometidos a trasplante renal.

Fue por lo anterior que nuestro siguiente paso fue identificar genes y procesos biológicos comunes entre los pacientes trasplantados, ya sea AcR, Chr o Sta y pacientes HD, a partir de los DEGs obtenidos del análisis inicial. Inicialmente, se identificó el número de genes compartidos entre cada grupo de pacientes trasplantados y HD, lo cuales fueron 75, 72 y 68 con AcR, Chr y Sta, respectivamente. De cada set de genes se identificó específicamente el número de genes compartidos, asociados a procesos inmunes, los cuales fueron 6, 7 y 6 con AcR, Chr y Sta. En un análisis funcional, específicamente de los genes inmunes, se observó que en cada caso estuvieron más enriquecidos subprocesos como proceso inmune efector y activación de leucocitos en AcR y HD, proceso inmune efector, activación de leucocitos y producción de medidores moleculares en Chr y HD y presentación antigénica, proceso inmune efector, activación de leucocitos y producción de medidores moleculares en Sta y HD. En otro análisis funcional, se revisaron específicamente las categorías funcionales en STRING, y se observó un enriquecimiento de respuesta inmune innata, actividad de MHC de clase II y migración de leucocitos en AcR y HD, siendo *HLA-DQA2* el gen con mayor nivel de expresión y significancia tanto en AcR como HD. Las categorías funcionales enriquecidas y las interacciones proteína-proteína observadas dan cuenta de un proceso de activación inmunológica en el que se relacionan la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, lo cual pone de manifiesto la relevancia del alorreconocimiento en el rechazo y da cuenta de la respuesta inflamatoria de base que existe en los pacientes hemodiálisis mediada por células como los neutrófilos, por el incremento en la expresión de genes como *ELANE* y *DEFA4*. Aunque *CCL18* no se encontró en interacción con otras moléculas reguladas en AcR y HD, es claro su papel en la migración de leucocitos, así como en la maduración de monocitos y macrófagos (32).

En Chr y HD se observó el enriquecimiento de las categorías funcionales respuesta humoral, gránulos azurófilos y disrupción de membranas. Con base en esto, y en la interacción P-P, se observó que tanto en Chr como en HD juegan un papel importante mediadores inflamatorios como las defensinas y células como los neutrófilos. Estos últimos, aunque tienen un rol crucial en el rechazo agudo como se mencionó previamente, también han sido reportados en el rechazo crónico ya que estos pueden acumularse a nivel del tejido y promover una respuesta Th-17 mediada por IL-17 (33).

En Sta y HD se observaron enriquecidas las categorías respuesta humoral antimicrobiana, respuesta inmune innata y regulación de la respuesta inmune. Este hallazgo es de resaltar, ya que, como se mencionó previamente, el incremento en procesos inflamatorios en Sta puede estar asociado al análisis realizado con relación a los individuos HC, y aunque estos pacientes lograron una supervivencia del injerto, pueden existir niveles de inflamación asociados a la activación inmunológica. En los pacientes HD, este hallazgo coincide con los mencionados previamente respecto a AcR y Chr con quienes comparten un nivel de inflamación mediado por células como los neutrófilos y por mediadores inflamatorios como las defensinas. Asimismo, se observó la regulación positiva tanto en Sta como en HD de *CLEC4G*, el cual está asociado a regulación de la respuesta inmune. Los genes de esta familia han sido previamente descritos por tener un papel en la regulación del tráfico celular y efectos moduladores en la actividad de células cancerígenas (34). No obstante, su papel en el contexto del trasplante renal no ha sido reportado.

Estos resultados sugieren que la inflamación en los pacientes HD puede estar mediada por los mismos mecanismos inflamatorios que se dan en los pacientes trasplantados, y que este estado proinflamatorio basal y previo al trasplante puede comprometer el injerto posterior a la realización del trasplante. No obstante, para poder establecer una relación de causalidad entre los perfiles transcripcionales en HD y el posterior desenlace del injerto, se requieren análisis adicionales en los que se haga un seguimiento al mismo grupo de pacientes durante la diálisis y luego del trasplante. Los datos obtenidos con nuestra metodología de análisis representan un primer acercamiento en nuestro laboratorio a la hipótesis previamente planteada sobre la relación entre el nivel de inflamación basal en los pacientes HD y el rechazo o la aceptación del injerto; por lo tanto, para concluir esto con certeza se requieren estudios adicionales.

El objetivo del segundo enfoque fue la identificación de diferencias en la expresión génica y a nivel funcional, únicamente en los pacientes trasplantados con el fin de explorar genes y procesos biológicos asociados al rechazo y a la aceptación del injerto.

Al identificar el número de genes diferencialmente expresados, se observó que en AcR el número de genes regulados positivamente fue mayor en AcR con relación a Sta y a Chr. Este hallazgo fue similar al observado en la comparación previa con relación a los individuos HC. El número de genes regulados positivamente fue similar entre Chr y Sta.

Nuevamente, para comprender estas diferencias desde un punto de vista funcional, se realizó el análisis de enriquecimiento mediante GSEA y la identificación de categorías funcionales en STRING. En AcR se observó el enriquecimiento de respuesta de fase aguda, regulación positiva de macrófagos

M1 y actividad de la IL-1, con relación a Sta. Estos mismos procesos se encontraron también enriquecidos en AcR con relación a HC lo que da cuenta, por un lado, de la relevancia del papel de los macrófagos y de citoquinas proinflamatorias como mediadores del rechazo agudo, y por el otro, de la similitud transcripcional entre los pacientes Sta y los individuos HC. En Sta, por su parte, se observó el enriquecimiento del proceso selección de células T con relación a AcR, lo que puede estar asociado al rol de las células T no solo en la respuesta adaptativa requerida para mediar los procesos de rechazo, sino también en la instauración de una respuesta tolerogénica.

En Chr, llamativamente, solo se observó enriquecida la categoría asociada a sistema inmune establecimiento de la polaridad de linfocitos con relación a Sta, mientras que, en este, se observó el enriquecimiento de regulación de la activación del complemento. Nuevamente, este último hallazgo fue compartido en la comparación con los individuos HC. En general, en Chr no se observó el enriquecimiento significativo de categorías funcionales con relación a HC, lo cual puede estar asociado a la similitud en el número de genes regulados en cada desenlace.

Cuando se realizó el análisis de expresión diferencial y los análisis funcionales entre AcR y Chr se observó que, el número de genes regulados fue mayor en Acr y funcionalmente, también se identificaron más procesos biológicos enriquecidos. Estos incluyeron fagocitosis y regulación de la activación del complemento. En este punto, es importante resaltar que en todos los casos esta última categoría estuvo menos enriquecida en Chr, es decir, en los demás grupos de estudio se da una mayor regulación en la actividad del complemento mientras que en Chr, como se observó en la figura E, hay activación de esta vía junto con la cascada de coagulación. Esto es importante puesto que sugiere y resalta el papel de la respuesta inmune humoral en el rechazo crónico enfocada, como se observó en el análisis de enriquecimiento en la figura 3A, a la muerte celular.

Aunque en los análisis de GSEA y STRING se observó un enriquecimiento significativo de procesos biológicos y categorías funcionales asociados a sistema inmune, a continuación, se seleccionaron específicamente los genes inmunes y se analizaron mediante STRING.

En cuanto al número de genes se observó que en AcR vs Sta hubo 10/6 genes inmunes respectivamente, en Chr vs Sta, 4/10 genes inmunes, respectivamente y en AcR vs Chr, 11/10 genes respectivamente. En esta última comparación, aunque el número de genes inmunes fue mayor en AcR, la fracción respecto al número total de genes regulados fue mayor en Chr.

En el análisis funcional se observó en AcR el enriquecimiento de la categoría funcional respuesta inmune innata por genes como *TREM2*, *TREML4*, *CCL18*, *CCL23* y *TLR5*. En el análisis de interacción P-P, se observó la interacción entre *TREM2* y *TREML4*, lo cual da cuenta, nuevamente,

del papel de la actividad de los macrófagos en la respuesta proinflamatoria. Aunque no se ha reportado su papel en la respuesta frente al injerto renal, *TREML4* promueve la inflamación ya que se ha observado un aumento en su expresión en macrófagos humanos y en modelos murinos de aterosclerosis (35). El gen con mayor nivel de expresión y significancia en AcR con relación a Sta, fue *CCL18*, lo cual, como se observó también en la comparación con HC, da cuenta de la relevancia de la migración celular hacia el tejido renal en donde finalmente se instaura la respuesta frente al injerto. *CCL18* ha sido previamente reportada como una quimiocina incrementada en sangre periférica de pacientes rechazo agudo del injerto renal junto con *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *CXCL9* y *CXCL10* (36). Asimismo, se ha reportado que por su rol esencial en la quimiotaxis de células T juega un papel dominante en rechazo en trasplante de piel (37).

En Sta se encontraron enriquecidas las categorías funcionales señalización mediada por citoquinas, regulación de la migración de leucocitos y regulación de la respuesta inmune de tipo 2. La categoría señalización mediada por citoquinas estuvo constituida por los genes *CXCR3*, *PLVAP*, *IFNLI* y *XCLI*. La categoría regulación de la migración de leucocitos, por *CXCR3* y *PLVAP* y la categoría regulación de la respuesta inmune de tipo 2, por *XCLI* e *IFNLI*. Este hallazgo, nuevamente sugiere que en Sta coexiste una respuesta inflamatoria, por la regulación positiva de genes asociados a la migración, y una respuesta más enfocada a la regulación y control de la inflamación. La expresión de *XCLI* da cuenta de esto último, ya que se ha reportado que su expresión a nivel del timo promueve la generación de células T reguladoras, y en modelos murinos deficientes de *AIRE* y de *XCLI* se ha observado una disminución en la frecuencia de estas células (38). Como bien es sabido, el papel de las células T reguladoras ha sido ampliamente reportado, ya que constituyen uno de los principales actores en la generación de tolerancia frente al injerto con la consecuente supervivencia a largo plazo (39,40).

Particularmente, en el análisis en STRING, no se identificaron categorías funcionales enriquecidas asociadas a Chr con relación a Sta. Una de las razones, puede ser que, de los 4 genes inmunes identificados, 3 no fueron reconocidos por la herramienta de análisis. Al revisar detalladamente dichos genes se observó que corresponden a genes que codifican para cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, como *IGHV1-69-2*, *IGHV2-70D*, e *IGLV3-12*. Aunque en Sta y AcR también se regularon positivamente genes asociados a inmunoglobulinas que no se mapearon en alguna categoría funcional porque no fueron reconocidos por la herramienta, no fueron los genes predominantes por lo que las categorías obtenidas a partir de estos correspondieron a otros procesos biológicos como ya se mencionó. No obstante, en Chr, estos correspondieron a los genes inmunes más abundantes, lo que, nuevamente, da cuenta del rol fundamental de la respuesta humoral en el rechazo crónico, que

comienza a regularse positivamente en sangre periférica. El gen con mayor nivel de regulación, que corresponde al cuarto gen regulado positivamente en Chr con relación a Sta fue *TREML4*. Este gen codifica para una proteína expresada en macrófagos y cuyo papel fundamental es regular positivamente la señalización por TLR7. Se sabe que la señalización por TLRs es incrementada en procesos inflamatorios (41) y en pacientes trasplantados de riñón se ha observado un incremento en la expresión de diferentes TLRs en el injerto (42). Aunque no se ha reportado el papel de *TREML4* en el desenlace del injerto renal, el incremento en su expresión en pacientes Chr con relación a Sta sugiere un rol importante y de la activación de macrófagos en el rechazo.

En Sta, en la comparación con Chr, se encontró enriquecida la categoría funcional regulación negativa de la inmunidad mediada por células T, constituida por los genes *CLEC4G* y *XCL1*, cuyos roles en la regulación inmune fueron mencionados previamente.

Al identificar diferencias en las categorías funcionales y genes inmunes entre AcR y Chr, se observó que en AcR solo enriqueció la categoría familia intercrina Alpha, conformada por quimioquinas. Aunque no se observó interacción P-P, la categoría estuvo enriquecida por los genes *CCL23* y *CCL18*. *CCL23* es expresada principalmente por células mieloides y en un fuerte quemoatrayente de células, monocitos y neutrófilos (43).

Por su parte, en Chr con relación a AcR, se observaron enriquecidas las categorías funcionales gránulos azurófilos, conformada por los genes *DEFA3*, *DEFA4*, *ELANE* y *RNASE3*; respuesta humoral mediada por péptidos antimicrobianos, con estos mismos 4 genes y disrupción de membranas, conformada por los genes *DEFA3* y *DEFA4*. Este hallazgo, muestra nuevamente el rol de células como los neutrófilos en el rechazo crónico, y aunque previamente en AcR también se identificó el enriquecimiento de la actividad de este tipo celular, este último hallazgo sugiere que la actividad de neutrófilos es mayor en el rechazo crónico que en el rechazo agudo.

## 4.5 Referencias

1. Um-e-Kalsoom, Khan S, Ahmad I. Impact of hemodialysis on the wellbeing of chronic kidney diseases patients: a pre-post analysis. *Middle East Curr Psychiatry*. 2020;27(1).
2. Hou YF, Wang XX, Yang HJ, Zhong S. Impact of pre-transplant dialysis modality on kidney transplant outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022;26(7):2292–304.
3. Sakai K, Oguchi H, Muramatsu M, Shishido S. Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology*. 2018;23:38–44.
4. 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;30(8):1481–94.
5. Trajceska L, Severova-Andreevska G, Dzekova-Vidimliski P, Nikolov I, Selim G, Spasovski G, et al. Complications and risks of percutaneous renal biopsy. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(6):992–5.
6. Dorr C, Wu B, Guan W, Muthusamy A, Sanghavi K, Schladt DP, et al. Differentially Expressed Gene Transcripts Using RNA Sequencing from the Blood of Immunosuppressed Kidney Allograft Recipients. Bueno V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 6 [cited 2017 Aug 10];10(5):e0125045. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946140>
7. 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;46:463–72.
8. Pineda S, Sur S, Sigdel T, Nguyen M, Crespo E, Torija A, et al. Peripheral Blood RNA Sequencing Unravels a Differential Signature of Coding and Noncoding Genes by Types of Kidney Allograft Rejection. *Kidney Int Reports* [Internet]. 2020;5(10):1706–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.07.023>
9. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
10. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential

- expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1):139–40.
11. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G, et al. BioMart - Biological queries made easy. *BMC Genomics*. 2009;10:1–12.
  12. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012;16(5):284–7.
  13. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
  14. Sawinski D, Poggio ED. Introduction to kidney transplantation: Long-term management challenges. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(8):1262–3.
  15. Scozzi D, Ibrahim M, Menna C, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. *Am J Transplant*. 2017;17(2):328–35.
  16. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*. 2018;9(FEB):1–17.
  17. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
  18. Liu FC, Chuang YH, Tsai YF, Yu HP. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock*. 2014;41(6):491–8.
  19. Torres-Ruiz J, Villca-Gonzales R, Gómez-Martín D, Zentella-Dehesa A, Tapia-Rodríguez M, Uribe-Uribe NO, et al. A potential role of neutrophil extracellular traps (NETs) in kidney acute antibody mediated rejection. *Transpl Immunol*. 2020;60(July 2019):1–7.
  20. Shi S, Xue F. Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
  21. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):281–6.
  22. Bergler T, Jung B, Bourrier F, Kühne L, Banas MC, Rümmele P, et al. Infiltration of Macrophages Correlates with Severity of Allograft Rejection and Outcome in Human Kidney Transplantation. *PLoS One*. 2016;11(6):1–14.

23. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11):1–33.
24. Sivakumar P V., Foster DC, Clegg CH. Interleukin-21 is a T-helper cytokine that regulates humoral immunity and cell-mediated anti-tumour responses. *Immunology.* 2004;112(2):177–82.
25. Khattar M, Baum CE, Schroder P, Breidenbach JD, Haller ST, Chen W, et al. Interleukin 21 (IL-21) regulates chronic allograft vasculopathy (CAV) in murine heart allograft rejection. *PLoS One.* 2019;14(11):2–13.
26. Jordan SC, Ammerman N, Choi J, Huang E, Najjar R, Peng A, et al. Evaluation of Clazakizumab (Anti-Interleukin-6) in Patients With Treatment-Resistant Chronic Active Antibody-Mediated Rejection of Kidney Allografts. *Kidney Int Reports [Internet].* 2022;7(4):720–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.01.1074>
27. Grafals M, Thurman JM. The Role of Complement in Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2019;10(October):1–10.
28. Stallone G, Pontrelli P, Rascio F, Castellano G, Gesualdo L, Grandaliano G. Coagulation and Fibrinolysis in Kidney Graft Rejection. *Front Immunol.* 2020;11(August):1–9.
29. al. R et. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(5):139–48.
30. Ravindranath MH, El Hilali F, Filippone EJ. The Impact of Inflammation on the Immune Responses to Transplantation: Tolerance or Rejection? *Front Immunol.* 2021;12(November):1–22.
31. Jofré R, Rodriguez-Benitez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(SUPPL. 3):274–80.
32. Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, Discipio RG. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. *Immunology.* 2012;135(4):287–98.
33. Chung BH, Yang CW, Cho M La. Clinical significance of th17 cells in kidney transplantation. *Korean J Intern Med.* 2018;33(5):860–6.
34. Zhang Y, Wei H, Fan L, Fang M, He X, Lu B, et al. CLEC4s as Potential Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma Microenvironment. *Front Cell Dev Biol.*

2021;9(August):1–15.

35. Nedeva C, Menassa J, Duan M, Liu C, Doerflinger M, Kueh AJ, et al. TREML4 receptor regulates inflammation and innate immune cell death during polymicrobial sepsis. *Nat Immunol* [Internet]. 2020;21(12):1585–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-0789-z>
36. Xiang W, Han S, Wang C, Chen H, Shen L, Zhu T, et al. Pre-transplant Transcriptional Signature in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Acute Renal Allograft Rejection. *Front Med*. 2022;8(January):1–15.
37. Borges TJ, Abarzua P, Gassen RB, Kollar B, Lima-Filho M, Aoyama BT, et al. T cell-attracting CCL18 chemokine is a dominant rejection signal during limb transplantation. *Cell Reports Med* [Internet]. 2022;3(3):100559. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100559>
38. Lei Y, Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect* [Internet]. 2012;14(3):262–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003>
39. Atif M, Conti F, Gorochov G, Oo YH, Miyara M. Regulatory T cells in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunol*. 2020;9(2):1–15.
40. Hu M, Rogers NM, Li J, Zhang GY, Wang YM, Shaw K, et al. Antigen Specific Regulatory T Cells in Kidney Transplantation and Other Tolerance Settings. *Front Immunol*. 2021;12(August):1–11.
41. Cen X, Liu S, Cheng K. The role of toll-like receptor in inflammation and tumor immunity. *Front Pharmacol*. 2018;9(AUG):1–8.
42. Braza F, Brouard S, Chadban S, Goldstein DR. Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2016;12(5):281–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2016.41>
43. Faura J, Bustamante A, Penalba A, Giralt D, Simats A, Martínez-Sáez E, et al. CCL23: A Chemokine Associated with Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2020;73(4):1585–95.

*GO BIOLOGICAL PROCESSES ASSOCIATED TO SHARED #GENES  
ACR AND HD GENES*

<i>cellular process (GO:0009987)</i>	41
<i>reproductive process (GO:0022414)</i>	2
<i>No PANTHER category is assigned (UNCLASSIFIED)</i>	21
<i>localization (GO:0051179)</i>	8
<i>biological process involved in interspecies interaction between organisms (GO:0044419)</i>	3
<i>reproduction (GO:0000003)</i>	2
<i>biological regulation (GO:0065007)</i>	21
<i>response to stimulus (GO:0050896)</i>	15
<i>signaling (GO:0023052)</i>	12
<i>developmental process (GO:0032502)</i>	9
<i>multicellular organismal process (GO:0032501)</i>	12
<i>locomotion (GO:0040011)</i>	3
<i>biological adhesion (GO:0022610)</i>	8
<i>metabolic process (GO:0008152)</i>	19
<i>immune system process (GO:0002376)</i>	6

**Tabla 1.** Procesos biológicos de Gene Ontology asociados a los 75 genes regulados positivamente y compartidos entre AcR y HD, obtenidos mediante análisis funcional en PANTHER17.0. En cada proceso se indica el número de genes anotados. El proceso más enriquecido fue *cellular process* (GO:0009987). En el proceso *immune system process* (GO:0002376) se encontraron anotados 6 genes.

*GO BIOLOGICAL PROCESSES ASSOCIATED TO SHARED CHR AND HD GENES* #GENES

<i>cellular process (GO:0009987)</i>	37
<i>reproductive process (GO:0022414)</i>	1
<i>No PANTHER category is assigned (UNCLASSIFIED)</i>	22
<i>localization (GO:0051179)</i>	7
<i>biological process involved in interspecies interaction between organisms (GO:0044419)</i>	3
<i>reproduction (GO:0000003)</i>	1
<i>biological regulation (GO:0065007)</i>	19
<i>response to stimulus (GO:0050896)</i>	16
<i>signaling (GO:0023052)</i>	12
<i>developmental process (GO:0032502)</i>	9
<i>multicellular organismal process (GO:0032501)</i>	9
<i>locomotion (GO:0040011)</i>	2
<i>biological adhesion (GO:0022610)</i>	5
<i>metabolic process (GO:0008152)</i>	19
<i>immune system process (GO:0002376)</i>	7

**Tabla 2.** Procesos biológicos de Gene Ontology asociados a los 72 genes regulados positivamente y compartidos entre Chr y HD, obtenidos mediante análisis funcional en PANTHER17.0. En cada proceso se indica el número de genes anotados. El proceso más enriquecido fue *cellular process* (GO:0009987). En el proceso *immune system process* (GO:0002376) se encontraron anotados 7 genes.

*GO BIOLOGICAL PROCESSES ASSOCIATED TO SHARED #GENES  
STA AND HD GENES*

<i>cellular process (GO:0009987)</i>	39
<i>reproductive process (GO:0022414)</i>	2
<i>No PANTHER category is assigned (UNCLASSIFIED)</i>	20
<i>localization (GO:0051179)</i>	5
<i>biological process involved in interspecies interaction between organisms (GO:0044419)</i>	2
<i>reproduction (GO:0000003)</i>	2
<i>biological regulation (GO:0065007)</i>	19
<i>response to stimulus (GO:0050896)</i>	14
<i>signaling (GO:0023052)</i>	9
<i>developmental process (GO:0032502)</i>	10
<i>multicellular organismal process (GO:0032501)</i>	11
<i>locomotion (GO:0040011)</i>	2
<i>biological adhesion (GO:0022610)</i>	8
<i>metabolic process (GO:0008152)</i>	19
<i>immune system process (GO:0002376)</i>	6

**Tabla 3.** Procesos biológicos de Gene Ontology asociados a los 68 genes regulados positivamente y compartidos entre Sta y HD, obtenidos mediante análisis funcional en PANTHER17.0. En cada proceso se indica el número de genes anotados. El proceso más enriquecido fue *cellular process* (GO:0009987). En el proceso *immune system process* (GO:0002376) se encontraron anotados 6 genes.

UP ACR			UP HD		
gene	logFC	FDR	gene	logFC	FDR
SYMBOL			SYMBOL		
<i>HLA-DQA2</i>	6.04443777	5.02E-09	<i>HLA-DQA2</i>	7.44000484	1.88E-13
<i>CCL18</i>	4.79744819	1.42E-05	<i>HLA-DQB2</i>	4.209728	7.24E-07
<i>DEFA4</i>	3.03583471	1.04E-04	<i>DEFA4</i>	3.35474142	3.74E-05
<i>ELANE</i>	2.59740034	6.82E-04	<i>ELANE</i>	2.78058222	7.08E-04
<i>IGHV2-70D</i>	6.55767068	1.28E-03	<i>CCL18</i>	3.8966187	4.06E-03
<i>HLA-DQB2</i>	2.25148602	1.49E-02	<i>IGHV2-70D</i>	6.01848079	1.86E-02
STRING categorie			p.adjust		
Innate immune response			0.0088		
MHC class II receptor activity			0.0093		
Leukocyte migration			0.0299		

**Tabla 4.** Genes inmunes regulados positivamente, compartidos por AcR y HD en nuestro set de DEGs. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 1). HLA-DQA2 fue el gen con mayor nivel de expresión y de significancia en AcR y HD. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los 6 genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en la figura 4E.

UP CHR			UP HD		
<i>gene</i>	logFC	FDR	<i>gene</i>	logFC	FDR
<i>SYMBOL</i>			<i>SYMBOL</i>		
<i>TREML4</i>	7.12904477	1.09E-12	<i>HLA-DQA2</i>	7.44000484	1.88E-13
<i>DEFA4</i>	5.53866475	9.73E-12	<i>TREML4</i>	6.25452771	1.47E-10
<i>ELANE</i>	5.43175784	9.73E-12	<i>IGLV3-12</i>	4.16603308	1.43E-05
<i>HLA-DQA2</i>	6.396732	2.75E-09	<i>DEFA4</i>	3.35474142	3.74E-05
<i>DEFA3</i>	3.96581823	9.97E-07	<i>ELANE</i>	2.78058222	7.08E-04
<i>IGLV3-12</i>	3.90017281	7.51E-05	<i>DEFA3</i>	2.62175632	3.32E-03
<i>IGHV2-70D</i>	6.16729164	1.28E-02	<i>IGHV2-70D</i>	6.01848079	1.86E-02
STRING categorie			p.adjust		
Antibacterial humoral response			0.0021		
Azurophil granule			0.0087		
Membrane disruption in other organism			0.044		

**Tabla 5.** Genes inmunes regulados positivamente, compartidos por Chr y HD en nuestro set de DEGs. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 1). HLA-DQB2 fue el gen con mayor nivel de expresión y de significancia en HD, mientras que en Chr fue TREML4. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los 7 genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en la figura 4F.

UP STA			UP HD		
gene	logFC	FDR	gene	logFC	FDR
SYMBOL			SYMBOL		
<i>HLA-DQA2</i>	7.74341968	4.77E-14	<i>HLA-DQA2</i>	7.44000484	1.88E-13
<i>HLA-DQB2</i>	4.07412992	5.26E-06	<i>HLA-DQB2</i>	4.209728	7.24E-07
<i>DEFA4</i>	3.68063171	9.57E-06	<i>DEFA4</i>	3.35474142	3.74E-05
<i>ELANE</i>	3.45771043	2.12E-05	<i>ELANE</i>	2.78058222	7.08E-04
<i>DEFA3</i>	3.11526841	3.46E-04	<i>DEFA3</i>	2.62175632	3.32E-03
<i>CLEC4G</i>	2.544457	1.24E-02	<i>CLEC4G</i>	2.43121169	1.49E-02
<b>STRING categorie</b>			<b>p.adjust</b>		
<b>Antibacterial humoral response</b>			0.0043		
<b>Innate immune response</b>			0.0181		
<b>Regulation of immune response</b>			0.0371		

**Tabla 6.** Genes inmunes regulados positivamente, compartidos por Sta y HD en nuestro set de DEGs. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 1). Tanto en Sta como en HD, los genes tuvieron valores de expresión y de significancia similares, siendo HLA-DQA2 el gen con mayor nivel de regulación en ambos casos. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los 6 genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en la figura 4F.

ACR VS STA			STA VS ACR		
gene SYMBOL	logFC	FDR	gene SYMBOL	logFC	FDR
<i>CCL18</i>	5,43735464	8,3169E-09	<i>XCLI</i>	-2,976787225	1,6077E-07
<i>IGHV1-69</i>	3,91493984	1,7881E-08	<i>CXCR3</i>	-2,252111859	5,9657E-05
<i>ITGA7</i>	3,24890126	6,6742E-08	<i>PLVAP</i>	-2,498071943	6,3028E-05
<i>IGHV2-70D</i>	6,65719921	2,1795E-05	<i>IFNLI</i>	-2,246252369	0,00055691
<i>CLEC12B</i>	2,27515383	0,00023073	<i>IGKV1-6</i>	-2,042395398	0,00288765
<i>TLR5</i>	2,06037606	0,00096819	<i>IGLV7-43</i>	-2,061824335	0,00393092
<i>TREM2</i>	2,42708018	0,00198931			
<i>CCL23</i>	2,4003661	0,02800138			
<i>TREML4</i>	2,65484797	0,0316251			
<i>IGHV1-69-2</i>	5,15790726	0,03607126			
STRING pathways	p.adjust	STRING pathways	p.adjust		
Innate immune response	0,0155	Cytokine-mediated signaling pathway	0,0188		
		Regulation of leukocyte migration	0,032		
		Regulation of type 2 immune response	0,0424		

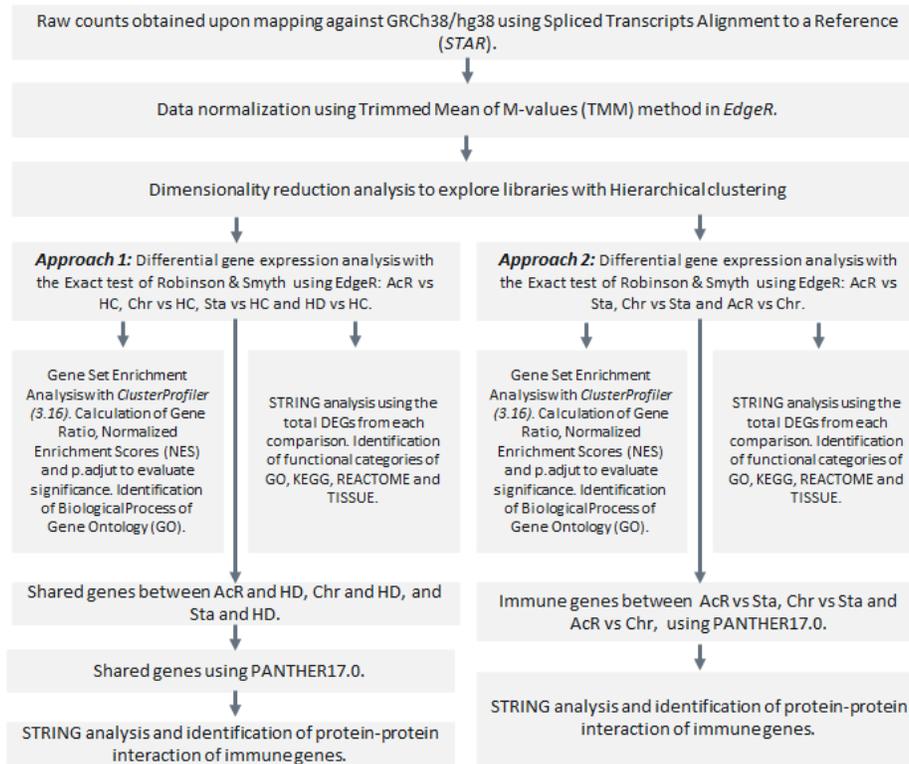
**Tabla 7.** Genes inmunes regulados positivamente, en la comparación entre AcR y Sta. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 2). Los valores de expresión en Sta se muestran negativos, teniendo en cuenta que son el resultado del análisis expresión entre ambos grupos de estudio, y como se mencionó anteriormente, los genes con valores negativos se asumieron como regulados positivamente en la contraparte. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en las figuras 7D y 7E.

CHR VS STA			STA VS CHR		
gene	logFC	FDR	gene	logFC	FDR
SYMBOL			SYMBOL		
<i>TREML4</i>	7,43538366	8,9055E-20	<i>IGLC3</i>	-2,83396493	3,7183E-05
<i>IGHV1-69-2</i>	6,40359794	0,00061921	<i>IGKVID-8</i>	-6,79396869	4,3633E-05
<i>IGHV2-70D</i>	6,25780248	0,00108081	<i>TMEM176B</i>	-2,65911345	0,00011391
<i>IGLV3-12</i>	2,46926814	0,00592963	<i>IGHV3-53</i>	-2,82169509	0,00012968
			<i>XCL1</i>	-2,73326373	0,00013642
			<i>IGKVID-13</i>	-3,66285868	0,00077874
			<i>IGLV7-43</i>	-2,92717881	0,00118173
			<i>IGHV3-30</i>	-2,19051927	0,00441544
			<i>CLEC4G</i>	-2,17592471	0,01453628
			<i>IGHV3-64D</i>	-2,30181917	0,04106699
			<b>STRING pathways</b>	<b>p.adjust</b>	
			<b>Negative regulation of t cell mediated immunity</b>		0,0423

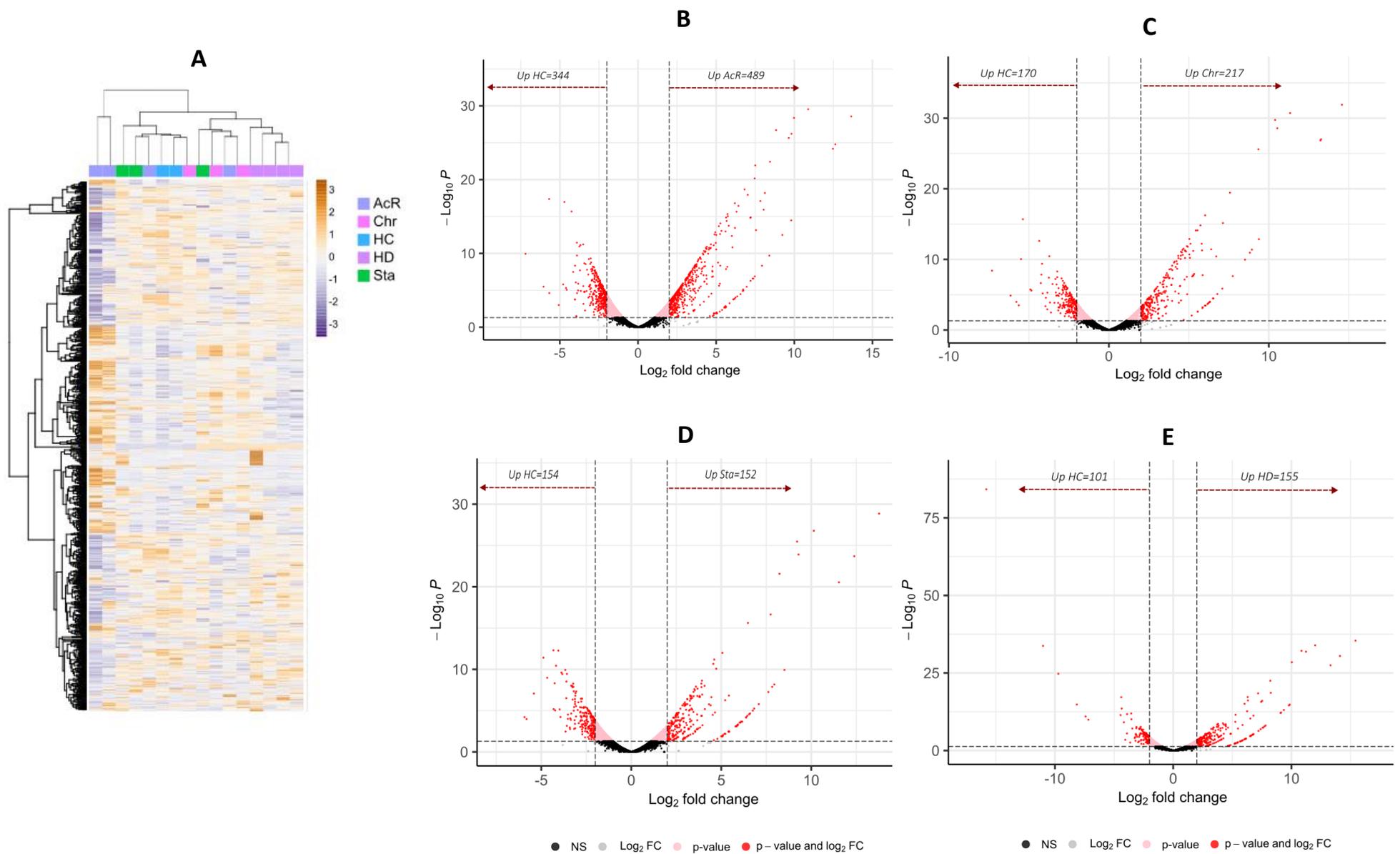
**Tabla 8.** Genes inmunes regulados positivamente, en la comparación entre Chr y Sta. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 2). Los valores de expresión en Sta se muestran negativos, teniendo en cuenta que son el resultado del análisis expresión entre ambos grupos de estudio, y como se mencionó anteriormente, los genes con valores negativos se asumieron como regulados positivamente en la contraparte. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en la figura 7F. En Chr/Sta no se obtuvieron categorías funcionales significativas asociadas a los genes inmunes indicados.

ACR VS ACR			CHR VS CHR		
gene	logFC	FDR	gene	logFC	FDR
SYMBOL			SYMBOL		
<i>IGHV3-30</i>	3,72331958	1,2691E-09	<i>TREML4</i>	-4,76880332	3,6119E-15
<i>IGHV4-31</i>	3,81701863	1,5207E-06	<i>ELANE</i>	-2,83402807	1,7397E-07
<i>IGHV1-69</i>	3,06578776	6,1708E-06	<i>IGLV3-12</i>	-3,32036884	1,9116E-06
<i>CCL18</i>	3,5877886	1,9917E-05	<i>DEFA4</i>	-2,50209799	7,515E-06
<i>TMEM176B</i>	2,62159028	1,9917E-05	<i>DEFA3</i>	-2,33411615	6,1529E-05
<i>IGHV5-10-1</i>	3,59858687	6,7334E-05	<i>CCL3L3</i>	-2,27447562	9,1743E-05
<i>ITGA7</i>	2,43361002	0,00010556	<i>RNASE3</i>	-2,20180805	0,00015037
<i>IGHV3-64D</i>	3,13541598	0,00010822	<i>TRDV3</i>	-2,52718911	0,00072714
<i>FLT3</i>	2,22607987	0,00041782	<i>CCL4L2</i>	-2,00482407	0,00092965
<i>IGKVID-8</i>	5,9783915	0,00136431	<i>AHSP</i>	-2,32798355	0,00154942
<i>CCL23</i>	3,0418166	0,030297			
STRING pathways	p.adjust	STRING pathways	p.adjust		
Intercrine alpha family (small cytokine C-X-C) (chemokine CXC).	0,012	Azurophil granule	0,00049		
		Antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptides	0,00015		
		Membrane disruption in other organism	0,00064		

**Tabla 9.** Genes inmunes regulados positivamente, en la comparación entre AcR y Chr. El número de genes fue obtenido mediante análisis funcional en PANTHER17.0, y posteriormente se identificaron los valores de expresión (logFC) y de significancia estadística (FDR) en el set de DEGs totales (tabla suplementaria 2). Los valores de expresión en Chr se muestran negativos, teniendo en cuenta que son el resultado del análisis expresión entre ambos grupos de estudio, y como se mencionó anteriormente, los genes con valores negativos se asumieron como regulados positivamente en la contraparte. Los colores rojo, verde y azul indican la categoría funcional obtenida del análisis de los genes en STRING. Estos colores se corresponden con los colores indicados para cada gen en las figuras 7G y 7H.

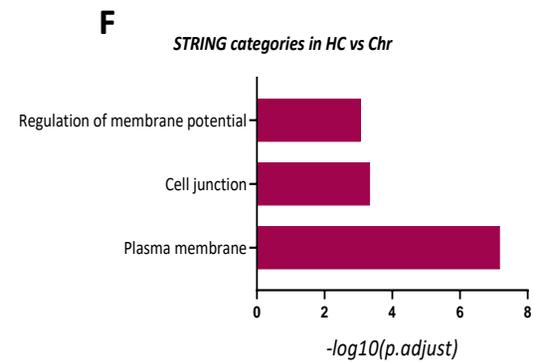
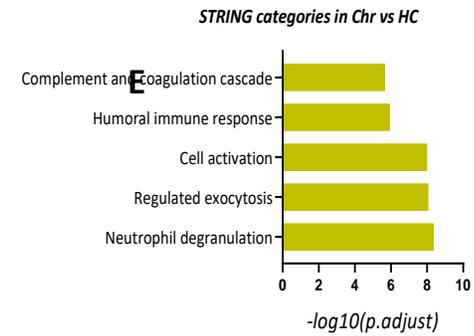
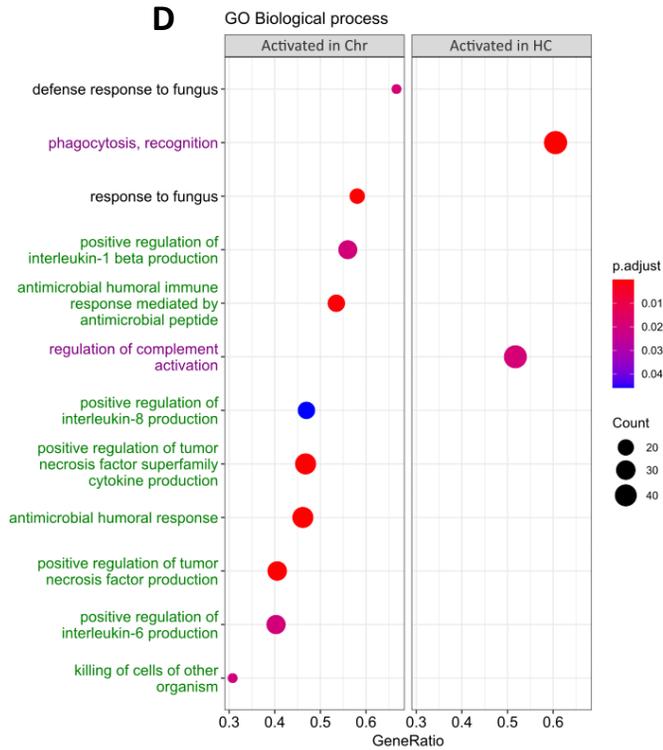
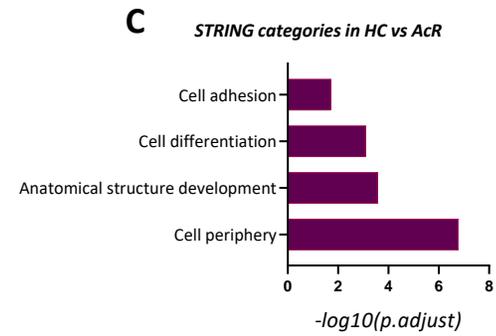
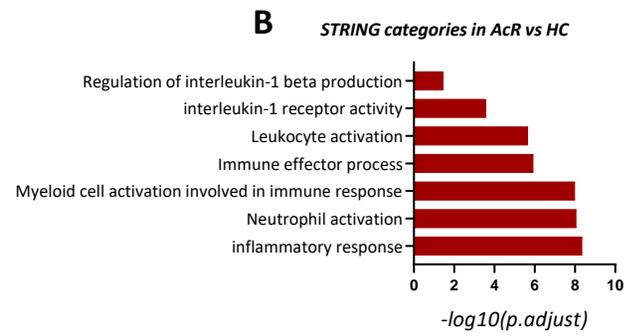
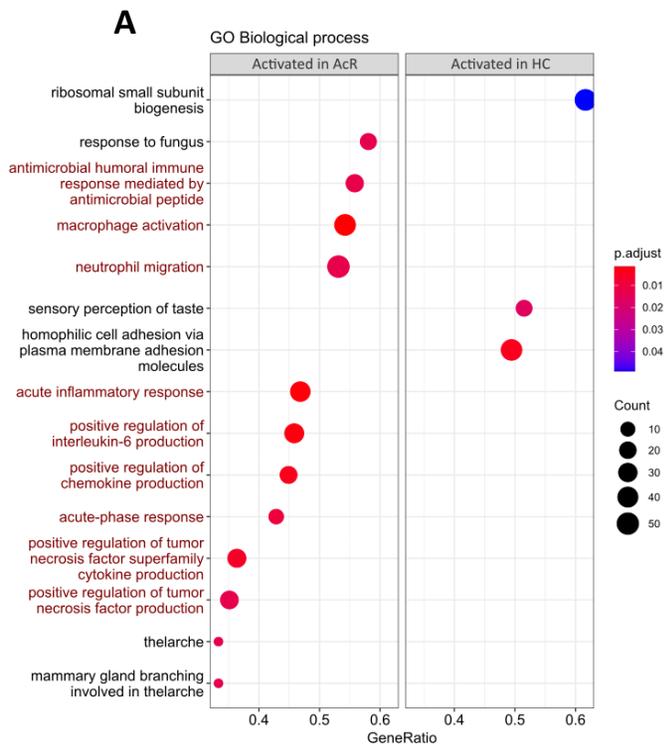


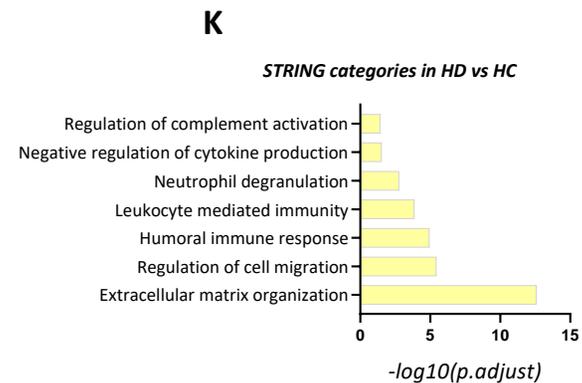
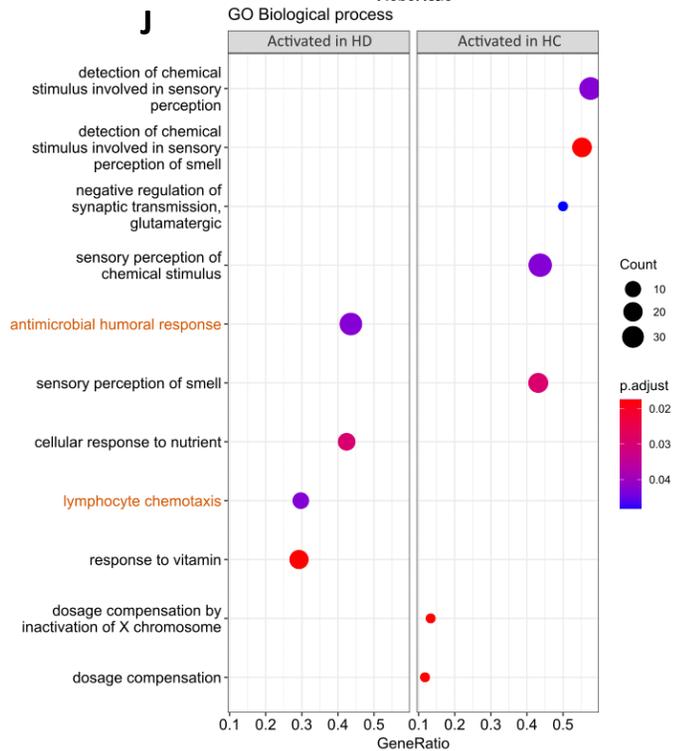
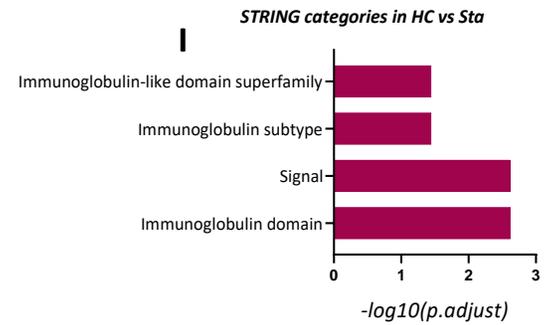
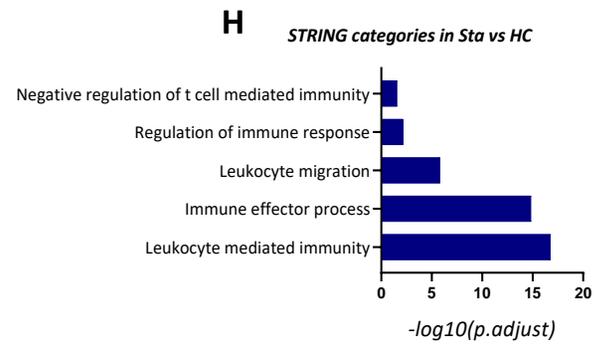
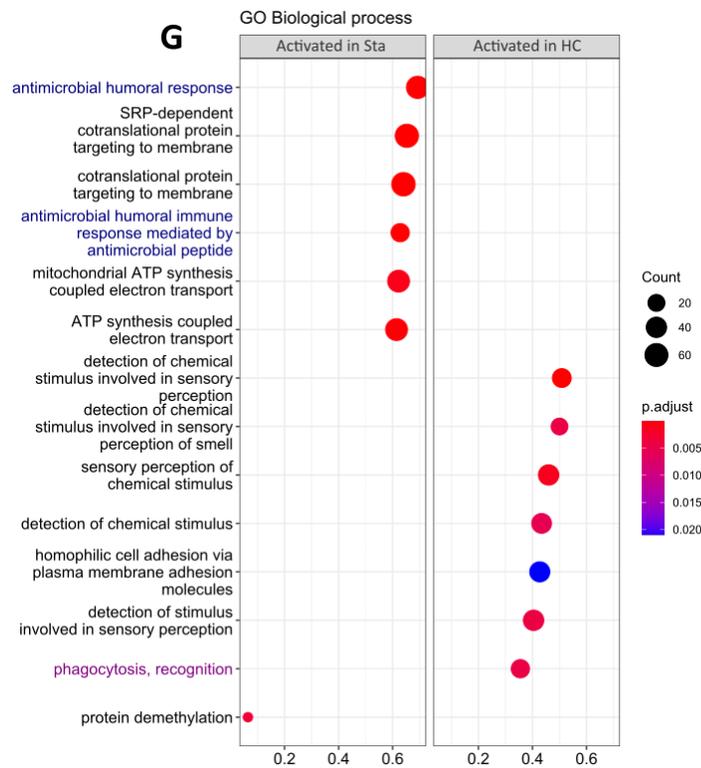
**Figura 1.** Descripción general de la metodología empleada para el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación de RNA de sangre periférica. Paso a paso de cada uno de los análisis realizados, desde los datos crudos hasta los análisis funcionales realizados en cada una de las comparaciones.



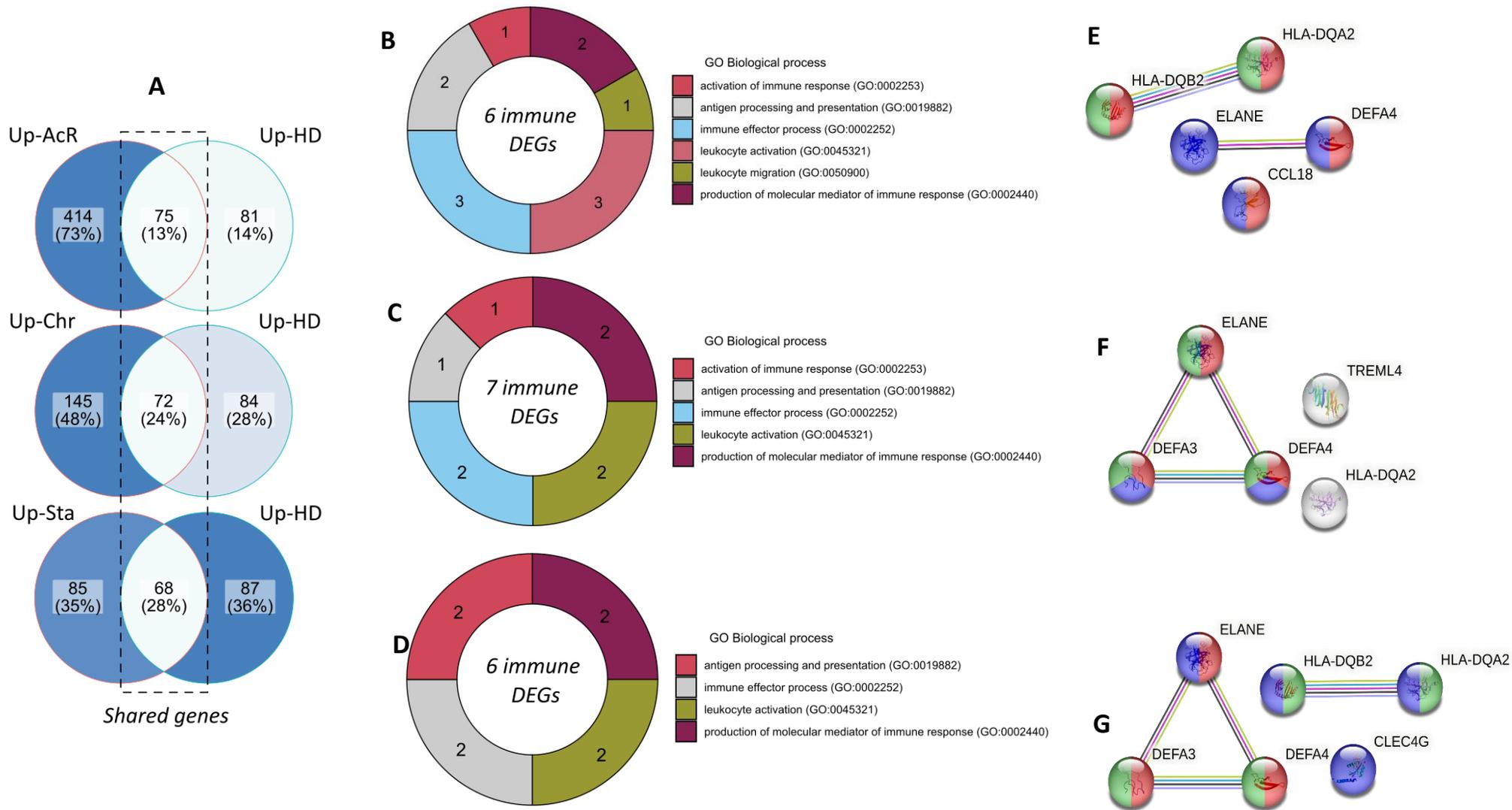
**Figura 2. Exploración de librerías normalizadas mediante agrupamiento jerárquico y análisis de expresión diferencial.** A. Heatmap donde se observa la agrupación de las diferentes librerías de sangre periférica. El análisis se realizó previo al análisis de expresión diferencial, a partir de las

cuentas normalizadas mediante TMM y se tuvieron en cuenta los mil genes con mayor variabilidad. Los pacientes HD y los individuos HC forman grupos homogéneos entre ellos, mientras que en los pacientes trasplantados se observa mayor heterogeneidad. **B, C, D, E.** Volcano plots en el que se muestran el número de genes diferencialmente expresados mediante la aplicación del Exact Test de Robinson & Smyth en EdgeR, en las diferentes comparaciones realizadas, B, AcR vs HC; C, Chr vs HC; D, Sta vs HC y E. HD vs HC. Se consideraron genes regulados aquellos con un valor de logFC (eje X) igual o superior a 2 y FDR (eje Y) menor a 0.05 (para los genes regulados positivamente), y logFC igual o inferior a -2 y FDR menor a 0.05 (para los genes regulados negativamente). Como grupo control se implementaron los individuos HC y con la aplicación del Exact Test se obtuvieron los genes regulados en pacientes AcR, Chr, Sta y HD. Los genes regulados negativamente en cada caso se consideraron como genes regulados positivamente en HC.



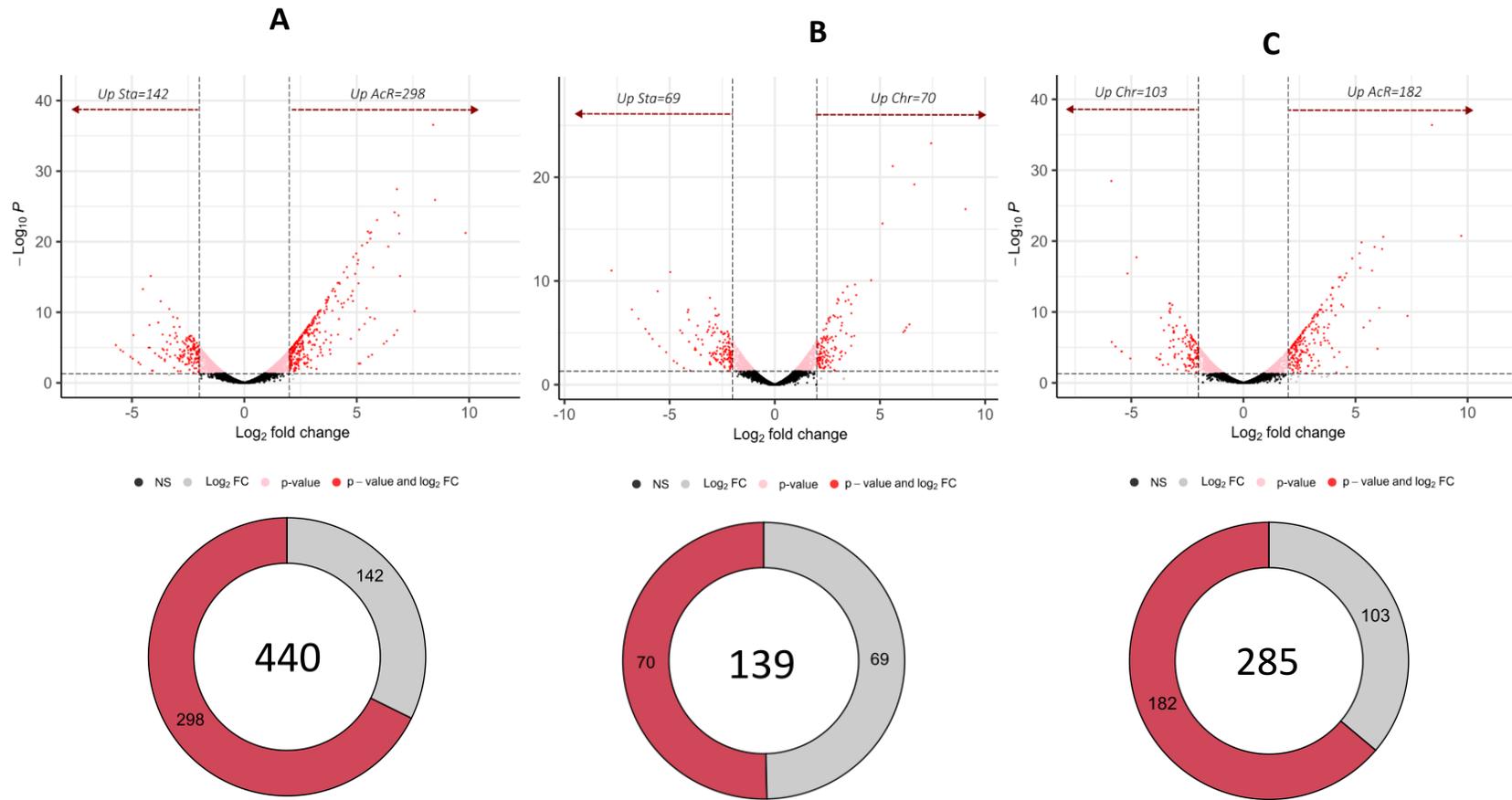


**Figura 3. Exploración de procesos biológicos de Gene Ontology (GO) y categorías funcionales mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) y STRING a partir de los DEGs obtenidos de la comparación AcR/HC; Chr/HC; Sta/HC y HC/HD. A, D, G, J.** Dotplots en los que se muestra el top de los procesos biológicos de GO activados en AcR (A), Chr (D), Sta (G) y HD (J) (asociados a los genes regulados positivamente) y en HC (asociados a los genes regulados negativamente, que como se mencionó previamente, corresponden a los DEGs regulados positivamente en HC). **B, C, E, F, H, I, K.** Categorías funcionales de STRING obtenidas a partir de los DEGs en cada una de las comparaciones mencionadas previamente: AcR con relación a HC (B); HC con relación a AcR (C); Chr con relación a HC (E); HC con relación a Chr (F); Sta con relación a HC (H); HC con relación a Sta (I) y HD con relación a HC (K). No se identificaron categorías enriquecidas en HC con relación a HD. La significancia se graficó en función del  $-\log_{10}$  del  $p_{\text{djust}}$  obtenido de STRING para cada una de las categorías.

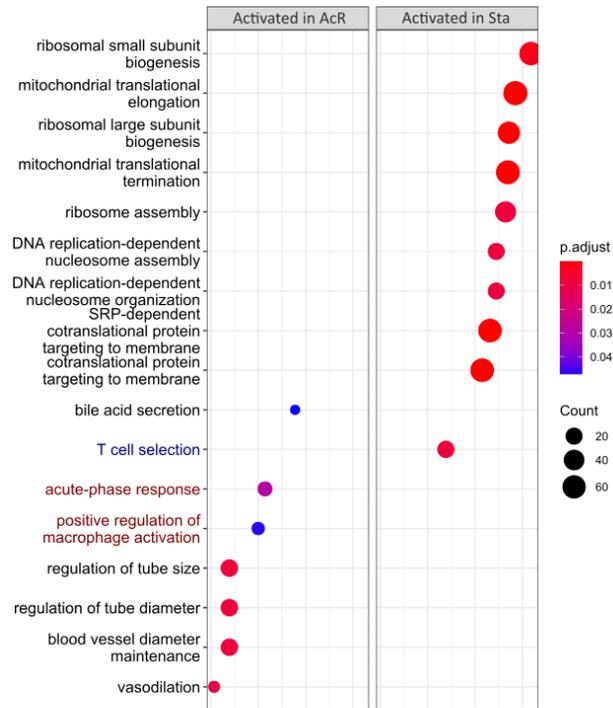
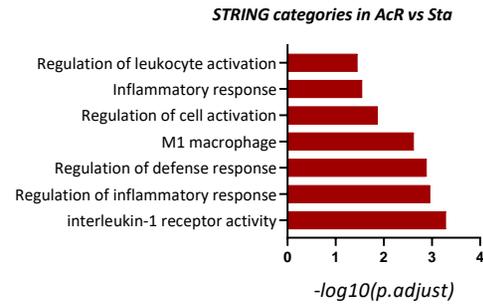
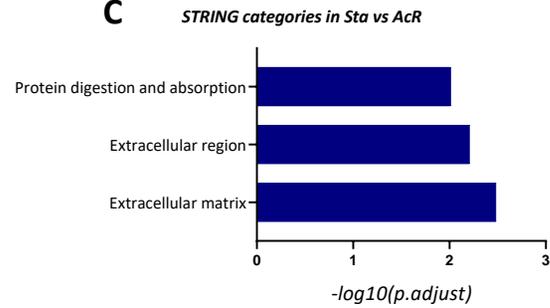
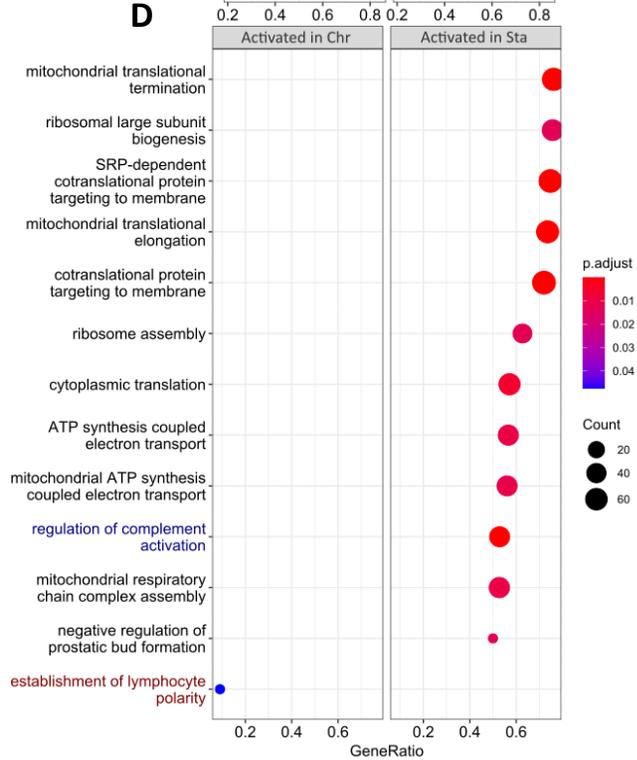
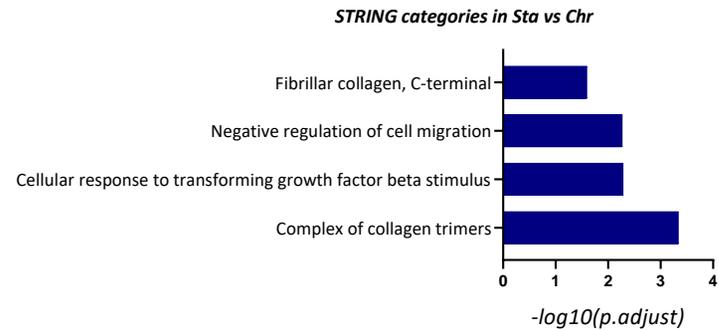


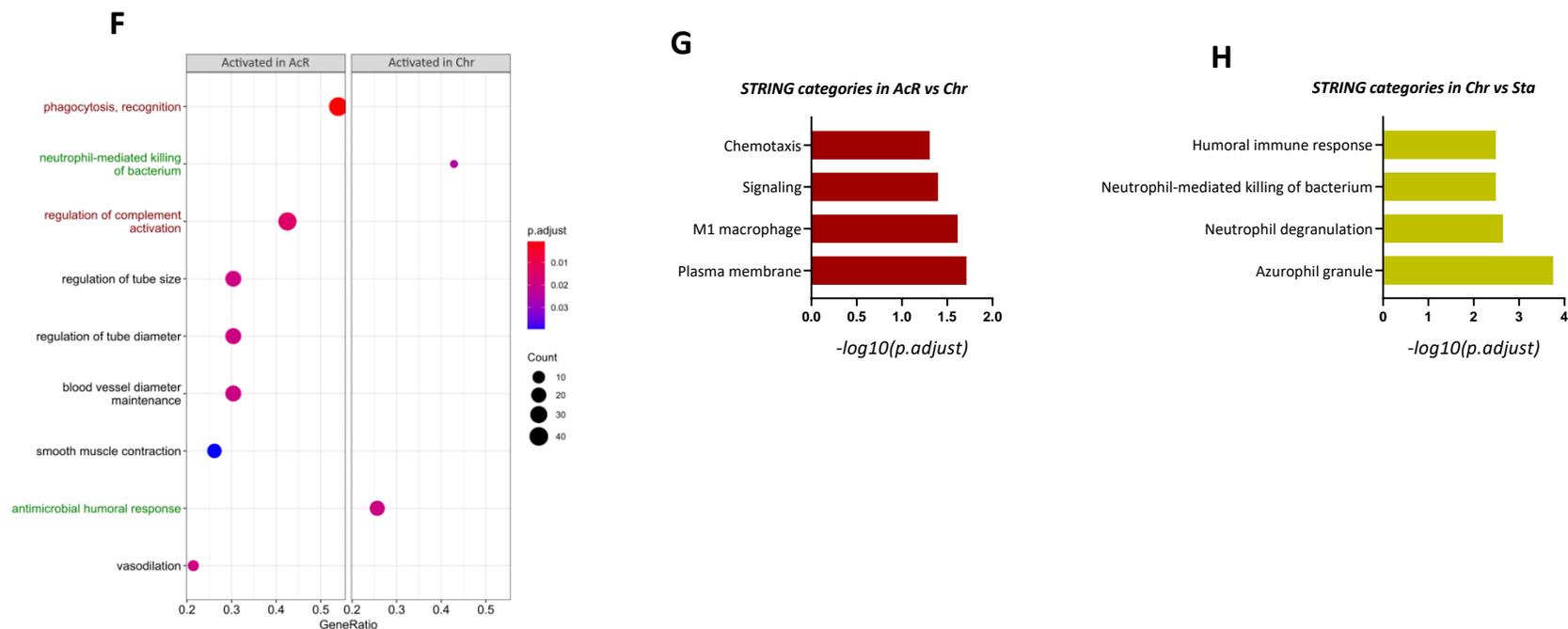
**Figura 4. Análisis funcional de los DEGs (obtenidos a partir de la comparación de AcR, Chr, Sta y HD con HC) compartidos entre los pacientes trasplantados (AcR, Chr y Sta) con los individuos en diálisis y lista de espera para trasplante renal (HD). A.** Genes compartidos por AcR, Chr y Sta con HD, obtenidos a partir del total de DEGs en cada caso. **B, C, D.** Número de genes compartidos por AcR y HD (B), Chr y

HD (C) y Sta y HD (D) asociados a proceso inmune de GO, y número de genes asociado a cada subproceso inmune. **E, F, G.** Redes de interacción proteína-proteína (P-P) de los genes inmunes compartidos por AcR y HD (E), Chr y HD (F) y Sta y HD (G). Los colores de cada círculo se corresponden con las categorías funcionales asociadas a estos genes, mencionadas en las tablas 4, 5 y 6.

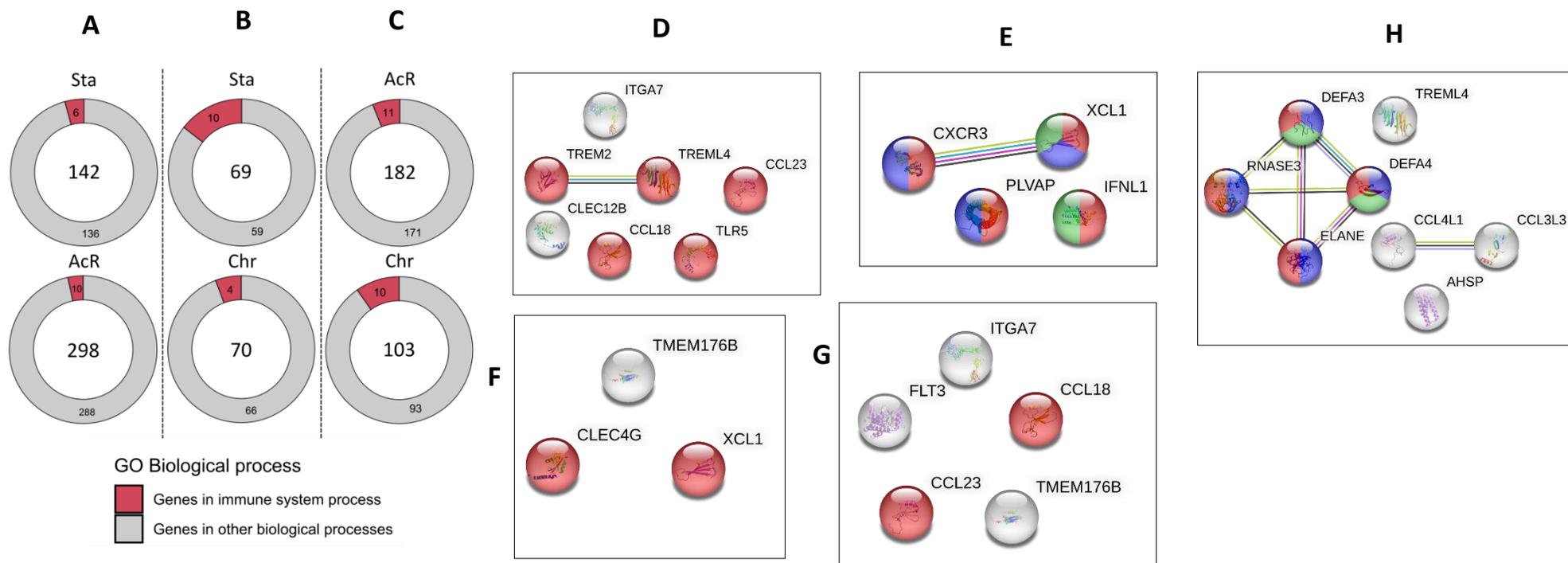


**Figura 5. Análisis de expresión diferencial en sangre periférica de AcR, Chr y Sta. Con la aplicación del Exact Test, se identificó el número de genes diferencialmente expresados entre AcR y Sta, Chr y Sta y AcR y Chr. A.** Volcano plot con los DEGs entre AcR y Sta. El número de genes regulados fue de 440, de los cuales, la fracción mayor, constituida por 298 genes, se observó en AcR. En Sta se observaron 142 genes. **B.** Volcano plot con los DEGs entre Chr y Sta. El número de genes regulados fue de 139. Las fracciones fueron similares entre Chr (70) y Sta (69). **C.** Volcano plot con los DEGs entre AcR y Chr. En total, se observaron 285 genes regulados y nuevamente, en AcR se observó un número de mayor de genes, el cual fue de 182, mientras que en Chr se observaron 103.

**A****B****C****D****E**



**Figura 6. Exploración de procesos biológicos de Gene Ontology (GO) y categorías funcionales mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) y STRING a partir de los DEGs. A, D, F.** Dot plots en los que se observan los procesos biológicos de GO en AcR y Sta (A), Chr y Sta (D) y AcR y Chr (D). En cada caso, se muestran los niveles de significancia y el enriquecimiento de cada proceso en función del p ajustado y el número de genes, respectivamente. **B, C, E, G, H.** obtenidas a partir de los DEGs en cada una de las comparaciones mencionadas previamente. AcR con relación a Sta (B); Sta con relación a AcR (C); Sta con relación a Chr (E); AcR con relación a Chr (G) y Chr con relación a AcR (H). no se identificaron procesos enriquecidos en Chr vs Sta. La significancia se graficó en función del  $-\log_{10}$  del p.djust obtenido de STRING para cada una de las categorías.



**Figura 7. Genes y categorías funcionales asociados a la respuesta inmune regulados positivamente en AcR, Chr y Sta.** Los genes regulados en cada una de las comparaciones se analizaron mediante PANTHER17.0, y a partir de este análisis se obtuvieron los procesos biológicos asociados a los DEGs. Posteriormente, se seleccionaron únicamente los genes del proceso sistema inmune y se analizaron separadamente mediante STRING. **A, B, C.** Fracciones de genes inmunes respecto al total regulados en Acr/Sta (10/6) (A), Chr/Sta (4/10) (B) y AcR/Chr (11/10) (C). **D, E, F, G, H.** redes de interacción P-P entre los genes inmunes en AcR/Sta (D), Sta/AcR (E), Sta/Chr (F), AcR/Chr (G) y Chr/AcR (H). Los colores de los nodos están asociados a las categorías funcionales descritas en las tablas 7, 8 y 9.

**CAPÍTULO V: CAPÍTULO V: DIFFERENTIALLY EXPRESSED  
GENES AND FUNCTIONAL CATEGORIES IN URINE FROM  
KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH ACUTE REJECTION,  
CHRONIC REJECTION, AND LONG-TERM GRAFT SURVIVAL.**

## **5 CAPÍTULO V: DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AND FUNCTIONAL CATEGORIES IN URINE FROM KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS WITH ACUTE REJECTION, CHRONIC REJECTION, AND LONG-TERM GRAFT SURVIVAL.**

Carlos Carmona<sup>1</sup>, Marlon Castrillón<sup>1</sup>, John Fredy Nieto<sup>2</sup>, Gustavo Zuluaga<sup>2</sup>, Luis Fernando Arias<sup>3</sup>, Cristian Álvarez<sup>1</sup>

1 Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2 Unidad de Nefrología. Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

3 Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

### **5.1 Introduction**

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage chronic kidney disease (ESRD). Transplantation, together with dialysis, constitutes replacement therapies for patients with ESRD; however, transplantation is a better therapy, especially for aspects related to improving the quality of life of patients (1). According to the WHO, in 2019, 23,401 transplants were performed in the United States, which shows the high demand for kidneys in patients with ESRD (2). In Colombia, kidney transplants are the most demanded as in the last two years around 65% of transplant performed were of kidney; the waiting list for a renal transplant showed an increase of 17% during 2021 and 2022.

Despite the usefulness of transplantation, the main limitation for long-term graft survival is chronic rejection (2,3). Rejection is a process mediated by the immune response that is triggered after transplant (4,5). The graft constitutes a significant source of alloantigens, that activate recipient's immune system. This response is previously primed by donor death, cell damage caused by organ removal, ischemia reperfusion injury and finally, by blood recirculation after surgical anastomosis as these processes allows the releasing of alarmins (2,4,6). This innate activation is going in turn to promote the activation of recipient's T cells through direct, indirect, and semi direct allorecognition which are paramount for an adaptive response against the graft. Although the risk of immune-mediated rejection in renal transplant patients is high, long-term graft survival has been observed in some patients under conditions of minimal or no immunosuppression (7), which has been an issue of

interest in transplant research. However, in clinical practice it has been difficult to address the tolerance and/or regulation mechanisms in these patients, since it is estimated that only 1 in 3,000 transplanted individuals present this condition (8). All this together has motivated the development of studies focused both on understanding the mechanisms that mediate graft acceptance and rejection, as well as on the search for molecules that make possible to establish measurable differences for monitoring transplant patients, and for the non-invasive diagnosis of rejection.

Based on this and considering kidney function, urine has been proposed as a non-invasive and highly useful sample for the search for biomarkers associated with renal graft outcome (9). However, its implementation for the isolation of nucleic acids, and particularly RNA, has represented a great challenge considering the high degradation rate of this nucleic acid (1). In previous works, several authors identified an increase in the urine mRNA levels for genes such as *CD3E*, *CXCL10/IP-10*, and *18S rRNA* in patients with antibody-mediated rejection (ABMR) and *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, and *CCL5* in patients with T-cell mediated rejection (4,5), which has suggested that there is a direct relationship between the mechanisms that mediate rejection or acceptance and molecular findings. However, an increase in the levels of molecules such as *FOXP3* has also been described in patients with acute rejection.

Despite multiple attempts to establish a molecular panorama in urine that can predict and be implemented as a diagnostic tool for kidney graft outcomes, to date it has not been possible to establish specific biomarkers for graft rejection or graft acceptance, so it follows a topic within transplant immunology with much to explore.

To address some of the effector mechanisms of the graft response that culminate in graft rejection or acceptance from a molecular-exploratory perspective, we set out to explore and evaluate changes in gene expression in urine of kidney transplant patients with acute rejection, chronic rejection, and long-term graft survival. This would allow to propose urine as an alternative matrix for the search of genes up regulated during the response to the graft. For this, we optimized a protocol for obtaining RNA from urinary sediment suitable for its implementation in RNA-Seq. Taking into account the exploratory nature of our work, RNA-Seq constitutes an optimal tool since it allows the identification of changes in gene expression of multiple genes implemented in turn to perform functional analyzes that allow a more in-depth evaluation of effector immunological mechanisms associated with both acute and chronic rejection or acceptance of the renal graft, especially due to the previously described concordance between the observations in renal biopsy and urine.

## **5.2 Materials and methods**

### **5.2.1 Patients and controls**

Patients with a histopathological diagnosis of acute rejection (AcR, n=3), chronic rejection (Chr, n=3) and long-term graft survival (Sta, n=2) were included.

### **5.2.2 Samples**

Considering that our aim was to identify both differences in gene expression associated mainly with the immune response involved in renal graft rejection and survival, and differentially expressed genes that may be potential detectable biomarkers in a non-invasive sample, we collected urine samples from patients with acute rejection (AcR), chronic rejection (Chr) and long-term graft survival (Sta). This was due to previous findings demonstrating that immunological events that occur at the renal tissue are reflected in urine. Samples were collected and processed as described below.

200 mL of urine were collected from all individuals using sterile tubes previously treated with RNase inhibitor solution. Samples were placed in liquid nitrogen and immediately transported to the laboratory for processing. Next, samples were centrifuged at 3000 xg for 30 min at 4°C. The pellet (~200µL) was treated with 1 mL Tri Reagent and 2 µL glycogen (Thermo Scientific) and vortexed until complete lysis.

Then, 200 µL of chloroform were added and incubated at room temperature for 3 min. Subsequently, it was vortexed for 15 S and centrifuged at 12,000 xg for 15 min at 4°C. Next, the aqueous phase was recovered in a 1.5 mL tube and a volume of previously cooled absolute isopropanol and 100 µL of sodium acetate were added. Samples were placed at -20°C for 30 min and centrifuged at 12,000 xg for 15 min. Supernatants were discarded and washed with 1 mL of 70% ethanol, 10,000 xg for 10 min. The RNA was resuspended in 50 µL of nuclease-free water and deep-frozen at -80°C.

Final concentration, integrity and purity of nucleic acids were quantified using the 4200TapeStation (Agilent) in Macrogen Inc., Seoul, South Korea. RNA integrity was determined with the percentage of transcripts with a size equal to or greater than 200 nt (%DV200).

### **5.2.3 Library preparation and sequencing**

cDNA libraries were generated at Macrogen Inc., Seoul, South Korea, using the the Sure Select XT Direct Human kit (Agilent) from 200 ng of total RNA. The manufacturer's instructions were followed.

Sequencing was performed at Macrogen Inc., Seoul, South Korea on the NovaSeq 6000 platform (Illumina, Macrogen), paired end, 150 base pairs. Total reads, %GC, and Phred Score values (%Q30) were calculated from the generated data to determine sequencing quality.

#### **5.2.4 Data analysis**

Figure 1 is an overview of the methodology implemented for data analysis. Raw data were mapped against the GRCh38/hg38 human reference genome using Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (9). Data cleaning was performed with this tool as well. From mapping, raw counts were obtained and a raw counts table was built listing the number of counts for each gene in each of the sequenced libraries. This table was used as input for the analysis of differential gene expression.

Analyses were performed in R using the EdgeR (10) package in RStudio. Initially, gene annotation was performed using BiomaRt (11). With the annotation gene SYMBOLS, gene biotypes and descriptions of each one, were obtained. Subsequently, the required format was given to the data table and the counts per million (CPM) were obtained from which the data with counts less than 0.5 were removed. An initial data exploration of the data was then carried out by means of multidimensional scaling (MDS) and hierarchical clustering (HC) of the 1000 genes with the greatest variability.

Data were normalized using the calcNormFactors function with the trimmed mean of M-values (TMM) method and the table of effective counts was obtained with which the subsequent analyzes were performed.

#### **5.2.5 Identification of differentially expressed genes (DEGs)**

To determine differentially expressed genes (DEGs), the Robinson and Smyth Exact Test was applied, with a coefficient of biological variation of 0.4. Comparisons were made in pairs between groups of study. From this analysis, p values were obtained and those with a value equal to or less than 0.05 were considered significant. Additionally, the Log<sub>2</sub> Fold Change (LogFC) values were obtained and genes with LogFC greater than 2 and LogFC less than -2 were considered as positively or negatively regulated, respectively. Likewise, the adjusted p-value (FDR) was obtained using the Benjamini Hochberg test.

#### **5.2.6 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)**

GSEA was performed with ClusterProfiler (v3.16) (12) in RStudio, using the gseGO function. The analysis was made from the general DEGs obtained from each of the comparisons (AcR/Sta, Chr/Sta and Chr/AcR). The selected ontology was *Biological Process*, with a p.value cutoff of 0.05 and using

the Benjamini-Hochberg adjustment method. Subsequently, the data were exported with information from the description of the functional category, normalized enrichment score (NES) values, and adjusted p-value (p.adjust).

### **5.2.7 STRING analysis**

To perform a functional analysis from the most significant DEGs, the top 1000 with the highest significance based on the FDR were selected. Each set of 1000 genes, was used as input for the analysis in STRING v11 (13). From this analysis, biological processes were identified from Gene Ontology (GO) as well as functional categories from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and REACTOME. The selection of the top 20 of the categories and biological processes with the highest enrichment was made based on the p.adjust. This analysis was also carried out in a second moment, after obtaining the immune DEGs from the general DEGs. With this second part, we sought to identify the functional categories and processes of GO associated with the genes annotated in the functional category *immune system process (GO:0002376)*.

### **5.2.8 Identification of the most significant immune DEGs**

From the general DEGs, we select the top 2000 genes with the highest level of significance based on the FDR in each of the comparisons previously described. Each set of 2000 genes, was analyzed using PANTHER17.0. From this analysis, the *immune system process category (GO:0002376)* was selected. Subsequently, the genes that were annotated in this functional category were obtained and identified as immunological genes or immune DEGs for subsequent analyses.

### **5.2.9 Calculation of cell fractions in urine of AcR, Chr and Sta**

From raw counts, transcripts per million (TPM) of the AcR, Chr and Sta urine libraries were calculated using the DGEobj.utils tool in EdgeR and the convertCounts function. TPM were used as input for the analysis of cell enrichment using xCell in RStudio (14). The analysis yields the fractions of different subtypes of immune and stromal cells.

## **5.3 Results.**

### **5.3.1 Library exploration and number of DEGS in AcR vs Sta and Chr vs Sta**

To identify transcriptional differences between AcR and Sta and Chr and Sta, an initial exploration was performed using MDS and HC from the normalized data. As a metric, the Euclidean distance

was implemented, and we observed the formation of two clusters corresponding to the sequenced libraries of AcR and Sta (figures 2A and 2C) and Chr and Sta (figures 2B and 2D). In the AcR vs Sta comparison, the greatest distance was observed in dimension 1 with 62% of variability explanation. In dimension 2, a percentage of 19% was observed (figure 2A). In the Chr vs Sta comparison, a greater distance was also observed in component 1, with a variability explanation percentage of 64% and 15% in component 2 (figure 2B). Likewise, in AcR vs Sta and Chr vs Sta we observed the formation of two clusters corresponding to each outcome in the HC analysis (figures 2C and 2D).

Upon the application of the Robinson & Smyth Exact Test in EdgeR, the number of DEGs was identified, and gene annotation was done using BiomaRt. To assume gene regulation, an  $FDR \leq 0.05$  and a  $LogFC$  value  $\geq 2$  for the up-regulated genes and  $\leq -2$  for the down-regulated were considered. Analysis was done separately for AcR vs Sta and Chr vs Sta. Considering that in both AcR and Chr DEGs were identified based on the expression levels in Sta, it was assumed that down regulated genes in both cases corresponded to up regulated genes in Sta.

In AcR vs Sta, 4321 genes up were regulated in AcR and 8199 were down regulated. The latter were considered up-regulated in Sta. In Chr vs Sta, 4896 were up regulated in Chr and 9,204 down regulated. The latter were considered up regulated in Sta (Figure 2E). When comparing the number of genes regulated in AcR and Chr in relation to Sta, 3688 genes (24%) were up regulated simultaneously in AcR and Chr, 612 (4%) up regulated exclusively in AcR, 1206 (8%) up regulated exclusively in Chr and 7573 (49%) down regulated simultaneously in AcR and Sta. The latter corresponded to the total number of genes upregulated in Sta in relation to AcR and Chr (Figure 2F).

### **5.3.2 Functional categories and biological processes of Gene Ontology based on DEGs in AcR, Chr and Sta**

With DEGs obtained from each comparison, we performed a GSEA using ClusterProfiler 3.16, to explore biological processes (BP) of Gene Ontology (GO), which we named general biological processes, as they were obtained from general DEGs. We also obtained data such as description of the biological process, normalized enrichment score (NES), number of genes associated with each process, and associated genes (SYMBOLS). (Supplementary Table 1).

To identify GO biological processes with the highest enrichment based on the level of activation, gene ratio (GR) and the NES were considered. From the GR, the top 8 of the Activated (with positive regulation in AcR and Chr) and suppressed (with positive regulation in Sta) processes with the highest enrichment were obtained. Based on GR and FDR we found activated in AcR processes as cytoplasmic pattern recognition signaling pathway, presentation of exogenous peptide antigen via

MHC class I TAP dependent, cotranslational protein targeting to membrane, autophagy of mitochondrion, negative regulation of response to biotic stimulus (Figure 3A, left panel). Within the processes suppressed in AcR, which consequently are those activated in Sta, the top 8 of the most enriched processes according to GR were: positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT, G protein-coupled serotonin receptor signaling pathway and natural killer cell activation involved in immune response (Figure 3A, right panel).

Among the enriched biological processes activated in Chr, we found vesicle coating, cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway, antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP dependent, autophagy of mitochondrion, nitric oxide biosynthetic process, negative regulation of response to biotic stimulus and regulation of translational initiation (figure 3B, left panel). Processes suppressed in Chr and activated in Sta depending on GR included: serotonin receptor signaling pathway, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT, G protein-coupled serotonin, G protein coupled receptor signaling pathway, neuron fate specification, diencephalon development, and neuron fate commitment (figure 3B, right panel).

On the other hand, in Chr vs Sta a similar landscape was identified since some of the biological processes enriched according to the GR coincide with those observed in AcR vs Sta. This result is consistent with other findings reported by us in which it was observed that in renal tissue and urine of AcR and Chr patients there was a great similarity in the genes and biological processes positively regulated in relation to peripheral blood.

Next, we selected the most enriched processes based on the NES and obtained the top 20 biological processes with the highest enrichment in AcR vs Sta and Chr vs Sta. Biological processes described in Figure 3C, and Supplementary Table 1 were identified in AcR vs Sta. These included: cotranslational protein targeting to membrane, autophagy of mitochondrion, mitochondrion disassembly, interferon-gamma-mediated signaling pathway, positive regulation of reactive oxygen species metabolic process, cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway, antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent, virion assembly, response to interleukin-7, and rDNA heterochromatin assembly.

Biological processes with negative NES, which were described as activated in Sta/AcR included: serotonin receptor signaling pathway, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT protein, natural killer cell activation involved in immune response, detection of chemical stimulus involved in sensory perception of taste, regulation of flagellated sperm motility, positive regulation

of cell fate commitment, cellular glucuronidation, phagocytosis, recognition, detection of visible light, and regulation of T-helper 17 cell lineage commitment (Figure 3C).

On the other hand, within the top 20 biological processes enriched in Chr vs Sta according to the NES (Figure 3D, and Supplementary Table 1), some of the following were found: positive regulation of type I interferon production, endosome organization, antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, ER-nucleus signaling pathway, positive regulation of viral process, autophagy of mitochondrion, mitochondrion disassembly, response to interleukin-12, activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, ubiquitin-dependent ERAD pathway, lipopolysaccharide-mediated signaling pathway, regulation of nitric oxide metabolic process, and cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway

In Sta vs Chr, the enriched biological processes were: neuron fate specification, positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT protein, G protein-coupled serotonin receptor signaling pathway, natural killer cell activation involved in immune response, pituitary gland development, cell fate commitment involved in pattern specification, and spinal cord dorsal/ventral patterning and regulation of cilium movement involved in cell motility (figure 3E and supplementary table 1).

### **5.3.3 Functional categories of GO, KEGG and REACTOME associated to the most up regulated 1000 genes in AcR, Chr and Sta**

To deepen in the identification of biological processes associated with DEGs in AcR, Chr and Sta, we selected the 1000 genes with the highest level of significance based on the FDR and performed an analysis in STRING 11.5 to look for functional pathways associated with Biological Process (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and REACTOME.

As seen in Figure 4, a high concordance was identified between the different functional pathways identified in the GSEA and STRING analysis. In AcR vs Sta it was found that the GO biological processes with the highest level of significance were Immune system process ( $p.adjust=1.10 \times 10^{-51}$ ) and Immune response ( $p.adjust=2.79 \times 10^{-51}$ ). Additionally, processes associated with the activation and degranulation of neutrophils, activation of myeloid cells and exocytosis were found (figure 4A). In the KEGG pathways, we observed an enrichment of relevant processes previously described in the graft response, such as Chemokine signaling pathway ( $p.adjust=2.72 \times 10^{-07}$ ), Antigen processing and presentation ( $p.adjust=3.27 \times 10^{-07}$ ) and Leukocyte transendothelial migration ( $p.adjust=3.91 \times 10^{-07}$ ) (figure 4B). In the AcR-enriched REACTOME pathways, we identified: Immune system

(FDR=1.40x10<sup>-53</sup>), Neutrophil degranulation (FDR=2.94x10<sup>-47</sup>), Innate immune system (FDR=2.67x10<sup>-46</sup>) and pathways associated with the response to stimulus, signaling by IL-4, IL-10 and IFN-gamma (figure 4C).

On the other hand, in Chr vs Sta, we observed a similar behavior: In GO, we found an enrichment for Immune system process (p.adjust=1.06x10<sup>-71</sup>) and Immune response (p.adjust=5.07x10<sup>-65</sup>). Likewise, a high significance was observed in categories associated with myeloid cell activation, neutrophil activation and degranulation, and exocytosis (Figure 4D).

In KEGG pathways, the enrichment of categories associated with the immune response were observed, such as: Phagosome (p.adjust=5.67x10<sup>-11</sup>), Leukocyte transendothelial migration (p.adjust=3.67E-09), Endocytosis (p.adjust=1.23E-08 ) and Antigen processing and presentation (p.adjust=1.50E-08) (Figure 4E). In REACTOME pathways, we observed an enrichment for Immune system (p.adjust=1.33x10<sup>-72</sup>), Innate immune system (p.adjust=1.85x10<sup>-60</sup>) and Neutrophil degranulation (p.adjust=1.13E-56). Additionally, other important pathways in the response to the graft were found to be enriched, such as Cytokine signaling in the immune system, Interleukin-4 and interleukin-13 signaling, Interferon signaling and Interleukin-10 signaling (Figure 4F).

#### **5.3.4 Immune DEGs and functional categories associated with most up regulated genes in AcR, Chr and Sta**

Results described so far suggest a similar landscape between AcR and Chr in gene regulation and biological process activated when compared to Sta. These processes included antigenic presentation and activation and degranulation of neutrophils and other myeloid cells. However, considering that histopathological findings and the immunological mechanisms previously described in the literature differentiate AcR from Chr, there must be transcriptional differences between both types of rejection.

Since one of our objectives was to identify molecules and biological processes that are differentially regulated in AcR, Chr and Sta, we made a selection of the 2000 genes with the highest level of expression and significance in each of the comparisons made, and identified the number of exclusive up regulated genes in AcR, which resulted from the comparison between acute rejection and long-term graft survival (AcR/Sta), exclusive up regulated genes in Chr, resulted from the comparison between chronic rejection and graft survival long-term (Chr/Sta), and the up regulated genes in Sta obtained from the down-regulated genes in each of the comparisons (Supplementary Table 2). After selecting the 2000 genes for each of the previously described cases, 467 up-regulated genes were

observed in AcR, 467 up-regulated in Chr, and 1533 shared by AcR and Chr. Likewise, 780 genes were down regulated in both AcR and Chr. In addition, 1220 genes were found to be up regulated in Sta relative to the comparison with AcR and Chr (figure 5).

As rejection and graft survival are mainly dependent on the immune response triggered after transplantation (1,2), we paid special attention to the genes annotated within the biological process of GO Immune response and named them *immune DEGs*. For this, we used PANTHER17.0 to analyze the genes exclusive to AcR and Chr, and those upregulated in Sta after the comparison with both types of rejection (figure 1). From the analysis, 11 immune DEGs were identified in AcR vs Sta, 26 in Chr vs Sta and 30 in Sta (supplementary table 2).

The Immune DEGs with the highest level of significance in AcR vs Sta included *CCL22*, *CST7*, *CCR7*, *CXCL2*, *SLAMF7*, *SRC*, *CCL20*, *GATA3*, *CLEC4E*, *CSF1R* and *IL1A*, which together create an interaction network associated with processes such as: Response to other organism, Immune response, inflammatory response, chemotaxis, leukocyte migration and chemokine-mediated signaling pathway (figures 5B, 5D and table 1).

In Chr vs Sta the top 10 of the 26 most significant immune DEGs were: *IGKC*, *IL36A*, *CEACAM3*, *FYB1*, *CD274*, *CCL4L2*, *JAK3*, *FAS*, *DOCK8* and *ITGA3* (Figure 5C). These 26 genes were associated in an interaction network involved in functional pathways such as immune system process, immune response, cell Surface receptor signaling pathway, response to cytokine, regulation of T cell activation, regulation of cytokine production, NF-kappa B signaling pathway, Allograft rejection, Innate immune system, and Adaptive immune system (Figure 5E and Table 2).

In Sta, the top 10 of the 30 Immune DEGs with the highest level of significance were: *MOG*, *IFNA6*, *IFNA8*, *IFNA16*, *GALP*, *IFNA7*, *IFNA10*, *IGHV3OR16-9*, *FGL1* and *PSG1*. These 30 genes were associated with functional processes such as Natural killer cell activation involved in immune response, B cell proliferation, Regulation of immune response, and Type I interferon signaling pathway (Figure 5F and Table 3). Among the findings, it was also identified that *FOXP3* was increased in Sta with respect to AcR and Chr. However, and strikingly, this gene was not annotated within the analysis of Immune DEGs (figures 5B and 5C). An interesting finding was the upregulation of the *FGL1* gene in both Sta vs AcR and Sta vs Chr. This gene was included in the *Regulation of Immune response process* and has been previously described as a checkpoint of the immune response in heart transplantation models and in chronic inflammatory diseases.

### 5.3.5 AcR and Chr exclusive immune DEGS

The previous analyzes were done the context of acute rejection and chronic rejection in relation to long-term graft survival. In rejection, both AcR and Chr, biological processes and genes associated with the activation of the immune response were identified, without notable differences between AcR and Chr, whereas in Sta an enrichment of genes and biological processes linked to immune regulation was observed.

To identify more specific differences between AcR and Chr, we performed differential gene expression analysis in AcR vs Chr. The analysis found 815 genes up-regulated in AcR and 423 up-regulated in Chr (Figure 6A).

When performing a GSEA to evaluate the GO biological processes associated with DEGs in AcR vs Chr, it was found that processes such as complement activation classical pathway, signaling pathway involved in phagocytosis, Fc-gamma receptor, regulation of complement activation and regulation of immune humoral response were enriched in Chr in relation with AcR. (Figure 6B). These findings suggest that chronic rejection, as has already been reported, requires a higher level of immunological activation that culminates in the establishment of a humoral response.

By reviewing the up regulated genes in both AcR and Chr, we identified genes that were also found to be up regulated in the analysis with respect to Sta. These include, for AcR: *CCR7*, *CST7* and *CCL22* and for Chr, *CEACAM3* *IL36A* and *CD274* (Figure 6A). This finding suggests that these molecules could be markers of acute and chronic rejection and that they can be detected in urine of these patients.

### 5.3.6 Urinary cell fractions of AcR, Chr and Sta

To explore the cellular landscape in urine of kidney transplant patients, which could reflect cells infiltrating the post-transplant tissue to mediate rejection or acceptance, we performed a cell enrichment analysis using xCell. From this analysis, we identified high cell diversity of both stromal and immune cells, a finding that had already been described by Suthanthiran et al. When reviewing the immune cell fractions, an enrichment of Th1 cells was found in AcR and Chr, while in Sta it was observed that this subpopulation of T cells is not present or is present in a lower proportion (Figure 7A). Some subpopulations of T cells such as CD4+ naive T cells were found to be more enriched in both AcR and Chr, and CD4+ T cells, CD8+ naive T cells, CD8+ T cells and CD8+ Tcm were found to be more enriched in Chr. Remarkably, in AcR it was observed a slight enrichment of Tregs compared to Sta and Chr (Figure 7A). Regarding cells of myeloid lineage, macrophage enrichment in AcR and Chr was observed, with M1 macrophages being the most enriched in Chr. Likewise, monocytes also had higher Chr enrichment in urine (Figure 7B).

When reviewing the enrichment of immune cells in Sta patients, we observed a high enrichment of NKT cells, pro B cells, Th2 lymphocytes and class-switched memory B-cells. In the myeloid lineage we found an enrichment of M2 macrophages and mast cells. The latter were also found to be enriched in AcR. Finally, in Sta we observed higher fractions of cells such as plasmacytoid dendritic cells (pDCs), conventional dendritic cells (cDCs) (figure 7C) and fractions of cells with a lower degree of maturity such as hematopoietic (HSCs) and granulocyte/monocyte progenitors (Figure 7D). In general, in AcR and Chr a higher score associated with the enrichment of immunological cells was found than in Sta, and in turn, the cellular component associated with immunological cells was higher in both types of rejection compared to stromal cells. On the other hand, in Sta a balance was observed between the immunological score and the stromal score (figure 7E). These findings are in line with the observations made from the functional analyzes by both GSEA and STRING. Likewise, they have a high concordance with the effector mechanisms associated with each of the outcomes of the renal graft.

#### **5.4 Discussion and analysis**

Despite the relevance of kidney transplantation as replacement therapy for patients with ESRD due to the impact it has on their quality of life (1), to date there are still limitations that interfere with the stable and long-term functioning of the graft. The main threat is represented by rejection, and particularly, chronic rejection (15), even when patients are subjected to maintenance immunomodulatory therapies. However, some patients reach times of up to 10 years or more with a functional graft and without evidence of rejection under the same conditions of immunomodulatory therapy, and in some cases, under lower or no doses of these drugs (16). However, the proportion of patients who achieve this type of survival or reach operational tolerance is very low, since out of 3000 patients who received a kidney transplant, only 1 acquired this condition (7).

Allorecognition is an immunological process that takes place in all transplants, (17,18) and plays an important role in determining the outcome of the graft. Although effector immunological mechanisms associated with the different types of rejection and long-term graft survival have been reported (7,15,19), it has not yet been possible to establish concrete differences among mechanisms involved in these outcomes that also allow the identification of more specific therapeutic targets and predictive, diagnostic, or monitoring biomarkers for kidney transplant patients.

Biomarkers represent a topic of special interest in personalized and precision medicine and in transplant research, since the establishment of a molecular profile associated with the effector immunological mechanisms that are activated after renal transplantation could have a clinical impact on procedures such as the diagnosis of rejection, which, to date, is strictly dependent on the histopathological diagnosis from biopsy (20), and on the monitoring of transplant patients and the response to therapy, which are based on paraclinical findings with low sensitivity (21). Since the identification of a suitable biomarker is based on the non-invasiveness of samples implemented, it has been proposed that urine is a source of biomarkers consistent with the processes that occur at the renal tissue.

To explore the molecular mechanisms involved in renal graft outcomes, such as acute rejection, chronic rejection, and long-term graft survival, we proposed, in urine specimens, a methodology focused on the noninvasive identification of enriched biological processes and functional categories, from the evaluation of differentially expressed genes (DEGs) obtained from RNA-Seq. The exploration was based on the initial identification of general biological processes obtained from the total DEGs (general DEGs), to continue carrying out more specific explorations of biological processes associated with the immune response from immune genes (immune DEGs) derived from the General DEGs with higher level of significance. Likewise, from both of general and immune DEGs, we explored functional categories of Gene Ontology (GO), KEGG and REACTOME. The objective of this analysis, going from the general to the specific, was the identification of up-regulated genes that: 1, were obtained from the biological processes and functional categories with the highest enrichment in AcR, Chr and Sta, and 2, could be, upon a validation, potential biomarkers of each of the outcomes.

For this, we sequenced the RNA obtained from the urinary sediment of kidney transplant patients classified as AcR, Chr, and Sta. After sequencing, data were analyzed as described in Figure 1.

With an exploratory analysis of raw counts using multidimensional scaling and hierarchical clustering, two general observations were made: 1, the AcR and Chr patient libraries clustered significantly further from the Sta libraries, and 2, when comparing AcR and Chr libraries, AcR displayed greater heterogeneity (figures 2A and 2C). When analyzing the 1000 genes with the greatest variability using an unsupervised hierarchical clustering analysis, the formation of two clusters corresponding to AcR and Sta and Chr and Sta libraries was observed (figures 2C and 2D, respectively).

Since one of our aims was the identification of differences between AcR and Sta patients, Chr and Sta patients, and AcR and Chr patients, we performed differential expression analysis at these three levels. In the first part we focused on the identification of differences between rejection and long-term graft survival, so the comparisons were made AcR vs Sta and Chr/Sta. In both cases, the libraries were normalized separately, that is, AcR libraries were normalized with Sta, and Chr libraries were normalized with Sta.

In AcR, 4321 up-regulated and 8199 down-regulated genes were identified. In Chr, 4896 up-regulated genes and 9204 down-regulated genes were identified. The 8199 and 9204 down-regulated genes corresponded to the up-regulated genes in Sta.

With the unsupervised GSEA, which was performed with the whole DEGs, we identified that many of the AcR-enriched biological processes were also Chr-enriched, and that these were mostly processes associated with the immune system. Among these, antigenic presentation by MHC class I dependent on TAP and organization of the endosome stand out, which highlights the role of allorecognition in the establishment of the specific response against the renal graft. Remarkably we found that processes as signaling by IL-12 and cellular response to IL-12 were increased only in Chr. This family of cytokines has typically been proinflammatory and IL-12 is implicated in Th1 cell activation (22). Likewise, pioneering publications in this area identified the IL-12/interferon-gamma axis as a potential mediator of vascular rejection in murine models of transplantation (23). It is important to highlight that in the GSEA an enrichment of positive regulation of interferon-gamma production in Chr was also found, which is in line with the mechanisms that mediating rejection.

As observed in figure 3C the response to IL-7 was enriched in AcR. This cytokine is important at low doses in the regulation of T-cell homeostasis, as well as in B-cell development. However, the increase in IL-7 concentration has been associated with inflammatory diseases, and in the context of transplantation, it has been found that the increase in IL-7 levels is associated with rejection, among others, due to the increase in the frequency of CD8<sup>+</sup> cells and the decrease in the frequency of CD4<sup>+</sup> cells, FOXP3<sup>+</sup> (24).

On the other hand, in Sta the enrichment of biological processes associated with the immune system was observed, which included NK cell activation, regulation of the Th17 cell lineage, and STAT phosphorylation (Figures 3A and 3B, right panels). These findings are important as NK cell activation has typically been associated with rejection. Previous studies have shown that these cells are recruited to the graft, where they will mediate the pro-inflammatory response either by the production of pro-inflammatory cytokines, or by the production of perforin and granzyme involved in cell lysis of renal

tissue (25). Other studies have also reported the deleterious role of NK cells in the graft response through their participation in dendritic cell maturation, with subsequent activation of T cells, and through direct interaction with CD4<sup>+</sup> cells (27).

However, other studies and reports have also described that immune cells may have dual roles in the graft response (25). Particularly, NK cells have also been associated with the establishment of tolerance in kidney transplant patients and not only in amplification of the inflammatory response. The mechanisms described by which NK cells can promote a tolerogenic environment are given by the probability that these cells recognize and respond to antigen-presenting cells and allogeneic T cells due to the absence of their own MHC class I, or due to the recognition of Fc fractions exposed by other cell types given stress conditions. This mechanism is then based on the regulation of processes such as antigen presentation and the activation of effector T cells that can subsequently promote a pro-inflammatory microenvironment (28). Other authors have associated the generation of a tolerogenic environment modulated by NK cells by the production of IL-10 and by changes in gene expression in these cells, which includes the negative regulation of genes such as KIR2DS5, NKp46 and CD16 (27,29, 30). The enrichment of NK cells activation in Sta patients in relation to rejection could then be related to a role of these cells in the establishment of tolerance or in promoting a tolerogenic environment.

To focus the functional analysis on the DEGs with the highest level of significance, the 1000 most up-regulated genes in AcR, Chr and Sta were manually selected; for the latter, genes were selected from the comparisons with AcR and Chr. With the top 1000 of the genes with the highest level of positive regulation, the identification of functional categories of GO, KEGG and REACTOME was performed (Figure 1).

GO biological processes enriched in both AcR and Chr included activation of myeloid cells and activation and degranulation of neutrophils. Neutrophils have been widely described in acute and chronic rejection in different types of transplantation. Neutrophils participate in acute tissue injury by producing reactive oxygen species, and by activating the NADPH oxidase system. Likewise, in processes such as acute cellular rejection, it has been observed that neutrophils stimulate the infiltration of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. It has also been observed that the depletion of these cells promotes an environment of immunosuppression and tolerance that reduces the infiltration of IL-12-producing antigen-presenting cells with the subsequent reduction of Th1 cells (28). These same mechanisms have been observed in chronic rejection, which indicates that the infiltration response of these cells may indeed be a process common to AcR and Chr. Other studies have associated the increased frequency of neutrophils with acute rejection. Giray et al. reported through a retrospective

study that the increase in the neutrophil/lymphocyte ratio is directly associated with acute rejection, and at the same time they propose this as a marker of rejection (31). The functional categories enriched in REACTOME were redundant with respect to those initially identified in the GSEA. In AcR and in Chr, processes such as the immune system, neutrophil degranulation, cytokine signaling, and response to stimuli were found to be enriched.

Next, we specifically focused on the Immune DEGs obtained from the top 2000 most up-regulated genes in AcR, Chr, and Sta. The functional analysis of these genes revealed that in AcR the immune DEGs are mainly involved in inflammatory response, chemotaxis and response to cytokines. Among the findings at the level of individual genes, the positive regulation of *CST7* stands out. This gene codes for cystatin 7, which is a cysteine protease targeting cathepsin C. Sawyer et al. reported that under conditions of acute inflammation, *CST7* is upregulated by neutrophils (32). Likewise, in a review by Halloran, *CST7* was identified among the top 50 transcripts associated with acute rejection in kidney transplantation (33) and in a study by Van Loon et al., its positive regulation was identified by microarrays, in patient biopsies with renal transplantation who suffered T-cell mediated rejection, which is the main mechanism of acute rejection (34).

Another important finding in AcR is the positive regulation of *CCR7*. This gene encodes for the *CCL19* ligand receptor and is required for the migration of T cells to secondary lymphoid nodules and the subsequent establishment of the adaptive response (35). This finding is of great importance, since it is complemented by the finding in the functional analysis in which the enrichment of antigenic presentation was observed, which could in turn be linked to immune activation through allorecognition. It should be noted that both *CST7* and *CCR7* and *CCL22* were also upregulated in the analysis of functional differential expression between AcR and Chr. This observation could suggest that these three genes, in addition to differentiating acute rejection from long-term graft survival, also could make it possible to differentiate acute rejection from chronic rejection based on the quantification of transcripts in urine samples.

In the functional analysis of the immune DEGs in Chr, the enrichment of the response to cytokines, activation of T cells, activation of the NF- $\kappa$ B pathway, innate immune system and graft rejection were observed. At the gene level, an increase in IL-36A regulation was found. This cytokine is associated with the development of inflammatory responses and its main role is in the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and MAPK kinases with the subsequent production of proinflammatory cytokines (36). In addition to its role in the inflammatory response, IL-36A is also associated with the development of renal fibrosis, which is why it has been described as a biomarker of chronic kidney disease (37). *CD274*, or PD-L1, was also found to be upregulated in Chr urine. The product of this gene is

associated with the induction and maintenance of immunological tolerance (38). It is mainly expressed on macrophages and activated T cells, especially under inflammatory conditions. Although it is a marker of tolerance, it is striking that it has been found to be up regulated in Chr. However, Venner et al. had already reported an increase in the expression of B7 family molecules such as CTLA4, PD-L1 and PDL2 in biopsies from transplant patients of kidney with cellular rejection (39). Although the inflammatory response that mediates rejection requires a drop in the expression of checkpoint molecules, the authors suggest that the increase in molecules such as PD-L1 is due to a counter-response to the inflammatory process required to maintain homeostasis at the tissue level. The increase in *CD274* in Chr could therefore be an indicator of a balance between the inflammatory response associated with graft outcome, but it could also be an event associated with the development of fibrosis, which is a histopathological finding in chronic rejection. The relationship between *CD274* and the development of fibrosis has been previously reported since the regulation of fibroblast activity has been observed after the interaction between this molecule (which is also called PD-L1) with PD-1 (48).

Once again, as in Chr, genes such as *IL36A*, *PDL1* and *CEACAM3* were also found to be positively regulated in the Chr vs AcR comparison, so their detection in the urine of transplant patients could differentiate chronic from acute rejection and, from patients with long-term graft survival.

In Sta, processes such as NK cell and B cell activation were found to be enriched, which agrees with findings in our previous functional analyses. Within the genes associated with these categories, genes such as *IFNA2*, *IFNA4*, *IFNA6*, and *IFNA8* were identified. One of the most relevant findings in the urine of Sta patients was the positive regulation of genes such as *FOXP3* and *FGL1*. *FOXP3* is an important transcription factor that regulates the lineage of regulatory T cells (Tregs) (40) and in turn, this subpopulation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> lymphocytes have been reported as one of the main mediators of tolerance in transplant patients due to its ability to regulate the inflammatory response. Several studies have raised the possibility of using cell therapies with Tregs; however, the implementation of this strategy in a clinical context has been complex (41). It is important to highlight the finding of this positively regulated gene in the urine of Sta patients, since it may be an indicator of the infiltration of Tregs into the renal tissue of these patients which could subsequently be involved in the establishment of tolerance.

*FGL1* was also found increased in urine of Sta. The product of this gene is the LAG3 ligand, which is an inhibitory molecule expressed by T cells which reduces their activation levels (42). The canonical ligand of LAG3 is MHC class II expressed by antigen-presenting cells and after the interaction between both molecules a negative signal is generated to the T cell. However, recent

studies have shown that FGL1 can generate an inhibitory signal after its interaction with LAG3, independent of MHC class II. Some authors have proposed FGL1 as a new immunological checkpoint (43) that could be of importance in transplants. Studies in mouse models in which modified extracellular vesicles were implemented to “deliver” FGL1 and PDL1, demonstrated a transition from an inflammatory to a regulatory and tolerogenic response in a heart transplant model in mice (44). These findings could suggest that the increased expression of *FGL1* in urine of Sta could be associated with a level of attenuation of the T cell response at the tissue level, which in turn may be contributing to graft survival.

Next, we explored DEGs, and biological processes enriched by comparing AcR with Chr. As mentioned previously, some of the genes found to be upregulated in comparison to Sta were found to be upregulated in this second analysis. Additionally, when observing the biological processes, it was striking that enrichment of the humoral response and complement activation were observed in Chr, which are pathways that have been mostly associated with chronic rejection (45).

In the cell enrichment analysis, we identified a high concordance between the different biological processes enriched in each of the comparisons made and the cells, which, based on the analysis, are part of the urinary sediment. In this way, we found that indeed in AcR and Chr patients there is more enrichment of Th1 cells, M1 macrophages, which has been associated with having a proinflammatory profile (46), while in Sta patients less enrichment of these cells was found and it was identified an increase in pro-b cells, mast cells, and NKT cells. These last two have been previously reported to have an important role in the development of immunological tolerance (28,47). Interestingly, no differential enrichment of NK cells was found in Sta as observed with previous functional analyses.

Although at first broad similarities were found in the biological processes and functional categories between AcR and Chr, with the proposed methodology it was possible to reach a more specific level of analysis that made it possible to identify processes and genes that may have a higher level of expression depending on the type of rejection. This implies that although both the innate and adaptive immune responses, activated after the allorecognition process, are essential to define the outcome of the graft, there are differences at the molecular level that may be modulating one rejection or the other, and in more favorable cases, processes long-term survival.

In general, these findings suggest that urine is an ideal sample for the identification of differentially expressed genes between transplanted individuals. An important point to highlight is that these genes are associated with the canonical immunological mechanisms involved in graft rejection and acceptance, such as antigenic presentation or the inflammatory response, and the activation of

regulatory T cells and other mechanisms associated with tolerance such as signaling by *FGL1*, respectively. As previously mentioned, genes such as *CST7*, *CCR7* and *CCL22* could be important for the identification of acute rejection from other types of outcomes, through their detection in urine samples. Likewise, genes such as *IL36A*, *PD-L1* and *CEACAM3* could be of great relevance in the molecular identification of chronic rejection, while molecules such as FGL1 could be very useful for the identification of processes associated with tolerance and graft acceptance. However, it is worth noting that these findings must be validated with a larger number of individuals and using orthologous techniques.

## 5.5 References

1. Sawinski D, Poggio ED. Introduction to kidney transplantation: Long-term management challenges. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(8):1262–3.
2. Thongprayoon C, Hansrivijit P, Leeaphorn N, Acharya P, Torres-Ortiz A, Kaewput W, et al. Recent advances and clinical outcomes of kidney transplantation. *J Clin Med*. 2020;9(4).
3. Pontrelli P, Grandaliano G, Van Kooten C. Editorial: Kidney Transplantation and Innate Immunity. *Front Immunol*. 2020;11(October):1–4.
4. Etxebarria A, Díez-Martín E, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. Role of the Immune System in Renal Transplantation, Types of Response, Technical Approaches and Current Challenges. *Immuno*. 2022;2(4):548–70.
5. Kreimann K, Jang MS, Rong S, Greite R, von Vietinghoff S, Schmitt R, et al. Ischemia Reperfusion Injury Triggers CXCL13 Release and B-Cell Recruitment After Allogenic Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11(August):1–10.
6. Massart A, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D. Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(2):138–57.
7. Wekerle T. Immune tolerance in transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(2):133–4.
8. Ravindranath MH, El Hilali F, Filippone EJ. The Impact of Inflammation on the Immune Responses to Transplantation: Tolerance or Rejection? *Front Immunol*. 2021;12(November):1–22.
9. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast

universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.

10. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1):139–40.
11. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G, et al. BioMart - Biological queries made easy. *BMC Genomics*. 2009;10:1–12.
12. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012;16(5):284–7.
13. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
14. Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol*. 2017;18(1):1–14.
15. Lai X, Zheng X, Mathew JM, Gallon L, Leventhal JR, Zhang ZJ. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol*. 2021;12(May):1–13.
16. Podestà MA, Sykes M. Chimerism-Based Tolerance to Kidney Allografts in Humans: Novel Insights and Future Perspectives. *Front Immunol*. 2022;12(January):1–10.
17. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. 2016.
18. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauinat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. 2022;101(4):692–710.
19. Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15(3):430–8.
20. Roufousse C, Simmonds N, Clahsen-Van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018;102(11):1795–814.
21. Ergün P, Meral M, Kübra AB, Serap Y. Predictors of Graft Outcome in Renal Transplant Recipients with Antibody-Mediated Rejection. *Int J Transplant Res Med*. 2021;7(1):1–6.
22. Bastian D, Wu Y, Betts BC, Yu XZ. The IL-12 cytokine and receptor family in graft-vs.-host disease. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1–13.

23. Wang H, DeVries ME, Deng S, Khandaker MH, Pickering JG, Chow LH, et al. The axis of interleukin 12 and gamma interferon regulates acute vascular xenogeneic rejection. *Nat Med.* 2000;6(5):549–55.
24. Schreiber M, Weigelt M, Karasinsky A, Anastassiadis K, Schallenberg S, Petzold C, et al. Inducible IL-7 hyperexpression influences lymphocyte homeostasis and function and increases allograft rejection. *Front Immunol.* 2019;10(APR):1–11.
25. Kildey K, Francis RS, Hultin S, Harfield M, Giuliani K, Law BMP, et al. Specialized roles of human natural killer cell subsets in kidney transplant rejection. *Front Immunol.* 2019;10(AUG):1–10.
26. Diering, Maxson & Mitchell, Freeman. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139–48.
27. Pontrelli P, Rascio F, Castellano G, Grandaliano G, Gesualdo L, Stallone G. The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2020;11(July):1–10.
28. Gan X, Gu J, Ju Z, Lu L. Diverse Roles of Immune Cells in Transplant Rejection and Immune Tolerance. *Engineering* [Internet]. 2022;10:44–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.029>
29. Martinez-Espinosa I, Serrato JA, Ortiz-Quintero B. Role of il-10-producing natural killer cells in the regulatory mechanisms of inflammation during systemic infection. *Biomolecules.* 2022;12(1).
30. American J Transplantation - 2007 - Jiang - Mechanism of NKT Cell-Mediated Transplant Tolerance.pdf.
31. Ergin G, Değer SM, Köprü B, Derici Ü, Arinsoy T. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute allograft rejection in kidney transplantation: A retrospective study. *Turkish J Med Sci.* 2019;49(2):525–30.
32. Sawyer AJ, Garand M, Chaussabel D, Feng CG. Transcriptomic Profiling Identifies Neutrophil-Specific Upregulation of Cystatin F as a Marker of Acute Inflammation in Humans. *Front Immunol.* 2021;12(April):1–10.
33. Halloran PF, Venner JM, Madill-Thomsen KS, Einecke G, Parkes MD, Hidalgo LG, et al. Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *American Journal of*

Transplantation. 2018;

34. Van Loon E, Lamarthée B, de Loor H, Van Craenenbroeck AH, Brouard S, Danger R, et al. Biological pathways and comparison with biopsy signals and cellular origin of peripheral blood transcriptomic profiles during kidney allograft pathology. *Kidney Int.* 2022;102(1):183–95.
35. Yan Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M, et al. CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(October):1–13.
36. Queen D, Ediriweera C, Liu L. Function and Regulation of IL-36 Signaling in Inflammatory Diseases and Cancer Development. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(December):1–13.
37. Elias M, Zhao S, Le HT, Wang J, Neurath MF, Neufert C, et al. IL-36 in chronic inflammation and fibrosis - bridging the gap? *J Clin Invest.* 2021;131(2).
38. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2020;10(3):727–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
39. 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* [Internet]. 2014 Nov [cited 2017 Aug 10];14(11):2565–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25219326>
40. Rudensky AY. T-regs and foxp3. *Bone* [Internet]. 2011;241(1):260–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
41. Hu M, Rogers NM, Li J, Zhang GY, Wang YM, Shaw K, et al. Antigen Specific Regulatory T Cells in Kidney Transplantation and Other Tolerance Settings. *Front Immunol.* 2021;12(August):1–11.
42. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J, et al. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell* [Internet]. 2019;176(1–2):334–347.e12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.010>
43. Qian W, Zhao M, Wang R, Li H. Fibrinogen-like protein 1 (FGL1): the next immune checkpoint target. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2021;14(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01161-8>

44. Advanced Science - 2021 - Tsai - Engineered Small Extracellular Vesicles as a FGL1 PD-L1 Dual-Targeting Delivery System for.pdf.
45. Bagi Z, Cunnane SC, Pylayeva-Gupta Y. 基因的改变NIH Public Access. Am J Clin Nutr. 2009;297(3):483.
46. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Eur J Pharmacol [Internet]. 2020;877(November 2019):173090. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
47. Elieh Ali Komi D, Ribatti D. Mast cell-mediated mechanistic pathways in organ transplantation. Eur J Pharmacol [Internet]. 2019;857(March):172458. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172458>.
48. Zhao Y, Qu Y, Hao C, Yao W. PD-1/PD-L1 axis in organ fibrosis. Front Immunol. 2023 May 19;14:1145682. doi: 10.3389/fimmu.2023.1145682. PMID: 37275876; PMCID: PMC10235450.

<b>Biological Process (Gene Ontology)</b>			
<b>GO-term</b>	<b>Description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<i>G0:0051707</i>	Response to other organism	10 of 1256	1,65E-07
<i>G0:0006955</i>	Immune response	10 of 1588	4,19E-07
<i>G0:0002376</i>	Immune system process	11 of 2481	4,19E-07
<i>G0:0006952</i>	Defense response	9 of 1296	2,26E-06
<i>G0:0006954</i>	Inflammatory response	7 of 515	4,45E-06
<i>G0:0006935</i>	Chemotaxis	7 of 545	5,83E-06
<i>G0:0050900</i>	Leukocyte migration	6 of 316	8,72E-06
<i>G0:0034097</i>	Response to cytokine	8 of 1101	1,45E-05
<i>G0:0019221</i>	Cytokine-mediated signaling pathway	7 of 678	1,67E-05
<i>G0:0070374</i>	Positive regulation of erk1 and erk2 cascade	5 of 209	5,59E-05
<i>G0:0072676</i>	Lymphocyte migration	4 of 74	5,98E-05
<b>KEGG Pathways</b>			
<b>pathway</b>	<b>Description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<i>hsa04061</i>	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	5 of 96	5,01E-07
<i>hsa04060</i>	Cytokine-cytokine receptor interaction	6 of 282	7,02E-07
<i>hsa04062</i>	Chemokine signaling pathway	5 of 186	4,14E-06
<i>hsa05323</i>	Rheumatoid arthritis	3 of 85	0,0012
<i>hsa04625</i>	C-type lectin receptor signaling pathway	3 of 102	0,0016
<i>hsa05152</i>	Tuberculosis	3 of 168	0,0057
<i>hsa05321</i>	Inflammatory bowel disease	2 of 60	0,0256
<i>hsa05120</i>	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	2 of 67	0,0277
<i>hsa04640</i>	Hematopoietic cell lineage	2 of 91	0,0446
<i>hsa04657</i>	IL-17 signaling pathway	2 of 92	0,0446
<b>Reactome Pathways</b>			
<b>Pathway</b>	<b>Description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<i>hsa6783783</i>	Interleukin-10 signaling	4 of 45	2,45E-05

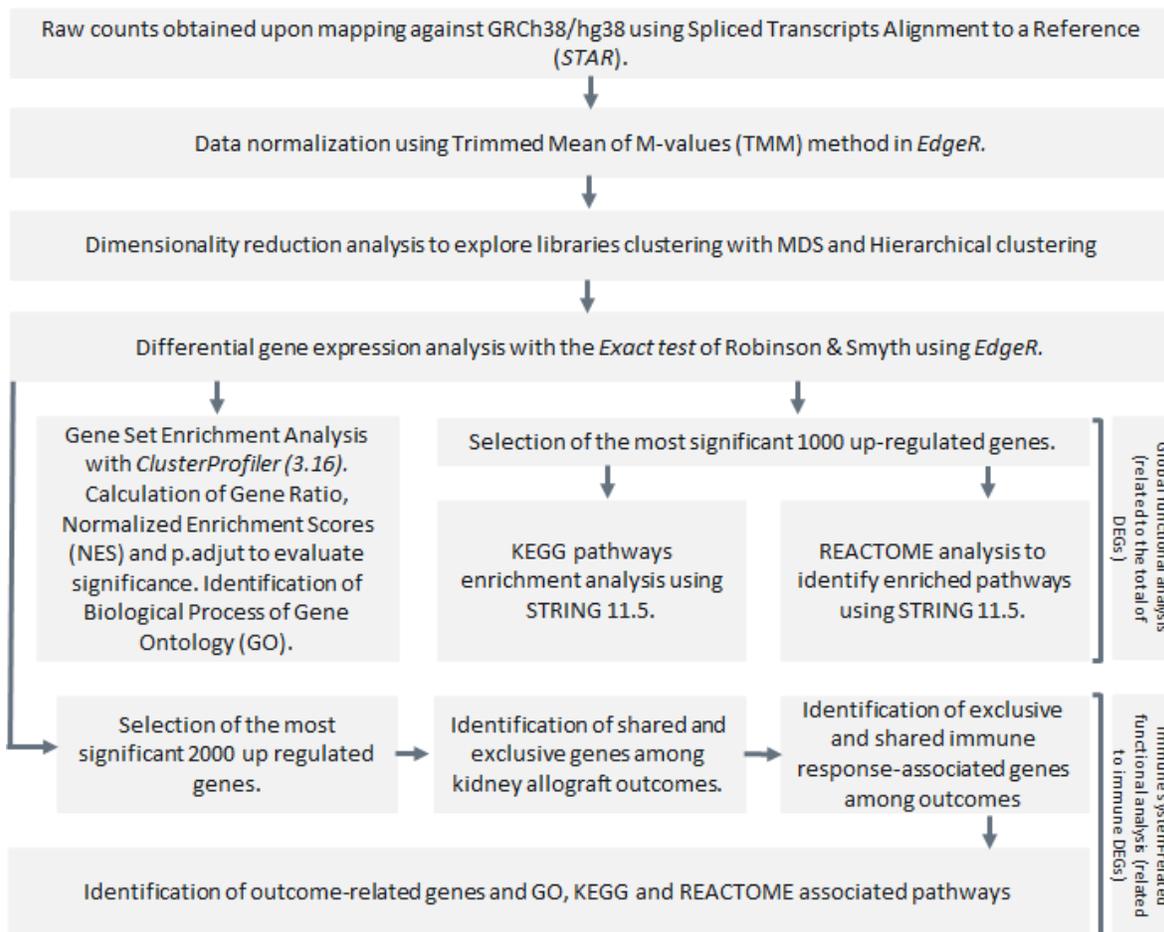
<i>hsa380108</i>	Chemokine receptors bind chemokines	4 of 57	3,01E-05
<i>hsa449147</i>	Signaling by Interleukins	6 of 440	3,35E-05
<i>hsa168256</i>	Immune System	9 of 1956	3,35E-05
<i>hsa6785807</i>	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	3 of 107	0,0075
<i>hsa418594</i>	G alpha (i) signalling events	4 of 396	0,0122

**Table 1.** GO Biological processes and functional categories of KEGG and REACTOME associated with the 11 immune DEGs up regulated in AcR/Sta. The analyzes were performed in STRING. Counts in network=number of genes from the set of immune DEGs annotated in each biological process or functional category. False Discovery rate=significance level of each process.

<b>Biological Process (Gene Ontology)</b>			
<b>GO-term</b>	<b>description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<b>GO:0002376</b>	Immune system process	22 of 2481	5,54E-14
<b>GO:0006955</b>	Immune response	18 of 1588	1,37E-11
<b>GO:0007166</b>	Cell surface receptor signaling pathway	18 of 2325	6,67E-09
<b>GO:0050776</b>	Regulation of immune response	13 of 896	2,12E-08
<b>GO:0010033</b>	Response to organic substance	19 of 3011	2,12E-08
<b>GO:0002684</b>	Positive regulation of immune system process	13 of 949	2,88E-08
<b>GO:0002682</b>	Regulation of immune system process	15 of 1514	2,88E-08
<b>GO:0051249</b>	Regulation of lymphocyte activation	10 of 445	9,75E-08
<b>GO:0048583</b>	Regulation of response to stimulus	20 of 4114	1,84E-07
<b>GO:0002822</b>	Regulation of adaptive immune response based on somatic	7 of 150	6,69E-07
<b>GO:0050778</b>	Positive regulation of immune response	10 of 607	1,08E-06
<b>GO:0034097</b>	Response to cytokine	12 of 1101	1,31E-06
<b>GO:0050863</b>	Regulation of t cell activation	8 of 329	3,28E-06
<b>KEGG Pathways</b>			
<b>pathway</b>	<b>Description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<b>hsa04064</b>	NF-kappa B signaling pathway	3 of 101	0,0263
<b>hsa04062</b>	Chemokine signaling pathway	4 of 186	0,0263
<b>hsa05167</b>	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	4 of 187	0,0263
<b>hsa05169</b>	Epstein-Barr virus infection	4 of 193	0,0263
<b>hsa05163</b>	Human cytomegalovirus infection	4 of 218	0,0263
<b>hsa04060</b>	Cytokine-cytokine receptor interaction	4 of 282	0,0263
<b>hsa05330</b>	Allograft rejection	2 of 34	0,0305
<b>hsa05332</b>	Graft-versus-host disease	2 of 36	0,0305
<b>hsa04940</b>	Type 1 diabetes mellitus	2 of 39	0,0305
<b>hsa04514</b>	Cell adhesion molecules	3 of 137	0,0305
<b>hsa05162</b>	Measles	3 of 138	0,0305
<b>hsa04217</b>	Necroptosis	3 of 149	0,0305
<b>hsa05161</b>	Hepatitis B	3 of 159	0,0305

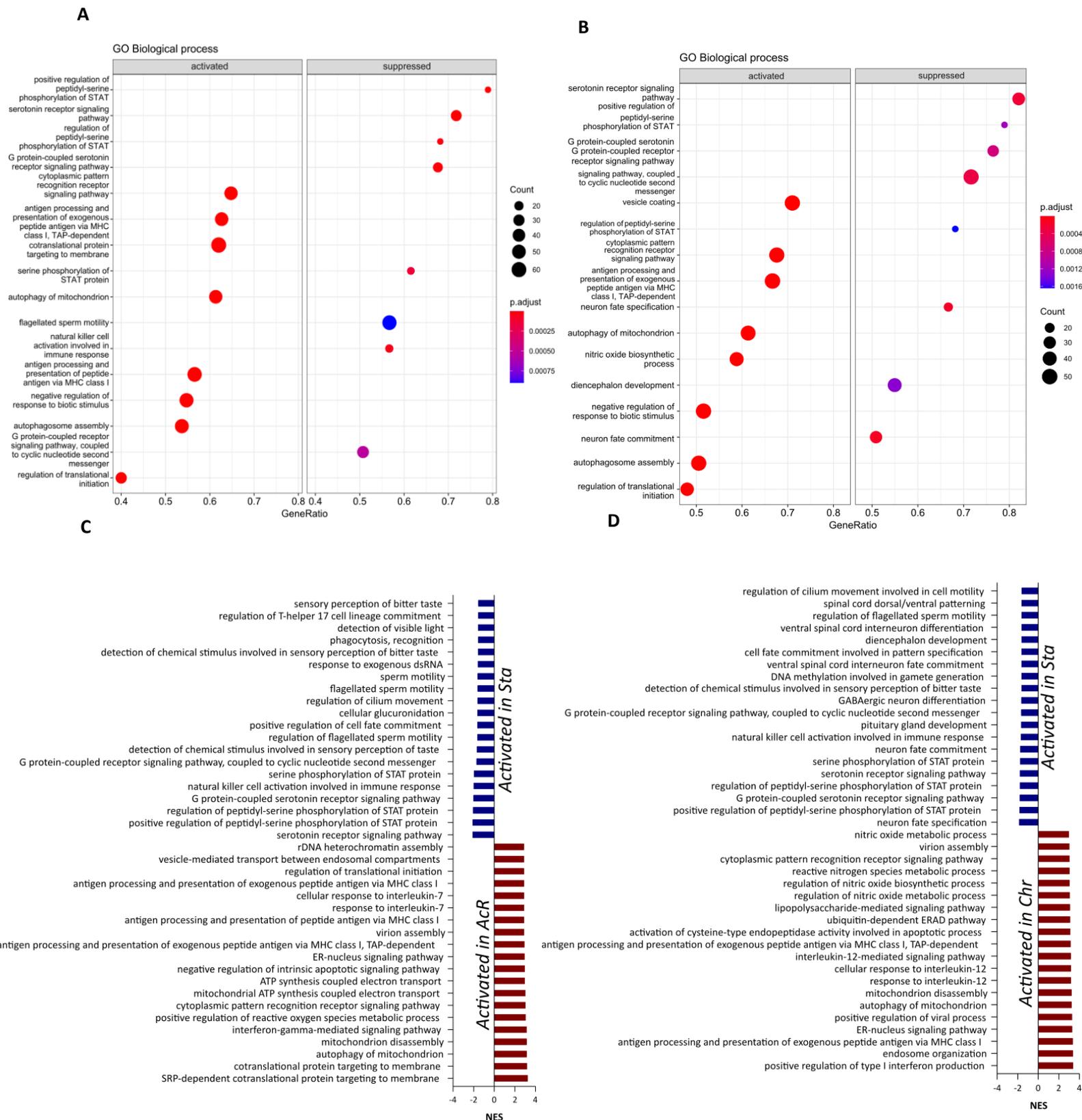
<b>hsa05165</b>	Human papillomavirus infection	4 of 325	0,0305
<b>hsa05320</b>	Autoimmune thyroid disease	2 of 48	0,0381
<b>Reactome Pathways</b>			
<b>pathway</b>	<b>description</b>	<b>count in network</b>	<b>false discovery rate</b>
<b>hsa-168249</b>	Innate Immune System	9 of 1025	0,0021
<b>hsa-109582</b>	Hemostasis	7 of 605	0,0044
<b>hsa-202733</b>	Cell surface interactions at the vascular wall	4 of 138	0,0125
<b>hsa-1280218</b>	Adaptive Immune System	7 of 743	0,0125

**Table 2.** GO Biological processes and functional categories of KEGG and REACTOME associated with the 11 immune DEGs up regulated in Chr/Sta. The analyzes were performed in STRING. Counts in network=number of genes from the set of immune DEGs annotated in each biological process or functional category. False Discovery rate=significance level of each process



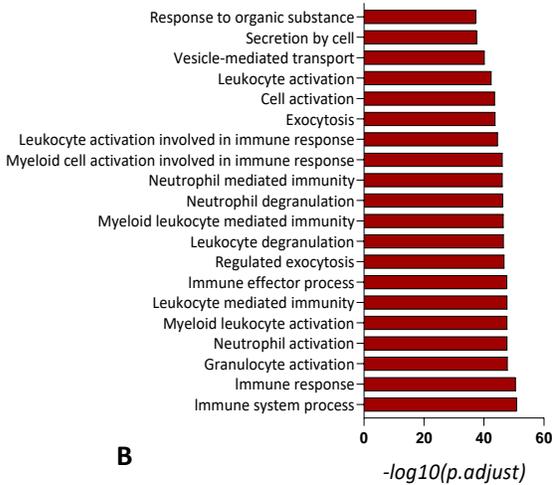
**Figure 1.** Stepwise for the analysis of differentially expressed genes, functional categories and biological processes in AcR, Chr, and Sta. The analysis was performed at three levels. Firstly, general DEGs were obtained from each of the previously described comparisons. Then, a functional analysis was performed based on the 1000 with the highest level of regulation in each of the outcomes. Third, a selection of the 2000 genes with the highest regulation was made and immune DEGs associated with AcR, Chr and Sta were selected. Sta-associated immune DEGs were obtained from the common genes obtained from the comparisons with AcR and Chr. Finally, a new functional analysis was carried out to determine the categories and interaction networks under which the immune DEGs are grouped.



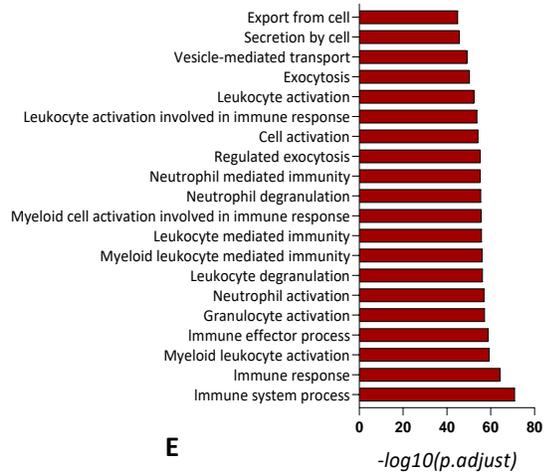


**Figure 3.** A, B. Dotplots with GO biological processes based on the level of activation or suppression, obtained from the GSEA. Suppressed biological processes were considered activated in Sta in both cases. C, D. Top 20 GO biological processes activated in AcR/Sta and Chr/Sta. Enrichment is shown based on the Normalized Enrichment Score (NES).

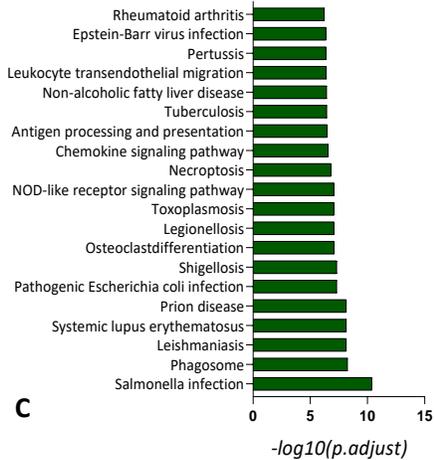
**A** Top 20 Biological Process (Gene Ontology) significantly enriched in urine of Acr/Sta



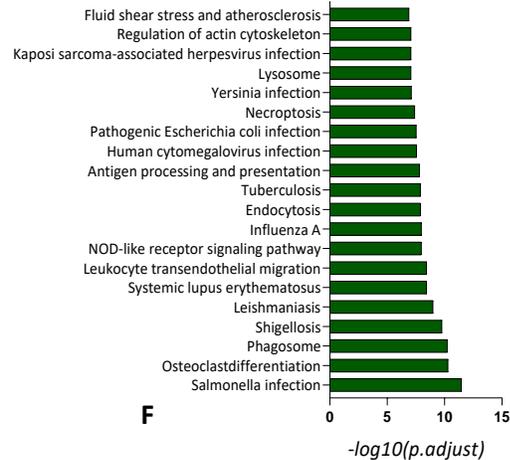
**D** Top 20 Biological Process (Gene Ontology) significantly enriched in urine of Chr/Sta



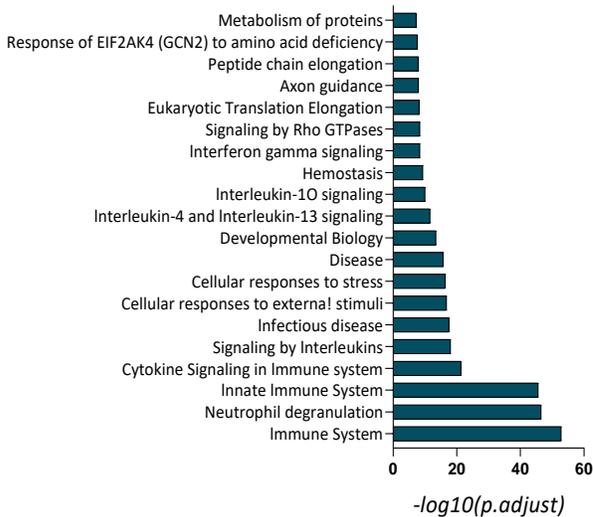
**B** Top 20 KEGG Pathways significantly enriched in urine of Acr/Sta



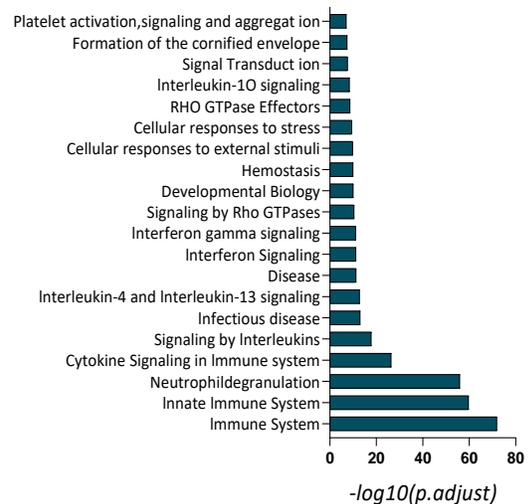
**E** Top 20 KEGG Pathways significantly enriched in urine of Chr/Sta



**C** Top 20 Reactome Pathways significantly enriched in urine of Acr/Sta

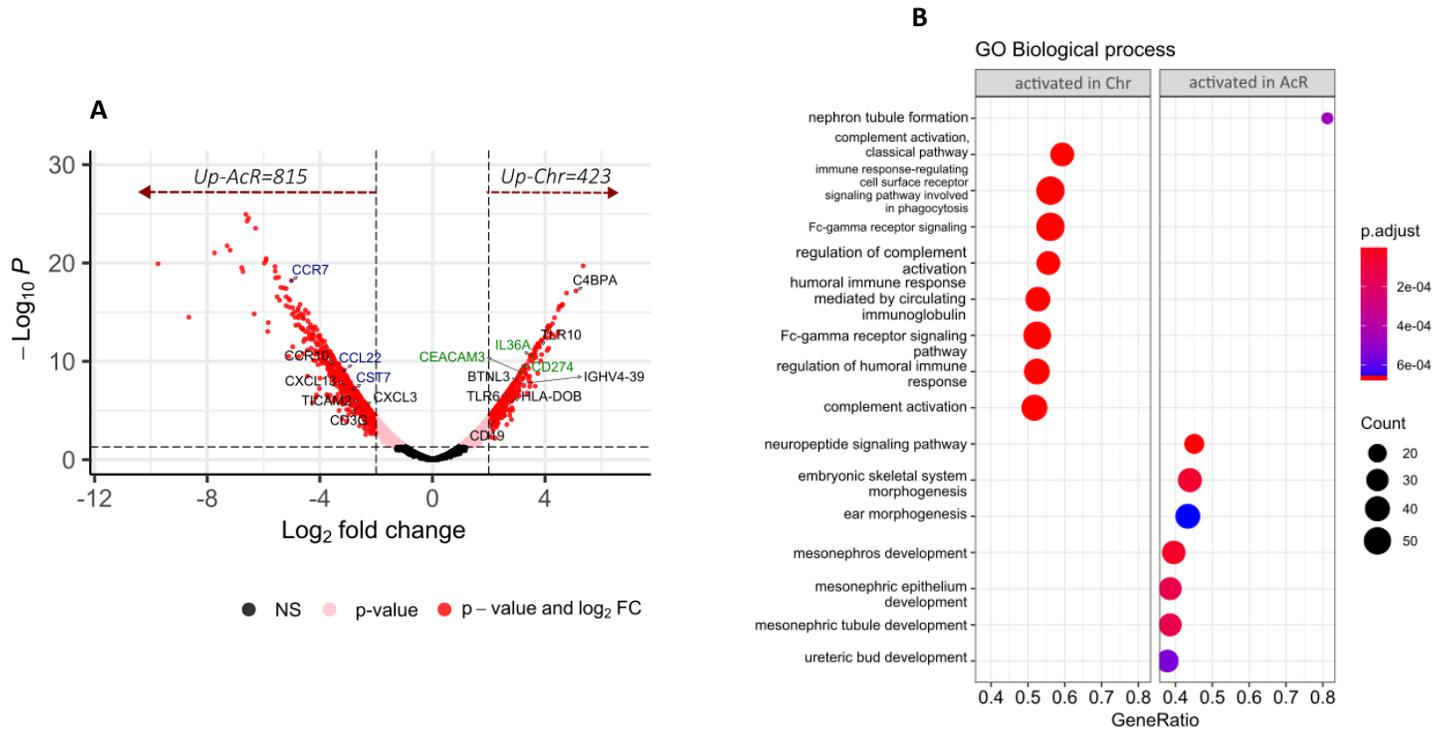


**F** Top 20 Reactome Pathways significantly enriched in urine of Chr/Sta

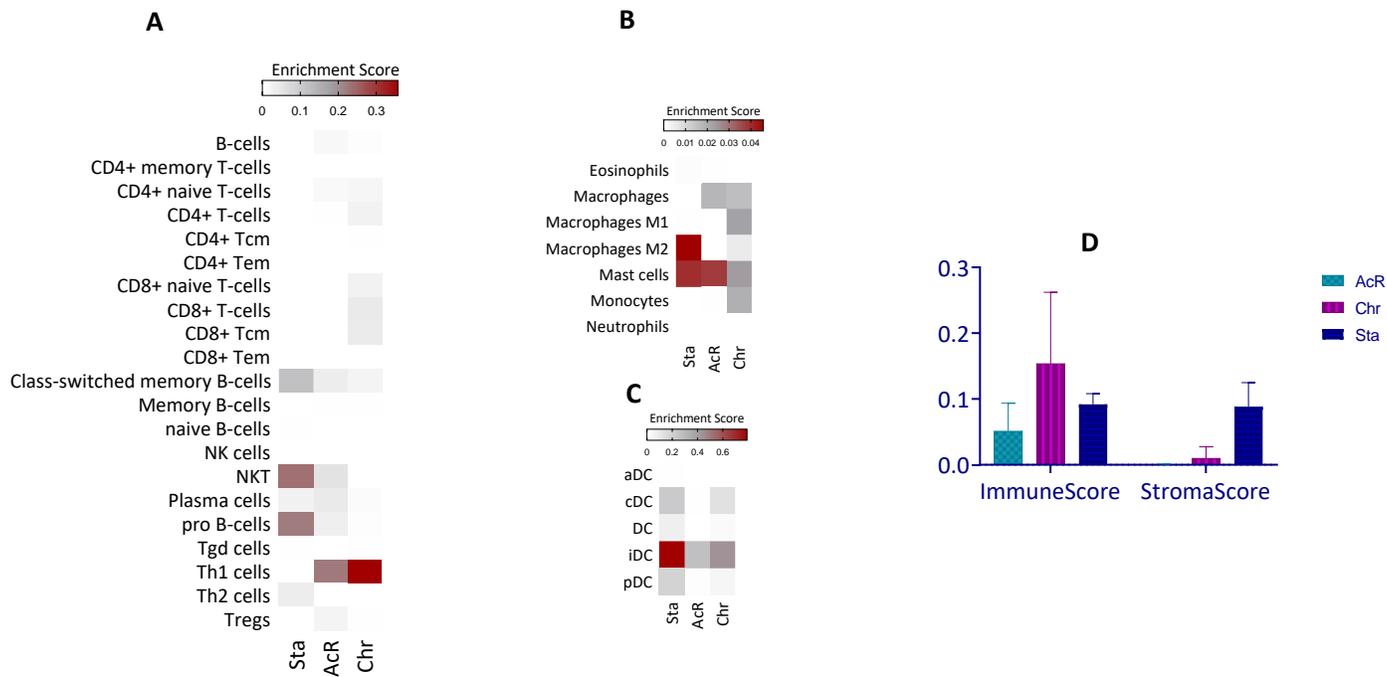


**Figure 4. A, C, E.** GO biological processes, and KEGG and REACTOME functional categories, respectively, associated with the top 1000 genes with the highest expression level in AcR from the comparison with Sta. The level of significance of each process or category is shown in terms of the  $-\log_{10}$  of the adjusted p-value obtained from the enrichment analysis performed in STRING. **B, D, F.** Biological processes from Gene Ontology, and functional categories from KEGG and REACTOME, respectively, associated with the top 1000 genes with the highest expression level in Chr from the comparison with Sta. The level of significance of each process or category is displayed in terms of the  $-\log_{10}$  of the adjusted p-value obtained from the enrichment analysis performed in STRING.





**Figure 6.** A. volcano plot showing some of the immune DEGs positively regulated in AcR and Chr in the comparison made only between these two outcomes (figure 1A). Within these genes there are also genes that were found in the analysis in relation to Sta, which suggests that it may be a specific gene signature of each type of rejection. B. Dotplot where the enrichment of GO biological processes obtained from the GSEA performed with the DEGs of the Chr/AcR comparison is observed.



**Figure 7. A.** AcR, Chr, and Sta urine-enriched lymphoid lineage cell fractions. **B.** AcR, Chr, and Sta urine-enriched myeloid lineage cell fractions. **C.** AcR urine-enriched dendritic cell subpopulations, Chr and Sta. **D.** Comparison between the scores of immune cells and stromal cells between AcR, Chr and Sta.

**CAPÍTULO VI: EXPLORACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE  
EXPRESADOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES EN SANGRE  
PERIFÉRICA Y ORINA DE PACIENTES TRASPLANTADOS DE  
RIÑÓN CON RECHAZO AGUDO, ANTES Y DESPUÉS DE LA  
TERAPIA INMUNOSUPRESORA ANTI-RECHAZO.**

## **6 CAPÍTULO VI: EXPLORACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES EN SANGRE PERIFÉRICA Y ORINA DE PACIENTES TRASPLANTADOS DE RIÑÓN CON RECHAZO AGUDO, ANTES Y DESPUÉS DE LA TERAPIA INMUNOSUPRESORA ANTI-RECHAZO.**

### **6.1 Introducción**

El rechazo del injerto renal involucra el desarrollo de un proceso inflamatorio que culmina en la instauración de una respuesta adaptativa que tiene efectos directos sobre el injerto y que posteriormente genera cambios histopatológicos específicos (1). El rechazo agudo del injerto puede presentarse en cualquier momento después del trasplante, normalmente dentro de los primeros meses. Su clasificación se basa principalmente en la identificación de los mecanismos inmunes implicados los cuales pueden ser mediados por células T, para originar un rechazo agudo mediado por células T (TCMR), o mediado por anticuerpos en cuyo caso se presentaría un rechazo agudo mediado por anticuerpos (ABMR). En el TCMR, hay una significativa infiltración intersticial de células T y macrófagos y una alta producción de citoquinas proinflamatorias (2). El ABMR, por su parte, se caracteriza por la infiltración de neutrófilos en los capilares peritubulares y por la formación de anticuerpos anti-HLA *de novo*, que producen inflamación de la microvasculatura renal, microangiopatía trombótica y lesión tubular aguda (3).

La identificación histopatológica acertada y oportuna de estos mecanismos es fundamental, ya que a partir de este diagnóstico se determina la terapia anti rechazo para cada paciente (4). En función de los hallazgos histopatológicos y de la clínica del paciente, algunos de los protocolos de terapias para revertir el rechazo consisten en glucocorticoides como prednisona y globulina antitimocitos (rATG) cuando los hallazgos sugieren rechazo mediado por células T (4–6); y fármacos como Rituximab (depleción de células B), Bortezomib, (depleción de células plasmáticas por inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma) y Eculizumab (inhibición del sistema del complemento), cuando los hallazgos sugieren que el rechazo es mediado por anticuerpos (4,7–9). Aunque estas terapias están bien establecidas, la reversión del rechazo depende, entre múltiples factores, de la severidad y del diagnóstico histopatológico adecuado.

Para conocer el riesgo de rechazo del paciente antes del trasplante, así como para el diagnóstico de rechazo y seguimiento de la inmunosupresión, se ha considerado que los marcadores moleculares podrían ser una alternativa poco invasiva y de alta utilidad en los periodos pre y post trasplante (10). No obstante, aún no se ha establecido un perfil molecular asociado a los mecanismos efectores del

rechazo, que a su vez presente utilidad clínica. En función de explorar los cambios moleculares que ocurren en los pacientes con rechazo agudo antes y después de suministro de la terapia anti rechazo, se realizó una aproximación a la identificación de genes diferencialmente expresados y procesos biológicos en muestras de sangre periférica y de orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, antes y después del tratamiento.

Ya que en los análisis previos se identificó una alta similitud entre los niveles de expresión de genes inmunes en biopsia y orina, estos análisis se hicieron con el objetivo de identificar los cambios transcripcionales en orina asumiendo que estos tienen un comportamiento similar en el tejido renal. Esto, ya que las muestras de biopsia solo fueron tomadas en la condición pre tratamiento al momento del diagnóstico de rechazo. Asimismo, se realizó una exploración en sangre periférica, ya que como se discutió previamente, los cambios inmunológicos más relevantes fueron observados tanto en sangre como en orina.

Con la metodología implementada, se identificaron diferencias entre el antes y el después de la terapia anti rechazo en el grupo de pacientes con rechazo agudo incluidos en el proyecto. Las aproximaciones se realizaron implementando diferentes herramientas bioinformáticas con las que se identificaron tanto genes diferencialmente expresados, como procesos biológicos y vías de señalización que podrían estar implicadas en la respuesta a la terapia inmunosupresora.

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Pacientes y controles**

Los pacientes fueron captados en la Unidad de Nefrología del Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín. Para la exploración de genes diferencialmente expresados (DEGs) y procesos funcionales asociados a estos, se incluyeron pacientes trasplantados de riñón con diagnóstico histopatológico de rechazo agudo. Las muestras de sangre y orina fueron tomadas al momento de la biopsia (AcR) y tres semanas después del suministro del tratamiento anti-rechazo (AcRpt).

### **6.2.2 Muestras**

**Sangre periférica:** se colectaron 4 mL de sangre periférica en tubos con EDTA de todos los pacientes. Las muestras fueron transportadas de inmediato al laboratorio para su procesamiento. De cada paciente se procesó un volumen de sangre correspondiente a  $16 \times 10^6$  leucocitos (~1,5 mL). A este volumen se adicionó Buffer EL (Qiagen) en proporción 1:5, se agitó vigorosamente en vórtex durante 20 S y se centrifugó a 400 xg por 10 min a 4°C. Seguidamente, se descartó el sobrenadante,

se homogenizó el pellet en Buffer EL (1:2) y se centrifugó nuevamente a 400 xg por 10 min a 4°C. Al pellet se adicionó 1 mL de Tri Reagent (Sigma-Aldrich), 2µL de glicógeno y se agitó en vórtex hasta lisar completamente las células.

**Orina:** de cada paciente se colectaron 200µL de orina empleando tubos estériles, previamente tratados con solución inhibidora de nucleasas. Las muestras fueron puestas de inmediato en nitrógeno líquido para su transporte al laboratorio. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 x g por 30 min a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado (~200µL) a los cuales se adicionó 1 mL de Tri Reagent (Sigma-Aldrich), 2µL de glicógeno y se agitó en vórtex hasta lisar completamente las células.

A cada muestra tratada con Tri Reagent se agregaron 200 µL de cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente se agitó en vórtex durante 15 S y se centrifugó a 12000 xg por 15 min a 4°C. Seguidamente se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1,5 mL y se agregó un volumen de isopropanol absoluto previamente refrigerado y 100 µL de acetato de sodio. Las muestras fueron puestas a -20°C durante 30 min y se centrifugaron a 12000 xg por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 1 mL de etanol al 70%, 10000 xg por 10 min. El RNA fue resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas y puesto en ultracongelación.

Posterior a la elución, se cuantificó la concentración y pureza de ácidos nucleicos mediante Nanodrop 2000. A partir de 1 µL de muestra se determinaron las absorbancias a 260 nm, 230 nm y 280 nm. La integridad del RNA se determinó con el porcentaje de transcriptos con un tamaño igual o superior a 200 nt (%DV200).

### **6.2.3 Construcción de librerías y secuenciación**

Las librerías de cDNA se prepararon en MacroGen con el kit Sure Select XT Direct Human (Agilent) a partir de 200 ng de RNA total. Para esto, se siguieron las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se realizó en MacroGen en la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, MacroGen), paired end, 150 pares de bases. De los datos generados se calcularon el total de reads, %GC, y los valores de Phred Score (%Q30) para determinar la calidad de la secuenciación.

### **6.2.4 Análisis de datos**

Los datos crudos fueron mapeados frente al genoma humano de referencia hg38 mediante el software Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (11). Asimismo, se realizó la limpieza de los datos con esta herramienta. A partir del mapeo se obtuvieron las cuentas crudas, con las que se

construyó una tabla en la que se relacionan el número de cuentas para cada gen en cada una de las librerías secuenciadas. Esta tabla se utilizó como insumo para el análisis de expresión diferencial.

Los análisis fueron realizados en R (v4.1.2) mediante el paquete EdgeR (12) en RStudio. Inicialmente se realizó la anotación de los genes empleando BiomaRt (13). Con la anotación se obtuvieron los SYMBOLS de los genes, los biotipos génicos y la descripción de cada uno. Posteriormente se dio el formato requerido a la tabla de datos y se obtuvieron las cuentas por millón (CPM) a partir de las cuales se removieron los datos con cuentas inferiores a 0,5. Seguidamente se realizó una exploración inicial de los datos por agrupamiento jerárquico de los 200 genes con mayor variabilidad.

Los datos fueron normalizados utilizando la función calcNormFactors con el método trimmed mean of M-values (TMM) y se obtuvo la tabla de cuentas efectivas con las que se realizaron los análisis subsecuentes.

### **6.2.5 Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs)**

Para la determinación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) se aplicó el Exact Test de Robinson y Smyth, con un coeficiente de variación biológica de 0,4. Las comparaciones se realizaron por pares para identificar los cambios en la expresión génica y los cambios funcionales en los pacientes con rechazo agudo, antes y después del suministro del tratamiento inmunosupresor para revertir el rechazo. El análisis se realizó separadamente para sangre periférica y orina.

### **6.2.6 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)**

En análisis de enriquecimiento se realizó con ClusterProfiler (v3.16) (14) en RStudio, utilizando la función gseGO. El análisis se hizo a partir de los DEGs obtenidos de cada una de las comparaciones en sangre periférica y orina. Las ontologías seleccionadas fueron Biología celular (BP) y Función molecular (MF), con un cutoff de p.value de 0.05 y empleando el método de ajuste de Benjamini Hochberg. Posteriormente se exportaron los datos con información de la descripción de la categoría funcional, valores de score de enriquecimiento normalizado (NES) y valor p ajustado (p.adjust). Adicionalmente, para los análisis y generación de gráficas se tuvo en cuenta el Gene Ratio (el cual se calcula de la siguiente manera:  $\text{gene ratio} = \frac{\# \text{ genes related to GO term}}{\text{total number of sig genes}}$ ).

### **6.2.7 Análisis de STRING**

Tanto de sangre periférica como de orina, se seleccionaron manualmente los genes regulados positiva y negativamente. Posteriormente, cada set de genes se implementó como insumo para el análisis en STRING v11 (15). A partir de este análisis se identificaron diferentes categorías funcionales que

incluyeron procesos biológicos de Gene Ontology (GO) y categorías funcionales de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG), REACTOME y TISSUE. La selección de categorías con mayor enriquecimiento se hizo con base en el p ajustado (p.adjust). Adicionalmente, se obtuvieron las redes de interacción proteína-proteína (P-P) y se identificaron los genes asociados a las categorías funcionales con mayor nivel de significancia.

### **6.2.8 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**

Para la confirmación de vías canónicas asociadas a los DEGs en sangre y en orina, se realizó un análisis de Ingenuity empleando el software IPA (Qiagen). Para esto, se emplearon las tablas de genes regulados en cada una de las muestras como insumo para el software, y se seleccionaron los valores de logFC y FDR para determinar los niveles de expresión y significancia para el análisis. Asimismo, se seleccionó un logFC de 2 y -2 para los genes regulados positiva y negativamente, respectivamente; y un valor de FDR menor o igual a 0.05. Para la interpretación de los resultados, se tuvo en cuenta del z-score arrojado por el software para determinar el nivel de activación de cada vía canónica. Así, un z-score positiva muestra actividad, mientras que un valor negativo muestra inhibición.

## **6.3 Resultados**

### **6.3.1 Exploración de librerías y análisis de expresión diferencial**

Para identificar diferencias transcripcionales entre las librerías secuenciadas realizamos un análisis de agrupamiento jerárquico a partir de los datos normalizados. Para esto se realizó un agrupamiento no supervisado en función de los 200 genes con mayor variabilidad, en las librerías de sangre y orina, separadamente. En sangre periférica, se observó heterogeneidad entre las muestras secuenciadas. Las librerías se agruparon por individuos. Como se observa en la figura 2A, se observa que contiguo a la librería pretratamiento, se ubica su respectivo par en la condición post tratamiento. En orina, se observó un comportamiento similar. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 1, la muestra del paciente AcR02 no pudo ser secuenciada por baja cantidad de ácido nucleico disponible. Con base en esto, solo se contaba con la muestra post tratamiento del paciente. Al hacer la exploración por agrupamiento jerárquico, se observó que dicha muestra mostraba un comportamiento diferente respecto a los demás pacientes (figura 2B), por lo cual, al no tener la muestra pre tratamiento y para evitar el efecto de un outlier, se eliminó del análisis. En las demás muestras, se observó un comportamiento similar al observado en sangre periférica, en el cual cada muestra pre tratamiento se ubicó contigua a la muestra del mismo paciente en la condición post tratamiento (figura 2C).

A continuación, se aplicó el Exact Test de Robinson & Smyth en EdgeR para calcular el número de DEGs, y posteriormente, mediante BiomaRt se realizó la anotación para la identificación de los

biotipos génicos. Para asumir la regulación de cada uno de los genes, se tuvo en cuenta un  $fdr \leq 0.05$  y un valor de  $\text{LogFC} \geq 2$  para los genes up-regulated y  $\leq -2$  para los down-regulated.

El análisis se realizó según el tipo de muestra, es decir, se identificaron los genes regulados en el rechazo agudo después del tratamiento con relación a la condición pre tratamiento en sangre y en el rechazo agudo después del tratamiento con relación a la condición pre tratamiento en orina. En sangre periférica, se identificaron 112 genes regulados positivamente posterior al tratamiento, y 78 regulados negativamente. Como se mencionó en los capítulos previos, los genes regulados negativamente corresponden también a los regulados positivamente en la condición pretratamiento, en este caso, AcR (figura 3A). En orina, se identificaron 287 genes regulados positivamente en AcRpt y 554 regulados negativamente, o regulados positivamente en AcR (figura 3B).

### **6.3.2 Análisis funcional mediante GSEA**

En el GSEA no supervisado, se identificaron diferentes procesos biológicos de GO asociados a los genes regulados positivamente (activados) y a los genes regulados negativamente (suprimidos). Adicionalmente, también se analizaron categorías funcionales asociados a la función molecular de los genes regulados. Este análisis se realizó separadamente para sangre periférica y orina.

En sangre periférica de AcRpt, se identificó la activación de procesos biológicos como respuesta a interferón de tipo 1 y regulación negativa de la replicación viral, así como respuesta humoral antimicrobiana. Por su parte, dentro de los procesos suprimidos (o también asumidos como regulados positivamente en AcR) se encontraron revestimiento de vesículas por COPII, regulación positiva de oxidación de ácidos grasos y procesos apoptóticos (figura 4A).

Al revisar las funciones moleculares en sangre periférica, se observó la activación de 2'-5'-oligoadenilato sintetasa, unión al receptor de quimiocinas CXCR3, actividad DNA-helicasa y unión de tetrapirrol. El único proceso suprimido (o activado en AcR) fue actividad del receptor de la IL-1 (figura 4B).

Por otro lado, en orina se identificó la activación de procesos asociados a la traducción de proteínas y cornificación, y la supresión, o activación en AcR, de procesos como diferenciación de células T  $\alpha/\beta$  y regulación en la activación de producción de IL-1 (figura 4C). Dentro de las funciones moleculares activadas, se encontraron actividad de receptor inhibitor, actividad de receptor antagonista y constituyentes de matriz extracelular. Las funciones moleculares suprimidas incluyeron actividad de receptor de complemento, actividad de receptor de prostaglandinas y eicosanoides, actividad de receptor de quimiocinas y actividad de canales de potasio (figura 4D).

### **6.3.3 Análisis de categorías funcionales y redes de interacción proteína-proteína en STRING**

Para profundizar en el análisis funcional e identificar los DEGs asociados a los diferentes procesos biológicos, funciones moleculares y otras categorías funcionales, se tomaron los genes regulados positiva y negativamente en sangre periférica y en orina, obtenidos del análisis entre los pacientes con rechazo agudo antes y después del tratamiento y se analizaron mediante STRING. A partir de cada set de genes regulados, en sangre o en orina, se obtuvieron las redes de interacción y se identificaron las categorías funcionales con mayor nivel de significancia en función del valor *p* ajustado.

En sangre de AcRpt se analizaron 112 genes regulados positivamente. En la red obtenida del análisis se observan múltiples interacciones entre estos genes. Dentro de los procesos biológicos con mayor nivel de significancia se encontraron procesos de sistema inmune (nodos verdes), vía de señalización de interferón de tipo 1 (nodos azules) y 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (nodos rojos) (figura 5A). Dentro de estos genes, *OAS1*, *OAS2* y *OAS3* se ubicaron dentro de los tres procesos enriquecidos. Adicionalmente, se identificaron genes como *CXCL10* y *CXCL11*.

Los 78 genes regulados negativamente se analizaron a continuación en STRING. En este caso, solo se encontró enriquecida actividad del receptor de IL-1 (nodos rojos), con genes como *IL18R1*, *IL1R2* e *IL1RL1* (figura 5B).

En el análisis de los DEGs en orina mediante STRING, se implementaron inicialmente los 287 genes regulados positivamente en AcRpt. En este caso, también se observaron diferentes interacciones asociadas principalmente a actividad de receptor antagonista (nodos azules) y regulación negativa de fase de la apoptosis (nodos rojos) (figura 5C), lo cual se corresponde con las observaciones en el GSEA. A continuación, se analizaron los 554 genes regulados negativamente, los cuales estuvieron asociados a unión a receptores de ligandos de eicosanoides (nodos rosados), actividad de receptor de citoquinas (nodos amarillos), respuesta inflamatoria (nodos rojos), quimiotaxis (nodos azules) y diferenciación de células T $\alpha/\beta$  CD4 positivas (nodos verdes) (figura 5D). Nuevamente, estos hallazgos se corresponden con los observados en el GSEA.

### **6.3.4 Ingenuity Pathway Analysis**

Al revisar las vías canónicas de Ingenuity asociadas a los DEGs en sangre periférica, se observaron activadas (valores de z-score positivos, barras naranjas) vías como señalización por interferón,

señalización por trampas extracelulares de neutrófilos y rol protector de THOP1 en enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, aunque con un nivel de actividad más bajo, se observó la vía señalización por ribonucleótido reductasa. Dentro de las vías inhibidas, con un valor de z-score negativo, se observaron osteoartritis, rol de condrocitos en señalización en artritis reumatoide y tormenta de citoquinas inducida por (figura 6 A).

Por su parte, en orina, se observó la activación de señalización por CDX en cáncer gastrointestinal y rol de los osteoblastos en artritis reumatoide. Se observó la inhibición de vías como señalización por proteínas S100, formación del fagosoma, señalización por receptores acoplados a proteínas G, señalización por FAK y señalización mediada por cAMP (figura 6B).

#### **6.4 Discusión y análisis**

Aunque el mejoramiento en las terapias inmunosupresoras y el conocimiento a mayor profundidad de los mecanismos implicados en los diferentes desenlaces del injerto han permitido reducir las tasas de rechazo agudo, este continúa siendo una amenaza para la función del estable del injerto y requiere de un diagnóstico y un tratamiento adecuado para evitar la posterior pérdida del órgano (16) Para evitar las complicaciones y los riesgos asociados al rechazo agudo, se debe, en primera instancia, realizar un diagnóstico histopatológico adecuado para, en segunda instancia, determinar los mecanismos que lo median, ya sea una respuesta celular implicada en el rechazo agudo mediado por células T (TCMR), o una respuesta humoral implicada en el rechazo agudo mediado por anticuerpos (ABMR). Conocer los mecanismos es crucial para suministrar la terapia de reversión de rechazo más adecuada, como bolos de prednisolona y globulina anti-timocitos (rATG) para TCMR o procedimientos como la plasmaféresis y biológicos como el rituximab, para la remoción de anticuerpos y la depleción de células B, respectivamente (4).

Como se mencionó previamente, la identificación de biomarcadores – en muestras poco invasivas – asociados a los mecanismos efectores implicados en los desenlaces del injerto, es necesaria no solo para el diagnóstico molecular de rechazo, sino también para la predicción de posibles desenlaces previo al trasplante y para el seguimiento a los pacientes que permita, entre otros, monitorear la función del injerto, el riesgo de rechazo y la efectividad de los tratamientos.

En este capítulo del trabajo, se buscó identificar cambios en la expresión génica en muestras de sangre periférica y orina de pacientes trasplantados de riñón, entre el momento del diagnóstico de rechazo agudo y después del suministro de la terapia con la que se buscó revertir el rechazo. En los capítulos

anteriores se hizo énfasis en la relevancia de ambas muestras para su implementación en esta exploración, ya que en ambas se lograron identificar tanto genes como procesos biológicos asociados a los mecanismos efectores que median el rechazo. Con los análisis propuestos para esta parte del trabajo, se buscó identificar diferencias transcripcionales entre el antes y el después de la terapia inmunosupresora anti-rechazo.

En un primer momento se exploraron las librerías secuenciadas a partir de sangre y de orina. En ambos casos se observó, mediante el análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, que las muestras se agruparon en función del paciente, observándose una mayor cercanía entre una muestra y su contraparte posterior al tratamiento.

Partiendo de estos datos, se realizó el análisis de expresión diferencial entre las condiciones pre y post tratamiento, y se identificó inicialmente el número de genes diferencialmente expresados tanto en sangre como en orina. En este caso, se observaron resultados similares a los observados en los análisis previos, ya que en sangre el número de genes regulados fue menor en comparación al número de genes en orina, lo cual puede estar dado por las diferencias en la celularidad o por el nivel de actividad transcripcional en cada una de las muestras. Hasta el momento, solo se identificaron el número de DEGs en cada caso. Sin embargo, las moléculas se identificaron posterior al análisis funcional, ya que es este análisis el que permite realizar un mejor acercamiento a los mecanismos efectores implicados, los cuales son el foco principal de investigación.

El análisis funcional se abordó con tres herramientas de análisis diferentes, entre las que se encontró una alta concordancia, no solo por los resultados observados con cada una, sino también entre los hallazgos y los mecanismos inmunológicos canónicos que median el rechazo. En primer lugar, con el GSEA no supervisado se identificó que en sangre de los pacientes en la condición AcRpt, se activaron procesos biológicos como la señalización por la vía de los interferones de tipo 1. Aunque no se ha reportado el papel de los interferones tipo 1 en rechazo del injerto renal o en la terapia inmunosupresora de mantenimiento o de reversión del rechazo, esta vía se encontró conectada en el análisis proteína-proteína con la vía de la oligoadenilato sintetasa, representada por los genes *OAS1*, *OAS2* y *OAS3*. Aunque el papel, tanto del interferón de tipo 1 como de las enzimas *OAS* está enfocado principalmente al bloqueo de la replicación viral, Wook-Bin y colaboradores reportaron que *OAS1* y *OAS3* están asociados a la regulación negativa de quimiocinas y algunos regulados por interferón en macrófagos humanos. Dentro de las citoquinas que se regularon negativamente en macrófagos en un modelo *in vitro* se encontraron *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL8* y *CXCL9* (17).

En segundo lugar, y en relación con los procesos suprimidos en AcRpt o activados en AcR, se observó el enriquecimiento del proceso vesículas revestidas con COPII. Este hace referencia a un complejo de proteínas de revestimiento necesarias para la formación de vesículas que median el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico (18). Kim y colaboradores, publicaron un estudio en el que demostraron que el complejo COPII es necesario para la activación de células T. Para esto, emplearon un modelo murino deficiente de SEC23B, un componente fundamental del complejo COPII. En este modelo, los autores identificaron un defecto en la proliferación y función de células T (19). Aunque en los hallazgos no se observó específicamente la supresión de procesos asociados a la actividad de células T en sangre periférica, sí se identificó la supresión de la actividad del receptor de IL-1, la cual es producida principalmente por macrófagos y que tiene acción directa sobre las células T, modulando su perfil de activación principalmente proinflamatorio (20).

Al pasar al análisis en orina, en AcRpt, se observó la activación principalmente de procesos asociados al metabolismo celular, específicamente, a la traducción de proteínas. Asimismo, en la función molecular, se observó actividad de receptor inhibitor. Los hallazgos más llamativos estuvieron en los procesos, funciones moleculares y otras categorías funcionales suprimidas. Estos incluyeron diferenciación de células T, producción de IL-1, actividad del complemento, actividad de receptores de prostaglandinas, respuesta inflamatoria y actividad de receptor de citoquinas. Dentro de los genes asociados a los procesos suprimidos, cabe resaltar a *NLRP6*, *IL-6*, *CR2* y *TNF*.

*NLRP6* se encontró asociado a respuesta inflamatoria, y hace parte de la familia de receptores tipo NOD, encargados de censar patrones moleculares asociados a patógenos o a daño y bajo ciertas condiciones se asocia a proteínas ASC (de apoptosis-associated specific-like protein) y a las caspasas 1 u 11 para formar el inflamasoma, el cual está implicado en la producción de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (21,22). Esto podría tener una asociación con la regulación negativa en la actividad de IL-1 observada en orina de AcRpt, y con una disminución en la expresión de *IL1RL1* asociado a la categoría actividad de receptor de citoquinas, que también se observó disminuida en esta condición.

La disminución de IL-6 se encontró asociada a las categorías funcionales de STRING respuesta inflamatoria, quimiotaxis y diferenciación de células TCD4+. Esta citoquina tiene un rol clave en la inflamación posterior al trasplante, ya que está asociada a la activación de células Th17 y en la inhibición de células T reguladoras, procesos clave para el mantenimiento de la inflamación implicada en el rechazo y en la disminución de una respuesta reguladora y tolerogénica (23). Asimismo, está implicada en la inducción de integrinas adhesión celular, quimiotaxis y trans migración celular (24), y en enfermedades infecciosas como el COVID-19, en las que existe un elevado ambiente proinflamatorio mediado por tormenta de citoquinas, se ha observado una asociación directa entre los

niveles de IL-6 y la proteína quemoatrayente de macrófagos y monocitos (MCP-1), lo que da cuenta de su rol en la quimiotaxis y en la exacerbación de procesos inflamatorios (25).

Con el análisis en IPA, se observaron hallazgos que desde las vías canónicas se asocian a lo observado en los análisis funcionales previos. En sangre periférica se encontraron procesos suprimidos como señalización por tormenta de citoquinas con genes como *CD163*, *COL17A1*, *COL9A2*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IL18R1*, *IL1R2*, *IL1RL* y *SLC2A5*, en los que nuevamente se observan moléculas asociadas a la quimiotaxis y la señalización por IL-1. Adicionalmente, se observó la activación de señalización por trampas extracelulares de neutrófilos, lo cual puede ser un indicador, de que, si bien los pacientes se encuentran bajo una terapia de inmunosupresión, aún se mantienen activos mecanismos implicados en la inflamación. Esta vía estuvo enriquecida por genes como *BPI*, *CAMP*, *COL17A1*, *COL9A2*, *CTSG*, *DEFA1*, *DEFA4*, *ELANE*, *LTF*, *MPO* y *PRTN3*.

En orina se observó un mayor número de procesos suprimidos. Uno de los más relevantes fue la señalización por FAK, la cual es requerida para la activación de células T y para la regulación de la señalización de TNF- $\alpha$ . A su vez, la señalización por esta citoquina media la producción de IL-6 (26), la cual fue discutida previamente. Esto entonces muestra que la respuesta frente al injerto requiere de una constante retroalimentación positiva entre el sistema innato y el adaptativo. En la señalización por FAK se observó la regulación negativa de genes como *ACKR4*, *ADORA2A*, *ADRA2C*, *ADRB3*, *AVPR2*, *BRS3*, *CAPN6*, *CCR10*, *CCR7*, *CELSR2* y *CHRM4*.

En general, en las observaciones hechas a partir de los análisis en sangre periférica y en orina de pacientes con rechazo agudo antes y después del tratamiento antirrechazo, se observó un importante nivel de supresión de los principales mecanismos inmunológicos innatos y adaptativos involucrados en la respuesta frente al injerto, como mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria como la quimiotaxis y la activación de células TCD4. Sin embargo, para poder establecer una relación más directa entre estos hallazgos y la terapia suministrada a los pacientes, es necesario realizar análisis de correlación entre las dosis de medicamentos y los hallazgos transcripcionales y funcionales a partir de un mayor número de pacientes y de un grupo de estudio menos heterogéneo.

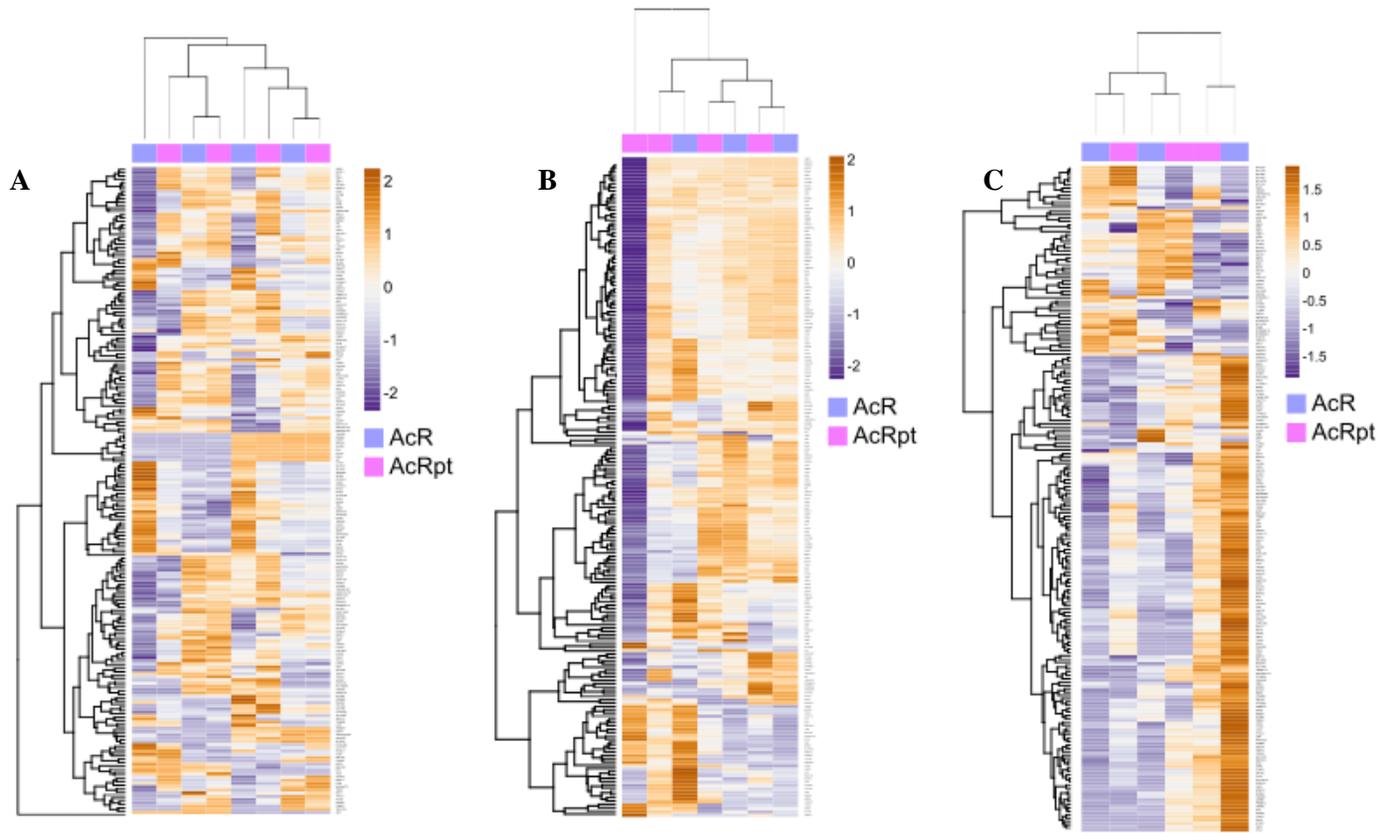
## 6.5 Referencias

1. Joosten SA, Sijpkens YWJ, Van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005;68(1):1–13.
2. Leblanc J, Subrt P, Paré M, Hartell D, Sénécal L, Blydt-Hansen T, et al. Practice Patterns in the Treatment and Monitoring of Acute T Cell–Mediated Kidney Graft Rejection in Canada. *Can J Kidney Heal Dis.* 2018;5.
3. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: Current status and novel approaches. *Am J Transplant.* 2014;14(2):255–71.
4. Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(3):430–8.
5. Ali H, Soliman KM, Shaheen I, Kim JJ, Kossi M El, Sharma A, et al. Rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) versus IL-2 receptor antagonist induction therapies in tacrolimus-based immunosuppression era: a meta-analysis. *Int Urol Nephrol [Internet].* 2020;52(4):791–802. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02418-w>
6. Rekers N V., de Fijter JW, Claas Fhj, Eikmans M. Mechanisms and risk assessment of steroid resistance in acute kidney transplant rejection. *Transpl Immunol [Internet].* 2016;38:3–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2016.07.005>
7. Chauhan K, Mehta AA. Rituximab in kidney disease and transplant. *Anim Model Exp Med.* 2019;2(2):76–82.
8. Lee J, Kim BS, Park Y, Lee JG, Lim BJ, Jeong HJ, et al. 26446648. 2015;56(6):1638–42.
9. Shantanam S, MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139–48.
10. Swanson KJ, Aziz F, Garg N, Mohamed M, Mandelbrot D, Djamali A, et al. Role of novel biomarkers in kidney transplantation. *World J Transplant.* 2020;10(9):230–55.
11. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21.
12. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential

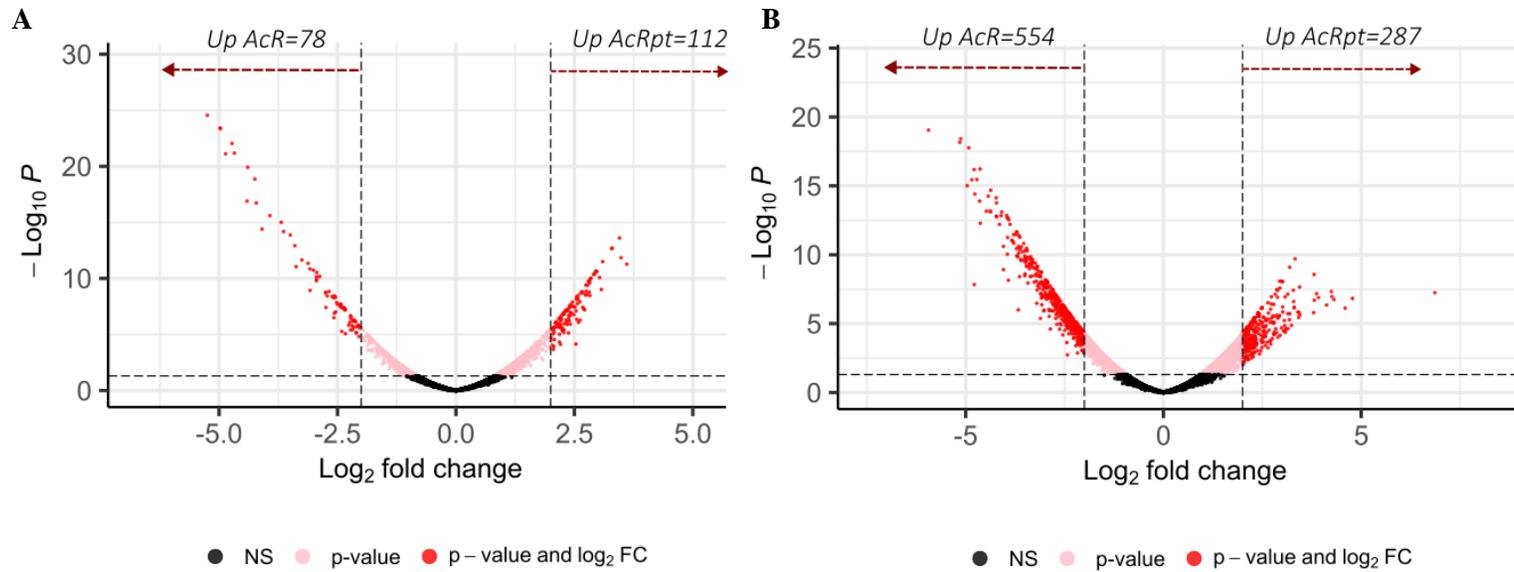
- expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1):139–40.
13. Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D, Thorisson G, et al. BioMart - Biological queries made easy. *BMC Genomics*. 2009;10:1–12.
  14. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012;16(5):284–7.
  15. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607–13.
  16. Jin PH, Sarwal RD, Sarwal MM. Urinary Biomarkers for Kidney Allograft Injury. *Transplantation*. 2022;106(7):1330–8.
  17. Lee W Bin, Choi WY, Lee DH, Shim H, Kim-Ha J, Kim YJ. OAS1 and OAS3 negatively regulate the expression of chemokines and interferon-responsive genes in human macrophages. *BMB Rep*. 2019;52(2):133–8.
  18. Sato K, Nakano A. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett*. 2007;581(11):2076–82.
  19. Kim S, Khoriaty R, Li L, McClune M, Kalfa TA, Wu J, et al. ER-to-Golgi transport and SEC23-dependent COPII vesicles regulate T cell alloimmunity. *J Clin Invest*. 2021;131(2):1–13.
  20. Van Den Eeckhout B, Tavernier J, Gerlo S. Interleukin-1 as Innate Mediator of T Cell Immunity. *Front Immunol*. 2020;11(January):621931.
  21. Angosto-Bazarra D, Molina-López C, Pelegrín P. Physiological and pathophysiological functions of NLRP6: pro- and anti-inflammatory roles. *Commun Biol*. 2022;5(1):1–8.
  22. Zheng D, Kern L, Elinav E. The NLRP6 inflammasome. *Immunology*. 2021;162(3):281–9.
  23. Jordan SC, Choi J, Kim I, Wu G, Toyoda M, Shin B, et al. Interleukin-6, A cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection: Therapeutic implications of IL-6 receptor blockade. *Transplantation*. 2017;101(1):32–44.
  24. Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization,

chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1521–9.

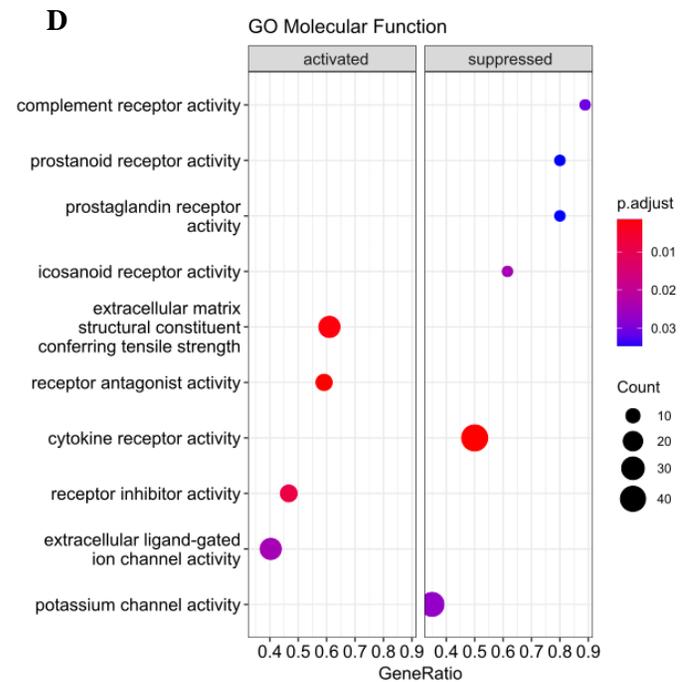
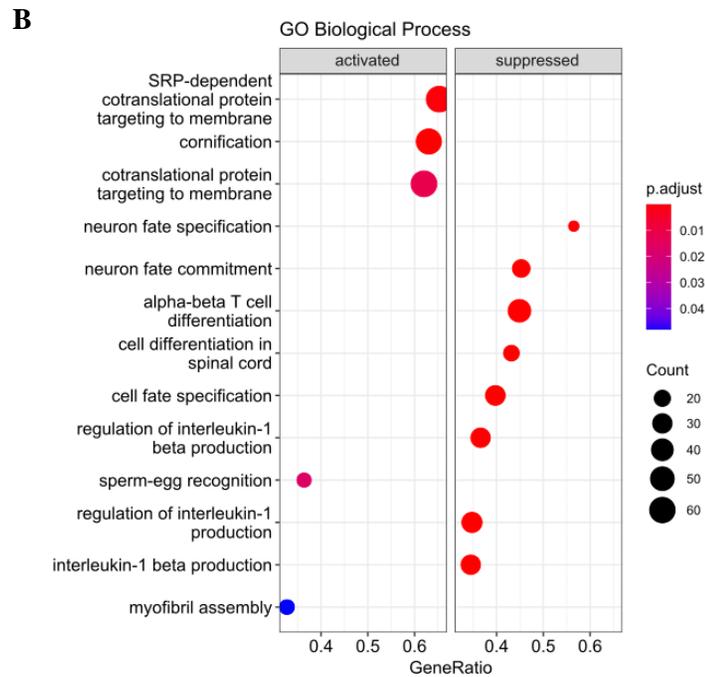
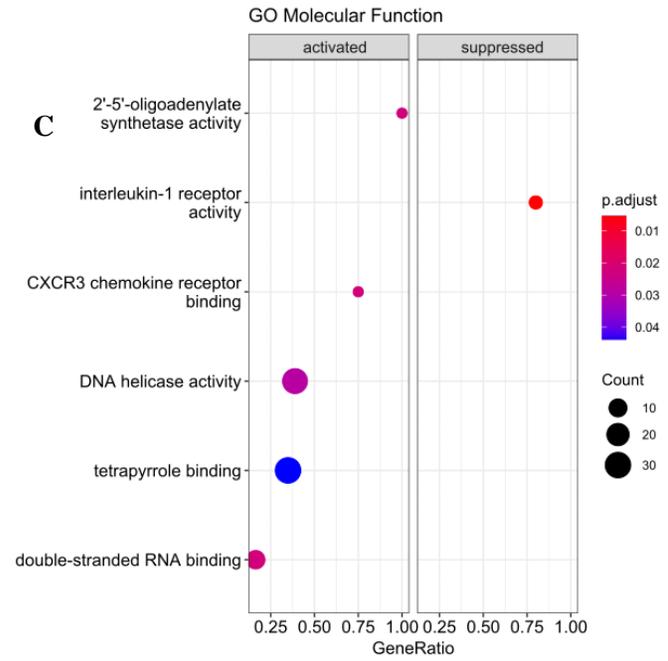
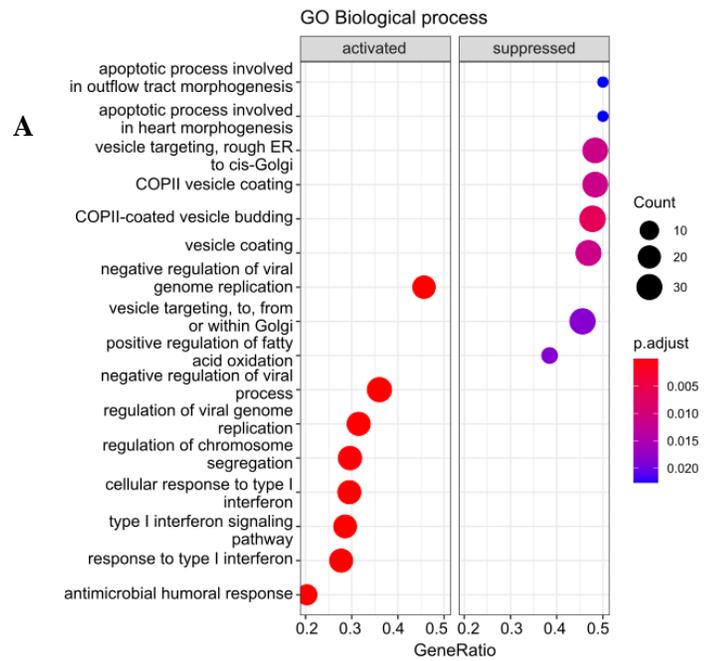
25. Jøntvedt Jørgensen M, Holter JC, Christensen EE, Schjalm C, Tonby K, Pischke SE, et al. Increased interleukin-6 and macrophage chemoattractant protein-1 are associated with respiratory failure in COVID-19. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78710-7>
26. Range K, M D, Moser YA. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone.* 2012;23(1):1–7.



**Figura 2. Exploración de librerías secuenciadas y normalizadas mediante el agrupamiento jerárquico (HC) de los 200 genes con mayor variabilidad. A.** HC en librerías de sangre periférica antes y después del tratamiento. **B.** HC en librerías de orina. El primer cluster corresponde al paciente AcRpt02 en el cual se observa un comportamiento transcripcional extremo respecto a los demás pacientes. Como no se contaba con la muestra pretratamiento (AcR02), se eliminó del análisis. **C.** HC en librerías de orina posterior a la eliminación de AcRpt02.

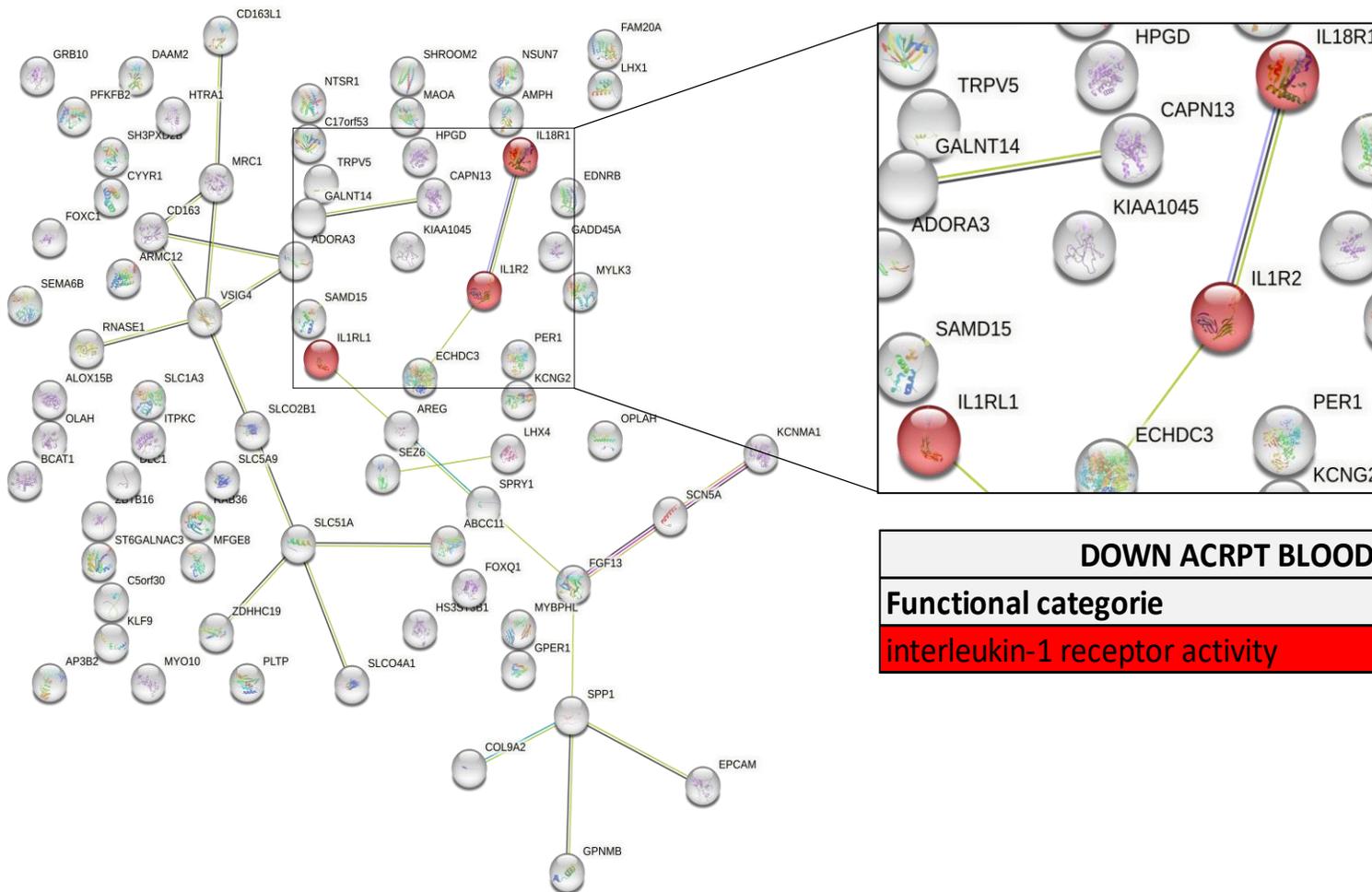


**Figura 3. Análisis de expresión diferencial.** **A.** Volcano plot en el que se muestra el número de genes diferencialmente expresados en sangre periférica en los pacientes con rechazo agudo antes del tratamiento ( $\log_{2}FC \leq -2$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) y después del tratamiento ( $\log_{2}FC \geq 2$ ,  $FDR \leq 0,05$ ). **B.** Volcano plot en el que se muestra el número de genes diferencialmente expresados en orina en los pacientes con rechazo agudo antes del tratamiento ( $\log_{2}FC \leq -2$ ,  $FDR \leq 0,05$ ) y después del tratamiento ( $\log_{2}FC \geq 2$ ,  $FDR \leq 0,05$ ).

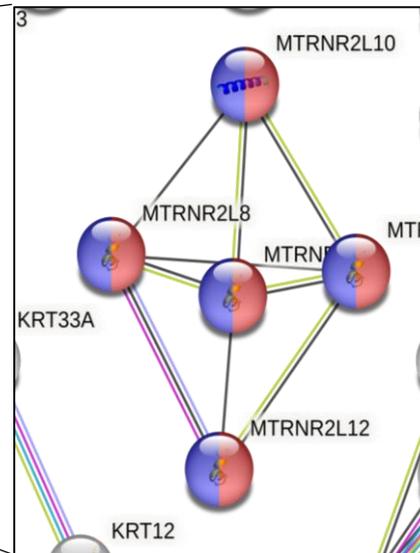
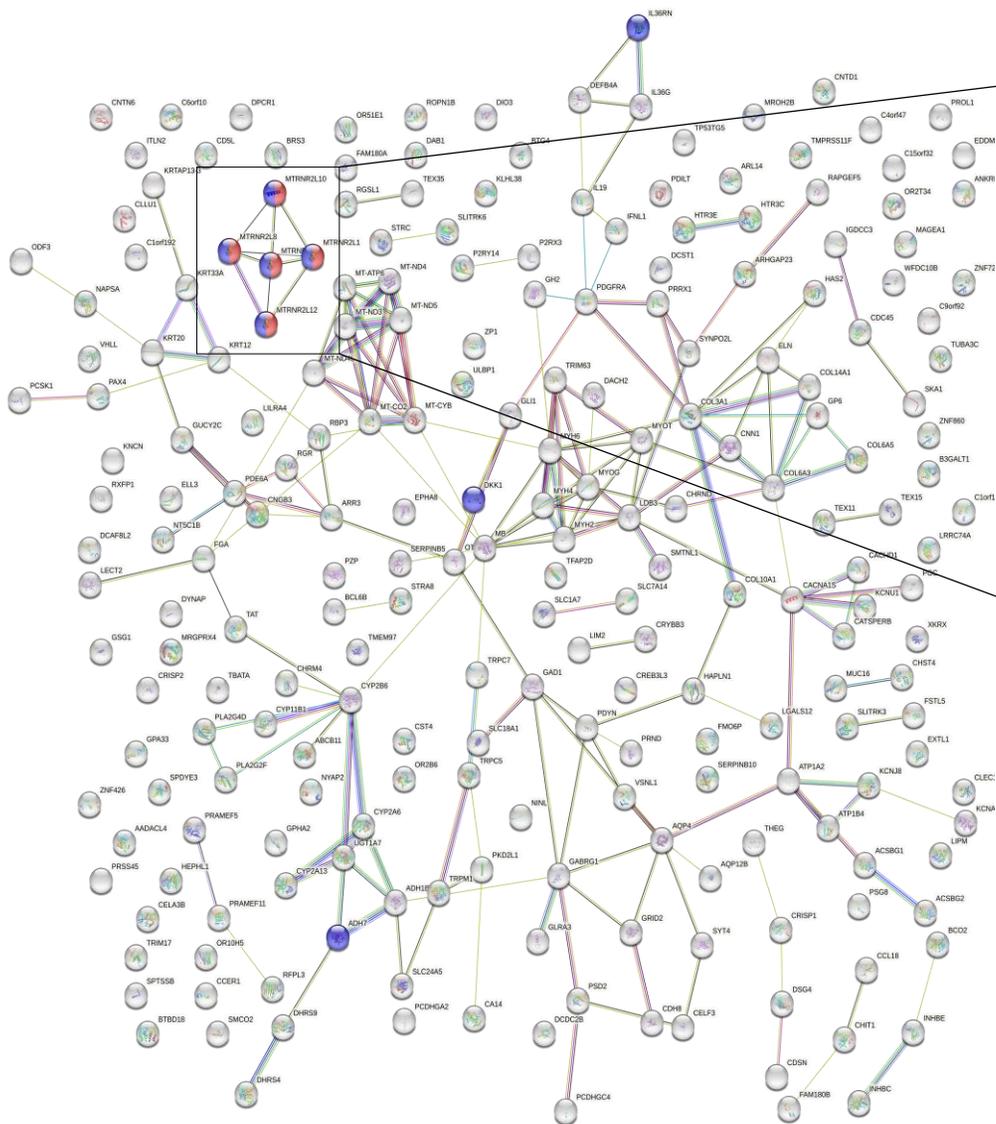


**Figura 4. Análisis funcional mediante GSEA.** **A, B.** Dotplots en los que se muestran los procesos biológicos de GO activados y suprimidos en sangre (A) y orina (B) en los pacientes con rechazo agudo posterior al tratamiento en relación a su condición pretratamiento. **C, D.** Dotplots en los que se muestran las funciones moleculares de GO activadas y suprimidas en sangre (C) y orina (D) en los pacientes con rechazo agudo posterior al tratamiento en relación a su condición pretratamiento

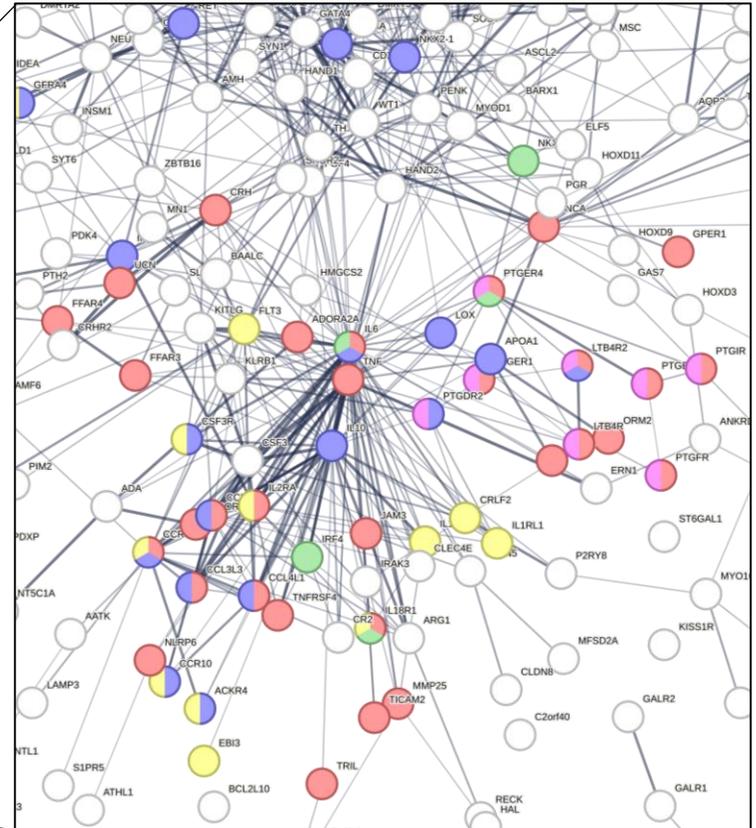
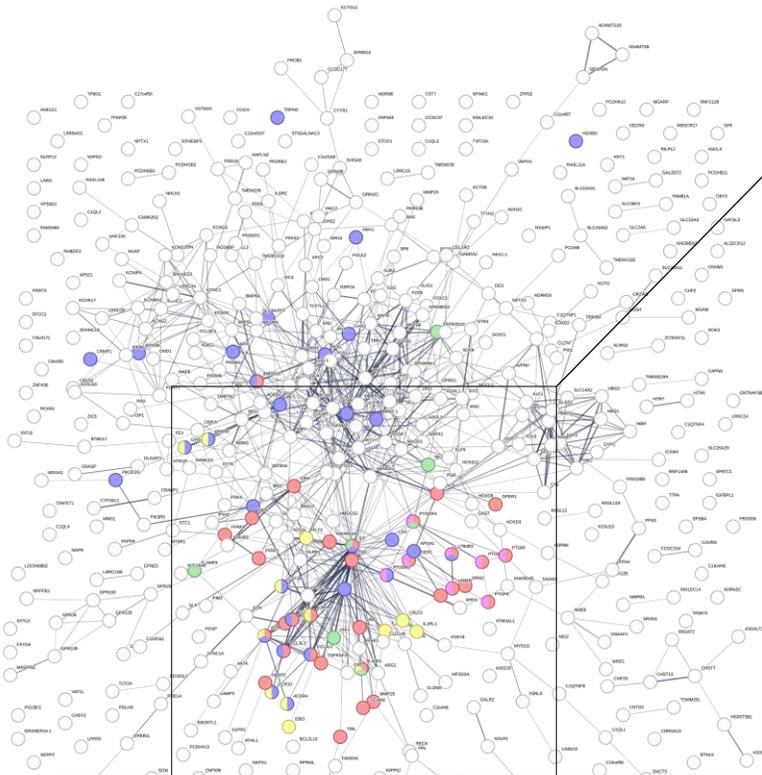




DOWN ACRPT BLOOD	
Functional categorie	p.adjust
interleukin-1 receptor activity	0.0204



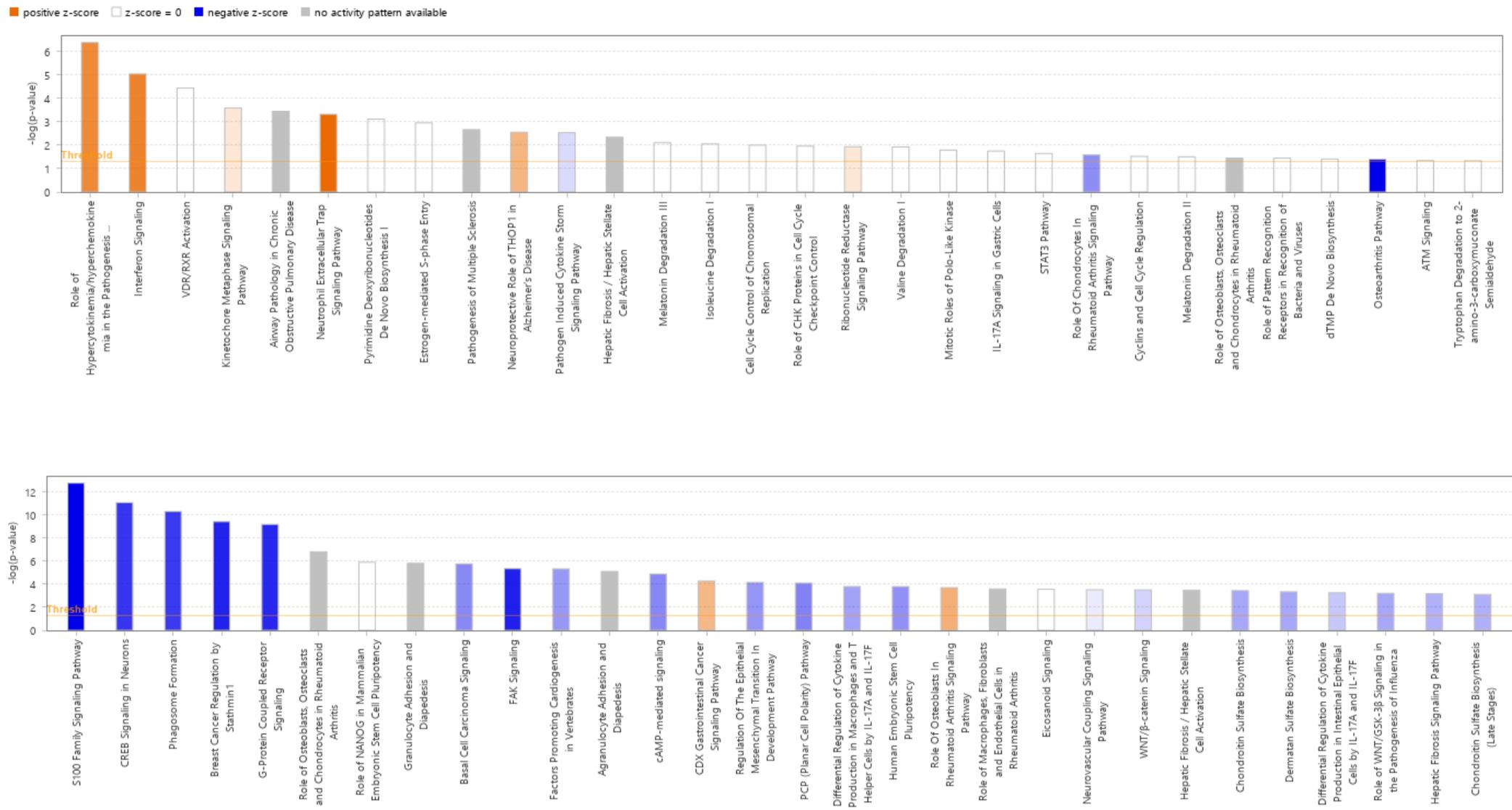
UP ACRT URINE	
Functional categorie	p.adjust
Receptor antagonist activity	5,31E-05
Negative regulation of execution phase of apoptosis	0,0412



DOWN ACRPT URINE	
Functional categorie	p.adjust
Eicosanoid ligand-binding receptors	2,77E-05
Cytokine receptor activity	0,0003
Inflammatory response	0,0009
Chemotaxis	0,0037
CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	0,007

**Figura 5. Análisis de categorías funcionales en STRING y redes de interacción proteína-proteína de los genes diferencialmente expresados.**

**A, B.** Redes de interacción categorías funcionales y genes más representativos en sangre periférica. En A, se muestra la red y categorías funcionales asociadas a los genes regulados positivamente en AcRpt en relación con AcR y en B, los asociados a los genes regulados negativamente. **C, D.** Redes de interacción categorías funcionales y genes más representativos en orina. En C, se muestra la red y categorías funcionales asociadas a los genes regulados positivamente en AcRpt en relación con AcR y en D, los asociados a los genes regulados negativamente.



**Figura 6.** Vías de Ingenuity asociadas a los genes regulados positivamente en pacientes AcR posterior al tratamiento anti rechazo

## **CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL**

## 7 CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de la importancia del trasplante renal como terapia de reemplazo para los pacientes con ESRD, aún existen factores que limitan la supervivencia a largo plazo del injerto y que, por ende, ponen en riesgo la salud y la vida del paciente trasplantado. Dentro de estos, el rechazo representa la principal causa de pérdida del injerto renal (1); en segundo lugar, se encuentran la nefropatía por BK virus y la realización al paciente de un número significativo de biopsias a lo largo del seguimiento posterior al trasplante (2).

Ya que el rechazo representa la principal causa de pérdida del injerto, su comprensión y evaluación de posibles estrategias terapéuticas son de gran interés y necesidad en el área de trasplantes. El rechazo es un evento mediado por la respuesta inmune instaurada frente al órgano, pero otros factores como la edad del paciente y del donante, condiciones pre y post operatorias y la etnia, también son determinantes en el desenlace del injerto (3). Esto hace necesario y pone de manifiesto la relevancia de una adecuada tipificación HLA entre donante y receptor, y la identificación de inmunoglobulinas circulantes pre-trasplante que puedan incrementar el riesgo de rechazo. Asimismo, es indispensable la inmunosupresión posterior al trasplante con el fin de controlar la respuesta inmune frente al injerto (4). Aunque existen estas estrategias para disminuir el riesgo de rechazo, la respuesta inmune frente al órgano es inevitable debido, en primer lugar, a la alta disponibilidad de moléculas proinflamatorias derivadas de procesos como la muerte del donante, la lesión por isquemia reperusión y daño celular mecánico generado en los procesos quirúrgicos. Dentro de estas moléculas se encuentran patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y citoquinas que pueden llevar a un estado de activación de la respuesta innata, como por ejemplo de células presentadoras de antígenos, y, por ende, propiciar un ambiente inflamatorio para la instauración de una respuesta frente al órgano (5). En segundo lugar, la naturaleza alogénica del injerto hace que haya una disponibilidad permanente de antígenos como péptidos derivados de moléculas HLA del donante y moléculas derivadas de otros complejos proteicos, como los complejos menores, que junto con la respuesta inicial llevan a la instauración de una respuesta celular específica por la vía de alorreconocimiento indirecto, y a la activación de múltiples clonas de células T de memoria por la vía de alorreconocimiento directo (6). La activación de la respuesta T por las diferentes vías de alorreconocimiento junto con la migración otras poblaciones celulares al riñón pueden resultar en rechazo mediado por células T. Por otro lado, el direccionamiento de la respuesta inmune hacia una respuesta humoral puede resultar en rechazo mediado por anticuerpos.

La medicina personalizada y de precisión es actualmente una de las aproximaciones de mayor relevancia para la prevención y tratamiento de enfermedades y está basada en la individualización de la condición clínica de un paciente con el fin de dar un tratamiento en función de información molecular (genómica, transcriptómica, proteómica, etc.), ambiental o de los estilos de vida de cada paciente (7). A la luz de esa definición, la aplicación de las ciencias ómicas para el estudio de los desenlaces del injerto renal constituye una alternativa tanto para la comprensión de mecanismos moleculares implicados en el rechazo y en la aceptación del injerto, como para la identificación de biomarcadores moleculares relacionados a dichos desenlaces que representen herramientas pronósticas y diagnósticas y que adicionalmente, permitan en un futuro identificar el tratamiento inmunomodulador indicado para el paciente indicado. En estudios previos, ya se ha identificado transcritos a nivel del tejido, que podrían estar asociados a la respuesta frente al injerto. Dentro de estos estudios, se encuentra en el que fueron reportados los ENDATs. Estos, hacen referencia a genes asociados a la activación y daño endotelial, como causa y consecuencia del rechazo. Dentro de estos genes se reportaron algunos como VWF, EDN1, CAV1, CDH5, CDH13, PALMD, PECAM1 y SELE los cuales se encontraron incrementados en biopsias de pacientes con rechazo mediado por anticuerpos (8). En general, varios de estos genes han sido reportados en el tejido de pacientes con rechazo y han sido incluidos dentro de la clasificación de Banff, como parte del estudio histopatológico para el diagnóstico de rechazo (9). No obstante, la identificación de perfiles moleculares asociados al desenlace del injerto en matrices no invasivas como la orina, ha sido limitada y no ha sido reportado un panel de moléculas indicador de rechazo o de aceptación del injerto.

Este trabajo es la primera aproximación en nuestro grupo de Investigación al estudio de los mecanismos moleculares implicados en el rechazo agudo, el rechazo crónico y la aceptación a largo plazo del injerto en pacientes trasplantados de riñón, así como en pacientes en diálisis en lista de espera para trasplante renal, empleando metodologías de próxima generación como el RNA-Seq. En el estudio buscamos realizar una exploración global del transcriptoma de pacientes con las condiciones previamente mencionadas. Es de resaltar que para el estudio se implementaron muestras de sangre periférica, biopsia y orina con el fin de analizar simultáneamente matrices que tuvieran un contacto estrecho con las diferentes células del sistema inmune implicadas en el rechazo y en la aceptación del injerto renal. Con base en la contextualización previa de la medicina de precisión, nuestro principal objetivo con este trabajo fue explorar el transcriptoma de pacientes trasplantados y en pacientes con enfermedad crónica sometidos a diálisis para la identificación de genes diferencialmente expresados y de procesos biológicos asociados a estos, en las diferentes muestras y en los diferentes grupos de estudio, con el fin de tener un panorama molecular de cada una de las

condiciones analizadas. Particularmente, hicimos énfasis en los genes asociados a procesos inmunológicos debido al rol determinante del sistema inmune en el desenlace del injerto.

Ya que el trabajo fue de tipo exploratorio, nuestros principales esfuerzos y análisis de los resultados obtenidos se basaron en:

1. Implementar una metodología idónea para la obtención de RNA de sedimento urinario, en condiciones adecuadas para su implementación en RNA-Seq. Esta metodología también fue aplicable a otras matrices biológicas.
2. Evaluar la concordancia entre la información obtenida de los análisis y los procesos celulares canónicos implicados en el rechazo y la aceptación del injerto renal y la identificación de moléculas asociadas a dichos procesos.

A continuación, se hace una discusión más detallada de cada uno de los aspectos mencionados.

**Implementación de una metodología idónea para la obtención de RNA de sedimento urinario, en condiciones adecuadas para su implementación en RNA-Seq. Esta metodología también fue aplicable a otras matrices biológicas.**

La secuenciación de RNA es una metodología de secuenciación masiva para determinar la secuencia de nucleótidos o los niveles del conjunto de transcritos en una matriz biológica en un momento específico. Las tecnologías actuales incluyen la secuenciación de RNA a partir de un conjunto de células (*bulk sequencing*), una única célula (*single-cell sequencing*) y transcriptómica espacial (10,11). En cualquiera de los casos, un aspecto de suma importancia es la muestra de la que se parte, la cual debe estar en las condiciones adecuadas para asegurar la preservación de las moléculas RNA. Por este motivo, fue necesario implementar un método de extracción de RNA en condiciones libres de nucleasas, que tuviera un rendimiento adecuado y que permitiera obtener RNA en las condiciones de pureza e integridad exigidas para la secuenciación (12).

Como se describió en el capítulo 2, la extracción de RNA, particularmente de las muestras de orina, representó el primer reto del trabajo, debido a la poca disponibilidad en la literatura de protocolos reproducibles y aplicables a orina, como una muestra de gran relevancia en áreas como la del trasplante renal. No obstante, posterior a la aplicación del protocolo reportado por Monteiro y colaboradores (13) e incrementando el volumen de glicógeno, se logró mejorar el rendimiento de la extracción. A continuación, se pasó a buscar estrategias para incrementar y medir la integridad del RNA y fue cuando se estableció el %DV200 como un parámetro aplicable a muestras con alta

probabilidad de degradación y que fue estandarizado para su implementación en secuenciación (14). De esta manera, y aplicando el mismo protocolo a las muestras de sangre y biopsia, se captaron los pacientes y controles y se logró extraer el RNA en las condiciones requeridas para RNA-Seq.

Es importante resaltar que previo al establecimiento de este protocolo, y de los parámetros para la evaluación la calidad del RNA, se emplearon métodos de extracción en columna con diferentes variaciones, pero con ninguna se logró obtener un rendimiento adecuado. Con esto, en primer lugar, se deduce la importancia de establecer el método de extracción en función del tipo de muestra empleada. En segundo lugar, que los métodos en columna no son adecuados para la extracción de RNA de muestras limitantes como la orina, especialmente si es para su aplicación en RNA-Seq. También, se resalta la implementación de *carriers* y de sales como el acetato de sodio para incrementar el rendimiento.

Como se describió en los diferentes capítulos, varios autores han publicado resultados de expresión génica en orina y biopsia de pacientes trasplantados. No obstante, es llamativo que en la mayoría de los trabajos no se hace una profundización respecto a la calidad de la muestra de RNA inicial, ni se hace mención del rendimiento de los métodos de extracción implementados de los cuales, la extracción con columna es la más implementada. Es por esto por lo que el protocolo usado para este trabajo representa una información de importancia debido a la demostración de su rendimiento y de la integridad del RNA aislado mediante la implementación del %DV200.

### **Evaluación de la concordancia entre la información obtenida de los análisis y los procesos celulares canónicos implicados en el rechazo y la aceptación del injerto renal y la identificación de moléculas asociadas a dichos procesos.**

Como se mencionó en la descripción del estudio y a lo largo de los diferentes capítulos, este trabajo fue de carácter exploratorio y estuvo enfocado a la búsqueda de diferencias en la expresión génica en pacientes trasplantados de riñón, tanto en función de los desenlaces del injerto como de los diferentes tipos de matrices biológicas analizadas. De esta manera, identificamos, por ejemplo, genes y procesos biológicos que pudieran estar regulados positivamente en pacientes con rechazo versus pacientes con aceptación del injerto y viceversa, o genes que se regulen diferencialmente en biopsia u orina con relación a sangre periférica. Con esto, en el Grupo de Investigación se dio un primer paso a la comprensión de los mecanismos inmunes asociados al rechazo y a la aceptación del injerto renal desde una perspectiva molecular, y a la identificación de genes regulados en pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis que posteriormente puedan ser validados como potenciales biomarcadores de dichas condiciones.

Ya que la de la identificación de biomarcadores fue uno de los puntos clave en nuestro estudio, es importante tener en cuenta que uno de los requisitos indispensables para su evaluación, es que debe hacerse a partir de una muestra no invasiva y con alta sensibilidad (15,16). En ese orden de ideas, y en el contexto del trasplante renal, la orina es una muestra no invasiva y que previamente ha sido propuesta como una alternativa a la biopsia para la identificación de moléculas asociadas a rechazo, o que permitieran hacer seguimiento al paciente trasplantado (17). Fue por esto que uno de los ejes centrales de este trabajo fue la identificación de genes diferencialmente expresados y procesos biológicos en orina de los grupos de estudio de los cuales se contaba con esta muestra.

Típicamente, se asume que la orina refleja el panorama molecular y celular del tejido renal dado el estrecho contacto entre ambos. En uno de los primeros estudios en los que se evaluaron los niveles de algunos genes en orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, se identificó un incremento en los niveles de RNA mensajero de perforina y granzima B en estos pacientes. Dicho hallazgo, iba en línea con la respuesta celular observada en el tejido renal de los pacientes con rechazo agudo en los que predominaba la infiltración de células TCD8+ y células NK cuya respuesta se debe principalmente a la lisis celular mediada por estas moléculas (18,19). El trabajo de Baogui Li de 2001 fue uno de los puntos de partida, no solo para la identificación de moléculas de RNA en orina de pacientes trasplantados sino también para la comprensión de mecanismos celulares activados en el tejido a partir del panorama molecular observado. No obstante, una de las limitaciones de los primeros estudios fue el poco alcance que tuvieron debido a que la cuantificación de los transcritos fue hecha mediante PCR cuantitativa, lo que no permitía abordar el panorama molecular completo en el rechazo. Con el advenimiento de metodologías más sensibles y robustas como los microarreglos y las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) dicho panorama comenzó a ser ampliado, no solo mediante la identificación de genes diferencialmente expresados u otras moléculas en orina, sino también en el tejido y en sangre periférica. En este estudio, se buscó precisamente ampliar dicho panorama mediante el análisis de genes diferencialmente expresados en estas muestras mediante secuenciación de RNA.

Uno de los hallazgos más relevantes de los análisis aquí realizados fue identificar el porcentaje de correspondencia transcripcional entre el tejido renal y la orina en pacientes con rechazo agudo y rechazo crónico, mediante análisis intra grupales y con relación a los niveles de expresión génica en sangre periférica. Bajo estas condiciones, observamos que, en efecto un gran porcentaje de los genes regulados en el injerto son posteriormente observables en orina en ambos desenlaces. Un hallazgo llamativo, fue la superposición de procesos de reestructuración tisular sobre procesos inmunológicos en el tejido y en orina de pacientes con rechazo, ya que como es sabido, la activación inmunológica

frente al tejido ocurre *in situ* (6), y, por ende, era de esperarse un incremento en la regulación de genes y procesos inmunes que pudiera explicar dicha activación. No obstante, al hacer un análisis más profundo de los datos, se observó que efectivamente había una activación de procesos inmunes en el tejido y observables en orina, y se planteó la hipótesis de que dicha restructuración tisular explicada por el enriquecimiento de procesos como la queratinización, podría ser un efecto directo de la inflamación del tejido (20). La inflamación y un proceso de restauración inadecuado pueden llevar a la generación de fibrosis, la cual, como se discutió en el capítulo 3, es un signo observable en el rechazo, particularmente en procesos crónicos (21). Este mismo desenlace, en el que se observan procesos fibróticos asociados a la inflamación, ha sido descrito en enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (22). La fibrosis se da por el depósito excesivo de matriz extracelular en el tejido en respuesta al daño (23), y en el caso del trasplante, el daño mediado por la respuesta inflamatoria frente al injerto. Una de las células de mayor relevancia en este proceso son los fibroblastos, los cuales han sido observados en biopsias de pacientes trasplantados por ensayos de *Single Cell Sequencing* (24), y los cuales observamos más enriquecidos en orina y biopsia de pacientes en rechazo agudo y en orina de pacientes en rechazo crónico. Este hallazgo, aunado al alto enriquecimiento de procesos asociados a la keratinización y al incremento en la expresión de genes asociados a este proceso fueron los que nos permitieron plantear la hipótesis previamente mencionada.

Dentro de los procesos inmunes que se observaron activados, el más enriquecido fue la migración celular, tanto en rechazo agudo como crónico. Posterior al trasplante, uno de los procesos inmunológicos iniciales es la movilización celular de la circulación al tejido, mediado por la activación endotelial y por la producción de quimiocinas por células del parénquima renal (25). Al respecto, en estudios previos se identificó la regulación de RNA codificante para *CXCL9* y *CXCL10* en orina de pacientes con rechazo (26). A estos hallazgos se sumaron los resultados de un estudio de 2020 en el que mediante secuenciación se identificaron regulados positivamente *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* y *CCL5* en pacientes con rechazo mediado por células T y *CXCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CCL2*, *CCL5* y *CCL18* en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos (27). Nuestros hallazgos estuvieron en concordancia con los reportes previamente mencionados, ya que observamos regulados positivamente genes como *CCL13*, *CCL14*, *CCL15*, *CCL17*, *CCL19*, *CCL2*, *CCL20*, *CCL22*, *CCL24*, *CCL8*, *CX3CL1*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL2*, *CXCL6* y *CXCL9* en orina y biopsia de rechazo agudo y rechazo crónico. Adicionalmente, identificamos en sangre periférica la regulación positiva de receptores de quimiocinas tales como *CCR2*, *CCR3*, *CX3CR1*, *CXCR1*, *CXCR2* en rechazo agudo y *CCR2*, *CCR4*, *CCR6*, *CCR7* y *CXCR5* en rechazo crónico. Estos hallazgos, aunados al incremento de *VEGF* en orina en ambos desenlaces podrían sugerir que en el injerto se genera un

gradiente de quimiocinas que promueve la migración celular desde la circulación. Este hallazgo estaría soportado el incremento en los receptores de quimiocinas por células en sangre periférica. Esta observación resalta el rol del endotelio en la transmigración celular y en la instauración de la respuesta frente al órgano, ya que como se mencionó, se observó un incremento en la expresión del factor endotelial *VEGF* que promueve la diferenciación y proliferación endotelial, así como la angiogénesis y la vasodilatación (28). Con base en las quimiocinas incrementadas y en el análisis de STRING, la población de células que podría estar migrando estaría conformada por neutrófilos, linfocitos y monocitos, las cuales tuvieron el mayor nivel de significancia en este análisis.

De los hallazgos previos se dedujo, primero el comportamiento transcripcional similar entre las muestras de biopsia y de orina, que permiten reforzar la hipótesis que plantea a la orina como un reflejo del tejido renal y su potencial uso como muestra no invasiva para la búsqueda de marcadores moleculares asociados al desenlace del injerto; y segundo, que tanto en biopsia y orina como en sangre periférica, es posible detectar la regulación de procesos inmunológicos relevantes en la respuesta frente al injerto. Fue por esto que los análisis siguientes estuvieron enfocados en la identificación de genes diferencialmente expresados y procesos biológicos en sangre periférica y en orina. En cada caso, se hicieron los análisis por tipo de muestra realizando comparaciones inter grupales.

La sangre periférica ha sido la matriz biológica de estudio menos invasiva implementada en muchos de los estudios enfocados tanto a la búsqueda de biomarcadores asociados al injerto renal como a la identificación de categorías funcionales. En un estudio realizado por Wenyu Xiang y colaboradores, se observó un incremento en la expresión de *IL-10*, *VEGFA* y *CXCL8* en sangre de pacientes trasplantados con rechazo agudo, ya fuera mediado por células T o por anticuerpos, en comparación con pacientes sin evidencia de rechazo (29). Adicionalmente, en otro estudio de Hee Jung Jeon se evaluó mediante NGS las diferencias transcripcionales en sangre de pacientes trasplantados con rechazo mediado por anticuerpos y pacientes con acomodación. A partir de los análisis se obtuvo que *COX7A2L*, *CD69*, *CD14*, *CFD* y *FOXJ3* podían ser evaluados para identificar ambos grupos de pacientes empleando sangre periférica (30).

En nuestro caso, se hizo un análisis incluyendo no solo pacientes trasplantados, sino también individuos sanos y pacientes en diálisis. Con la inclusión de estos últimos, se buscó identificar genes comunes entre pacientes con enfermedad renal crónica sin trasplante y pacientes con rechazo agudo, crónico y con supervivencia del injerto con el objetivo de identificar genes pre-trasplante que pudieran posteriormente influir en el desenlace del injerto. Para esto, se identificaron inicialmente los genes diferencialmente expresados entre los controles y todos los grupos de pacientes, y posteriormente se identificaron genes compartidos entre los pacientes en diálisis y los pacientes trasplantados.

Llamativamente, entre los pacientes en diálisis y los pacientes con rechazo agudo y crónico se identificaron procesos comunes asociados a la activación de la respuesta innata, activación de leucocitos y migración celular y con los pacientes con supervivencia, procesos que incluyeron la regulación inmunológica. Aunque este no es un resultado concluyente, si es una aproximación a la identificación de procesos inmunológicos previos al trasplante que podrían generar una predisposición al rechazo o a la aceptación. Es importante resaltar que los pacientes en diálisis tienen un nivel basal de inflamación asociado a múltiples factores que incluyen malas prácticas en el procedimiento, estrés oxidativo, disbiosis que puede conducir a endotoxemia y retención de toxinas urémicas. En estos pacientes se han identificado niveles séricos incrementados de proteína C reactiva, IL-6, IL-1 $\beta$ , ferritina y TNF, los cuales son indicadores de inflamación (31). Es importante aclarar que con los análisis realizados no fue posible establecer si los genes asociados a procesos inflamatorios en pacientes con diálisis, condicionan posteriormente el desenlace del injerto, en primer lugar porque ambos grupos de estudio estuvieron conformados por diferentes individuos, es decir, no fue un análisis pareado en función de la temporalidad, y en segundo lugar porque los datos no son suficientes para establecer una relación de causalidad entre los genes regulados en ambos grupos de estudio. La importancia de estos análisis se basa principalmente en la identificación del nivel inflamatorio en los pacientes en proceso de diálisis, que permiten plantear la hipótesis de que dicho estado inflamatorio previo podría eventualmente estar asociado al desenlace del injerto renal.

En sangre periférica también realizamos una segunda parte, analizando diferencias en la expresión génica únicamente entre pacientes con rechazo y pacientes con supervivencia, con el fin de explorar moléculas y procesos biológicos asociados a estos desenlaces y que pudieran ser identificados en sangre. Con estos análisis fue posible identificar que en los pacientes con rechazo agudo respecto a supervivencia del injerto se regularon positivamente genes como *CCL18*, *IGHV1-69*, *ITGA7*, *IGHV2-70D*, *CLEC12B*, *TLR5*, *TREM2*, *CCL23*, *TREML4* e *IGHV1-69-2* los cuales se asociaron funcionalmente a respuesta innata. Esta respuesta es esencial en las primeras etapas de la respuesta frente al injerto renal y en un estudio previo con pacientes trasplantados que tuvieron rechazo agudo mediados por células T, se identificó un panorama molecular de activación innata dado por la regulación de caspasas, citoquinas como interferón gamma, IL-1, IL-12, CXCL1 y CCL2, y de moléculas asociadas a la interacción entre receptores de reconocimiento de patrones y DAMPs (32). Asimismo, se ha propuesto la hipótesis de que el rechazo puede estar mediado por lo que algunos autores han denominado alorreconocimiento innato ya que se ha reportado que el sistema innato podría generar memoria inmunológica (33). No obstante, se ha descrito que la memoria es exclusiva del sistema inmune adaptativo, y que en el sistema innato se desarrolla un estado de inmunidad entrenada en el que, como en la memoria específica, se da una respuesta más rápida y eficiente frente

a ciertas moléculas que habían sido previamente reconocidas y que implica principalmente cambios epigenéticos en las células respondedoras. No obstante, dicha respuesta no implica el reordenamiento de genes para la expresión de receptores específicos como en el caso del TCR (34). Moléculas como la vimentina además de haberse previamente asociado con fibrosis en pacientes trasplantados, y HMGB1, la cual se ha relacionado con rechazo agudo en trasplante hepático por la activación de células dendríticas (35), también se han asociado a inmunidad entrenada y podrían modular este tipo de respuestas en macrófagos (36,37). Por otro lado, en rechazo crónico se observó un incremento en la regulación principalmente de cadenas de inmunoglobulinas, que si bien no se asociaron funcionalmente a alguna categoría en el análisis de STRING, si pueden ser indicadores de la activación de la respuesta humoral, típicamente asociada con este tipo de rechazo (38). La activación de la respuesta humoral también es dependiente del alorreconocimiento y de la subsecuente diferenciación y activación de células T foliculares que participen a su vez en la diferenciación de células B productoras de anticuerpos en presencia de IL-21 e IL-6 (39). La producción y depósito de estas inmunoglobulinas es responsable de los principales hallazgos en el rechazo crónico mediado por anticuerpos como inflamación de la vasculatura renal y la fibrosis intersticial y la atrofia tubular (38). Por su parte, en los pacientes con supervivencia del injerto se identificó la regulación positiva de procesos como regulación de la respuesta inmune y regulación negativa de la inmunidad mediada por células T tras las comparaciones con rechazo agudo y crónico, respectivamente. Este hallazgo es congruente con lo reportado previamente respecto a la tolerancia del injerto, y en el que tuvo una regulación significativa el gen XCL1, el cual se ha visto sobre regulado en timo y se ha asociado al establecimiento de tolerancia y generación de células T reguladoras (40).

Al realizar un análisis intra grupal en sangre periférica de rechazo agudo para identificar los cambios en la expresión génica posterior al suministro de la terapia anti-rechazo, se observó la supresión de algunos procesos asociados a la activación de células T como revestimiento de vesículas por COPII, así como la activación de vías como la de la oligoadenilato sintetasa. Estos procesos se asocian a la activación de células T y a la regulación negativa de citoquinas y genes regulados por interferón en macrófagos (41), respectivamente, lo cual sugiere que el tratamiento podría repercutir directamente en la expresión génica asociada a la respuesta frente al injerto, y que los genes identificados en las diferentes vías mencionadas en el capítulo 6 podrían ser relevantes en el seguimiento a los pacientes. Estos resultados van de la mano con los principales mecanismos de acción de los tratamientos suministrados a los pacientes. La prednisolona, la cual constituye el tratamiento de elección inicial para la reversión del rechazo, tiene un efecto sobre un gran repertorio dentro de las que se encuentran las células T, esenciales para el mantenimiento de la respuesta frente al injerto. Tras su unión al receptor de glucocorticoides, la prednisolona induce la represión de diferentes citoquinas

proinflamatorias dentro de las que destacan la IL-2. Esto entonces induce una disminución en la proliferación celular y a su vez, en la producción de citoquinas proinflamatorias (42). Aunque con los datos no fue posible establecer una asociación o una causalidad entre el suministro de este medicamento y las observaciones hechas, sí es claro que se encontró la activación de vías implicadas en la atenuación de la respuesta inmune, así como la supresión de vías implicadas en la respuesta inflamatoria.

Con base en lo anterior, es posible afirmar que la sangre es una matriz idónea para la identificación de genes diferencialmente expresados y de procesos asociados al injerto, al tiempo que es una muestra poco invasiva y de fácil acceso. Adicionalmente, los hallazgos hechos hasta ahora en esta muestra sugieren que muchos de los procesos inmunes canónicos del desenlace del injerto renal son observables en esta matriz. No obstante, y considerando nuestro hallazgo inicial respecto a la similitud entre biopsia y orina, a continuación, pasamos a identificar la idoneidad de las muestras de orina para identificar moléculas y procesos relacionados con la respuesta inmune frente al órgano trasplantado. Fue por esto que a continuación nos centramos en realizar el análisis intergrupar teniendo en cuenta únicamente las librerías secuenciadas a partir de orina.

Uno de los aspectos más llamativos de los análisis iniciales, fue la gran cantidad de genes regulados en orina en las diferentes librerías de pacientes con rechazo y pacientes supervivencia del injerto. Al respecto, es importante mencionar que no se implementaron valores más restrictivos de logFC y de significancia con el fin de abordar una cantidad suficiente de genes y de procesos biológicos, que permitieran lograr el objetivo de hacer una exploración general de los genes regulados en orina de estos pacientes. Con los análisis siguientes, se buscó hacer un análisis más específico seleccionando los genes con mayor nivel de significancia a partir del número global de genes.

Como ya se ha discutido previamente, el alorreconocimiento es un evento crucial de la respuesta inmune frente al injerto, y como consecuencia se da la activación de células T por las vías directa, indirecta y semidirecta. En cualquiera de los casos, es necesario que exista una interacción entre la célula presentadora de antígenos y la célula T que culmina en la activación de estas (43). Teniendo en cuenta la respuesta alogénica, el alorreconocimiento tiene un efecto determinante en la instauración del rechazo del injerto (44). Al hacer una comparación entre los perfiles transcripcionales en orina de pacientes con rechazo agudo y crónico, y pacientes con supervivencia del injerto se observó un claro enriquecimiento de procesos inmunológicos asociados con la presentación antigénica en ambos tipos de rechazo, así como de otros procesos implicados en la respuesta inflamatoria como respuesta a IL-12. Al ir restringiendo el número de genes e identificando los procesos biológicos asociados a estos, se mantuvo el mismo patrón y se observaron enriquecidos procesos adicionales como activación y

degranulación de neutrófilos, y señalización por citoquinas. Estos hallazgos sugieren, por un lado, que existe concordancia entre los análisis realizados y los procesos canónicos implicados en el rechazo y por el otro, que a partir del análisis molecular en orina es factible identificar tanto moléculas como procesos asociados al desenlace del injerto. Esto se refuerza con el hallazgo realizado previamente respecto a la similitud transcripcional observada entre el tejido renal y la orina. Adicionalmente, es de resaltar que los procesos biológicos activados en rechazo recrean, no solo el proceso de alorreconocimiento, sino que además se sugiere que en orina de estos pacientes es posible identificar genes y procesos asociados a la respuesta innata. Tanto en rechazo agudo como en crónico, se observó el enriquecimiento del proceso señalización por receptor citoplasmático

Uno de los hallazgos más importantes en los análisis realizados en muestras de orina, tiene que ver con los genes identificados en los diferentes desenlaces que, por su asociación con la respuesta inmune frente al injerto renal, podrían ser propuestos como posibles marcadores tanto de rechazo como de aceptación. *CCR7* se encontró regulado positivamente en rechazo agudo en el análisis respecto a supervivencia a largo plazo y rechazo crónico. Esta molécula es indispensable en el tráfico celular a los tejidos linfoides secundarios, y en el caso de la respuesta frente al injerto, para la migración tanto de células dendríticas como de células T a dichos tejidos, posterior a la interacción con su ligando CCL21 (45). En estudios previos, se ha reportado un incremento en la expresión a nivel renal de *CCR7*, junto con otros receptores de quimiocinas como *CCR1* y *CCR3* y quimiocinas como *CX3CL1* y *CCL5* en pacientes con rechazo agudo, al tiempo que se ha resaltado su rol como marcadores diagnósticos (45).

En orina también se realizó una exploración de los cambios en la expresión génica en rechazo agudo posterior a la terapia inmunosupresora para revertir el rechazo, y así como en sangre periférica, también se observó la supresión de vías como diferenciación de células T, producción de IL-1, actividad del complemento, actividad de receptores de prostaglandinas, respuesta inflamatoria y actividad de receptor de citoquinas con genes asociados a estas vías como *NLRP6*, *IL-6*, *CR2* y *TNF*. Es importante resaltar que, en orina de pacientes con rechazo agudo después del tratamiento con prednisona, los hallazgos fueron más dicientes de una posible supresión inmunológica a nivel del tejido renal. No obstante, esta información está sujeta a confirmación con un mayor número de individuos.

En rechazo crónico se observó la regulación positiva de *IL36A* respecto a rechazo agudo y supervivencia del injerto. Adicionalmente, *CD274* se encontró regulado positivamente en rechazo crónico en ambas comparaciones. Este hallazgo fue sugestivo de que en este desenlace puede darse simultáneamente una respuesta inflamatoria contrarrestada por una respuesta reguladora. IL-36 ha

sido reportado como un mediador de inflamación tubulointersticial en modelos murinos y en enfermedades inflamatorias sistémicas (46). Además, es bien sabido que la señalización por IL-36 está asociada con desórdenes fibróticos, los cuales, en el caso del trasplante, pueden estar asociados a inflamación crónica y son además un marcador de rechazo crónico (20). La contraparte de estos eventos inflamatorios se observó con la regulación positiva de CD274 (PD-L1) en rechazo crónico. El eje PD-1/PD-1L constituye uno de los puntos de control de la respuesta inmune, y la interacción ligando receptor es esencial para el control de la activación de células T. El uso de inhibidores de PD-L1 es una estrategia terapéutica ampliamente explorada en cáncer ya que reduce la probabilidad de una respuesta inmune reguladora que promueve el crecimiento tumoral al tiempo que permite la instauración de una respuesta inmune antitumoral. No obstante, en el trasplante sería necesaria la activación de estos puntos de control inmunológico ya que contribuirían al control de la activación de células T y por ende a la disminución del riesgo de rechazo. Aunque este es un paradigma respecto al trasplante, en diversos trabajos se ha reportado que el eje PD-1/PD-L1 podría estar asociado al desarrollo de fibrosis, ya que se ha visto un incremento en la expresión de PD-L1 durante la activación de fibroblastos en fibrosis pulmonar, y el silenciamiento en la expresión de esta molécula se ha asociado con la disminución en la expresión de colágeno I y fibronectina (47). Asimismo, en un reporte de caso de un paciente trasplantado de riñón a causa de un carcinoma renal y en el que posteriormente se diagnosticó inestabilidad microsatelital a nivel de duodeno por metástasis, se observó que al suministrar nivolumab, el cual es un inhibidor de PD-1, para contrarrestar el efecto metastásico no hubo afectación de la función del injerto renal, y que por el contrario los parámetros clínicos se mantuvieron normales (48). Aunque en el estudio no se concluye que la función estable del injerto en este paciente haya estado asociada al suministro del nivolumab, si es posible especular respecto al rol real de este checkpoint inmune en la respuesta frente al injerto, el cual podría estar favoreciendo algunos de los procesos observados en el rechazo crónico.

Dentro de las observaciones más llamativas de este capítulo, y en general, de este trabajo, fue la regulación positiva de FGL1 en orina de pacientes con supervivencia del injerto a largo plazo a partir de las comparaciones tanto con rechazo agudo como crónico ya que esta molécula también hace parte de los puntos de control de la respuesta inmune, y recientemente se ha empezado con la exploración de su rol en modelos de trasplante. FGL1 es producido a nivel hepático y es un ligando de LAG3, expresado principalmente por células T activadas (49). La interacción FGL1/LAG3 induce la atenuación de la respuesta T, y por ende está asociada a la regulación de la respuesta inmune (50). La observación de la regulación positiva de este gen a nivel de orina en pacientes con supervivencia del injerto podría ser sugestiva de un ambiente tolerogénico a nivel del tejido, promovido en parte por FGL1 y por otras moléculas asociadas a la regulación inmunológica como FOXP3, la cual, aunque

con un menor nivel de significancia, también se observó incrementada en orina de estos pacientes. Lo anterior permite sugerir que esta molécula podría ser validada como un potencial biomarcador de aceptación del injerto a partir de muestras de orina. No obstante, en la literatura aún no hay suficiente información que dé cuenta del rol de esta molécula en la supervivencia del riñón trasplantado.

## 7.1 Conclusiones

A continuación, se hace una descripción de las conclusiones, como se planteó inicialmente, en función de cada desenlace y con relación a los diferentes tipos de muestra analizados en cada caso:

**Rechazo agudo y rechazo crónico:** en general, en ambos desenlaces se identificaron procesos inmunes comunes y en algunos casos, como en el análisis en muestras de orina, se lograron identificar moléculas que podrían estar asociadas a cada tipo de rechazo por separado. En ambos los perfiles transcripcionales y funcionales observados en el tejido se correspondieron en gran medida con los observados en orina, lo cual nos permitió comprobar dicha hipótesis. Aunque en estudios previos se habían identificado genes en orina que podrían ser sugestivos de los procesos inmunes que se dan en el tejido, con nuestros resultados logramos identificar este nivel de correspondencia. En ambos casos, se observó en orina y en tejido un enriquecimiento significativo de lo que podría ser una reestructuración tisular subsecuente al proceso inflamatorio mediado por la respuesta frente al injerto, así como procesos inmunológicos principalmente relacionados con un aumento en la producción de citoquinas requeridas para la migración celular al tejido. Este resultado se correspondió con el hallazgo en sangre periférica de un incremento en la expresión de receptores de citoquinas, lo que en conjunto podría ser el indicador de la dinámica quimiotáctica necesaria para la respuesta frente al órgano. Estos datos fueron obtenidos a partir de un análisis intragrupal y haciendo una comparación entre sangre con orina y con tejido. Al hacer un análisis intergrupar, y teniendo como línea de base a los pacientes con supervivencia, se observó que tanto en sangre como en orina de los pacientes en rechazo se logró evidenciar la activación de una respuesta inmune coherente con los mecanismos implicados en rechazo previamente descritos. Esto sugirió que ambas muestras son idóneas para el estudio de los pacientes, ya sea para diagnóstico o para seguimiento ya que ambas reflejan su estado inmunológico. Sin embargo, ya que la orina refleja el estado transcripcional del tejido y que es aquí donde se da la respuesta inmune efectora, proponemos que la orina es una matriz de mayor relevancia para la evaluación de estos procesos son sus respectivos genes, además por su fácil obtención y menor invasividad. En los pacientes con rechazo agudo después del tratamiento, no logramos hacer una asociación directa entre el tratamiento suministrado y la inhibición de la respuesta inmune que se identificó en los análisis. No obstante, partiendo de esta observación se propone hacer una validación con más individuos y correlacionando el tratamiento con los genes reportados a estos procesos

biológicos. En caso tal de encontrar una correlación inversa entre el tratamiento y la respuesta efectora de las células T aquí descritas se podrían proponer dichos genes como posibles biomarcadores de seguimiento a la terapia.

**Supervivencia del injerto:** de estos pacientes solo se contó con muestras de sangre y orina. Sin embargo, partiendo del análisis inicial, se asumió que las observaciones en orina podrían ser coherentes con lo que se da en el tejido renal de estos pacientes. En sangre periférica se observó la regulación positiva de *XCLI* al hacer el análisis intergrupal con los pacientes en rechazo. Este gen ha sido previamente asociado al desarrollo de tolerancia central. Adicionalmente y como como se describió en la conclusión anterior en estos últimos se observó la regulación positiva de procesos inflamatorios. Este hallazgo sugiere que en los pacientes con supervivencia del injerto los niveles de activación inmunológica están disminuidos. Por su parte, en orina se identificaron enriquecidos, respecto a rechazo, genes y procesos que podrían ser indicativos de un estado de regulación inmune asociado a la aceptación. *FGLI* y *FOXP3* fueron dos de los genes que sugirieron esta conclusión ya que, el primero se ha asociado en modelos animales a un checkpoint de la activación de células T, y el segundo al rol de las células T reguladoras. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la aceptación del injerto depende de la regulación positiva de genes implicados en tolerancia, así como de procesos que induzcan un estado de baja actividad inmunológica.

**Pacientes en diálisis:** aunque el objetivo inicialmente fue identificar perfiles moleculares en estos pacientes que pudieran ser correlacionados con el desenlace del injerto, no fue posible realizarlo de esta manera ya que los pacientes no fueron pareados ni fue posible hacer un seguimiento a los pacientes en diálisis antes y después del trasplante. No obstante, en sangre periférica de estos pacientes se identificaron genes funcionalmente asociados a vías proinflamatorias lo cual va de la mano con hallazgos previos que indican que la enfermedad renal crónica y la diálisis crean un ambiente inflamatorio basal en estos individuos. Aunque este estado de inflamación no se pudo asociar con el desenlace del injerto, se deja planteada la hipótesis de la posible influencia de dicha inflamación basal en la instauración de la posterior respuesta frente al órgano.

Con este primer acercamiento a la identificación de diferencias transcripcionales en pacientes trasplantados de riñón con rechazo y con aceptación del injerto por parte del grupo de investigación, se lograron identificar diferentes puntos importantes que representan de ahora en adelante el punto de partida para nuevos proyectos enfocados a, en primer lugar, validar los principales hallazgos realizados en cada una de las comparaciones descritas previamente; y en segundo lugar, profundizar en la comprensión de los procesos inmunológicos que median el rechazo con cohortes más grandes de pacientes e implementando metodologías alternas que permitan confirmar los hallazgos. En línea con

esto, es importante y necesario resaltar que la principal limitación de este trabajo fue el bajo número de pacientes incluidos, lo cual obedeció principalmente a los costos que acarrea la secuenciación de un transcriptoma completo. Aunque estos hallazgos y los observados en rechazo agudo y en rechazo crónico concuerdan con los procesos inmunológicos que median cada desenlace, es importante resaltar que es necesaria su confirmación con un mayor número de pacientes y empleando metodologías ortólogas.

A pesar de eso, dentro de los aspectos clave que vale la pena resaltar del trabajo se encuentran:

1. La optimización de la extracción de RNA de sedimento urinario para su aplicación en secuenciación.
2. La identificación del alto nivel de similitud entre los perfiles transcripcionales y funcionales observados en orina y en el tejido renal.
3. La identificación de la concordancia entre las vías funcionales identificadas con nuestros análisis y las vías canónicas que median el rechazo y la aceptación del injerto.
4. La identificación de potenciales moléculas que podrían ser validadas como biomarcadores de rechazo y de aceptación del injerto renal en muestras no invasivas como la orina.

## **7.2 Perspectivas**

Como se mencionó previamente, las observaciones realizadas a partir de los análisis constituirán el punto de partida para la validación de los resultados y para la profundización en los mecanismos inmuno moleculares implicados en los desenlaces del injerto renal. Dentro de las principales perspectivas, se encuentra la captación de un mayor número de pacientes en los que se puedan validar mediante metodologías ortólogas como la qRT-PCR los hallazgos aquí descritos, además de diseñar modelos matemáticos que, con la implementación de los niveles de expresión, permitan hacer una diferenciación sensible y específica entre pacientes trasplantados con rechazo y con supervivencia del injerto a largo plazo. Asimismo, tras la validación de dichos hallazgos se espera proponer la implementación de muestras de orina de los pacientes trasplantados como una estrategia para el diagnóstico de rechazo y para la detección de moléculas pronósticas y de seguimiento posterior al trasplante.

### 7.3 Referencias

1. Betjes MGH, Roelen DL, van Agteren M, Kal-van Gestel J. Causes of Kidney Graft Failure in a Cohort of Recipients With a Very Long-Time Follow-Up After Transplantation. *Front Med.* 2022;9(June):1–12.
2. Pinto-Ramirez J, Garcia-Lopez A, Salcedo-Herrera S, Patino-Jaramillo N, Garcia-Lopez J, Barbosa-Salinas J, et al. Risk factors for graft loss and death among kidney transplant recipients: A competing risk analysis. *PLoS One [Internet].* 2022;17(7 July):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0269990>
3. Oweira H, Ramouz A, Ghamarnejad O, Khajeh E, Ali-Hasan-al-saegh S, Nikbakhsh R, et al. Risk Factors of Rejection in Renal Transplant Recipients: A Narrative Review. *J Clin Med.* 2022;11(5).
4. Bestard O, Thauinat O, Bellini MI, Böhmig GA, Budde K, Claas F, et al. Alloimmune Risk Stratification for Kidney Transplant Rejection. *Transpl Int.* 2022;35(May):1–10.
5. Li Q, Lan P. Activation of immune signals during organ transplantation. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1).
6. Etxebarria A, Díez-Martín E, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. Role of the Immune System in Renal Transplantation, Types of Response, Technical Approaches and Current Challenges. *Immuno.* 2022;2(4):548–70.
7. Delpierre C, Lefèvre T. Precision and personalized medicine: What their current definition says and silences about the model of health they promote. Implication for the development of personalized health. *Front Sociol.* 2023;8.
8. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial Gene Expression in Kidney Transplants with Alloantibody Indicates Antibody-Mediated Damage Despite Lack of C4d Staining. 2009;2312–23.
9. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-Van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation.* 2018;102(11):1795–814.
10. Deshpande D, Chhugani K, Chang Y, Karlsberg A, Loeffler C, Zhang J, et al. RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. *Front Genet.* 2023;14(March):1–12.

11. Hematol J, Hong M, Tao S, Zhang L, Diao LT, Huang X, et al. RNA sequencing : new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020;1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01005-x>
12. Schuierer S, Carbone W, Knehr J, Petitjean V, Fernandez A, Sultan M, et al. A comprehensive assessment of RNA-seq protocols for degraded and low-quantity samples. *BMC Genomics*. 2017;18(1):1–13.
13. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Passarelli M, Machado UF, Lin CJ, et al. Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2016;462:158–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.018>
14. Matsubara T, Soh J, Morita M, Uwabo T, Tomida S, Fujiwara T, et al. DV200 Index for Assessing RNA Integrity in Next-Generation Sequencing. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
15. Jin PH, Sarwal RD, Sarwal MM. Urinary Biomarkers for Kidney Allograft Injury. *Transplantation*. 2022;106(7):1330–8.
16. Nissaisorakarn V, Lee JR, Lubetzky M, Suthanthiran M. Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance. *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79(5):343–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.01.006>
17. Bradley MS, Boudreau M-H, Grenier C, Huang Z, Murphy SK, Siddiqui NY. Urine RNA Processing in a Clinical Setting: Comparison of Three Protocols HHS Public Access. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2019;25(3):247–51.
18. Choy JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ*. 2010;17(4):567–76.
19. Li B, Hartono C, Sharma VK, Schwartcz JE. Measurement of Messenger Rna for Perforin and Granzyme B in Urine. *N Engl J Med*. 2001;344(13):947–54.
20. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
21. van Leeuwen LL, Leuvenink HGD, Olinga P, Ruigrok MJR. Shifting Paradigms for Suppressing Fibrosis in Kidney Transplants: Supplementing Perfusion Solutions With Anti-fibrotic Drugs. *Front Med*. 2022;8(January):1–12.
22. Arslan ME, Brar R, Goetz L, Karamchandani D, Mikula MW, Hodge K, et al. Inflammation

and tissue remodeling contribute to fibrogenesis in stricturing Crohn's disease: image processing and analysis study. *J Pathol Transl Med.* 2022;56(5):239–48.

23. Zhao M, Wang L, Wang M, Zhou S, Lu Y, Cui H, et al. Targeting fibrosis, mechanisms and cilinical trials. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1).
24. Suryawanshi H, Yang H, Lubetzky M, Morozov P, Lagman M, Thareja G, et al. Detection of infiltrating fibroblasts by single-cell transcriptomics in human kidney allografts. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(6 June):1–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0267704>
25. Krupickova L, Fialova M, Novotny M, Svachova V, Mezerova K, Cecdlova E, et al. Chemokine Profiles Are Affected in Serum of Patients with Acute Rejection of Kidney Allograft. *Mediators Inflamm.* 2021;2021.
26. Ciftci HS, Tefik T, Savran MK, Demir E, Caliskan Y, Ogret YD, et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 Levels and Acute Renal Graft Rejection. *Int J organ Transplant Med* [Internet]. 2019;10(2):53–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31285802><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6604756>
27. Verma A, Muthukumar T, Yang H, Lubetzky M, Cassidy MF, Lee JR, et al. Urinary cell transcriptomics and acute rejection in human kidney allografts. *JCI Insight.* 2020;5(4):1–16.
28. Shaik-Dasthagirisahab YB, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Potalivo G, Caraffa A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26(2):327–35.
29. Xiang W, Han S, Wang C, Chen H, Shen L, Zhu T, et al. Pre-transplant Transcriptional Signature in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Acute Renal Allograft Rejection. *Front Med.* 2022;8(January):1–15.
30. Jeon HJ, Lee JG, Kim K, Jang JY, Han SW, Choi J, et al. Peripheral blood transcriptome analysis and development of classification model for diagnosing antibody-mediated rejection vs accommodation in ABO-incompatible kidney transplant. *Am J Transplant* [Internet]. 2020;20(1):112–24. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajt.15553>
31. Dheda S, Vesey DA, Hawley C, Johnson DW, Fahim M. Effect of a Hemodialysis Session on Markers of Inflammation and Endotoxin. *Int J Inflamm.* 2022;2022(ii).

32. Mueller FB, Yang H, Lubetzky M, Verma A, Lee JR, Dadhania DM, et al. Landscape of innate immune system transcriptome and acute T cell–mediated rejection of human kidney allografts. *JCI Insight*. 2019;4(13):1–23.
33. Zhao D, Abou-Daya KI, Dai H, Oberbarnscheidt MH, Li XC, Lakkis FG. Innate Allorecognition and Memory in Transplantation. *Front Immunol*. 2020;11(May):1–7.
34. Ochando J, Mulder WJM, Madsen JC, Netea MG, Duivenvoorden R. Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol*. 2023;19(1):23–37.
35. Chen Y, Zhang W, Bao H, He W, Chen L. High Mobility Group Box 1 Contributes to the Acute Rejection of Liver Allografts by Activating Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2021;12(June):1–11.
36. Wang Z, Divanyan A, Jourdeuil FL, Goldman RD, Ridge KM, Jourdeuil D, et al. Vimentin expression is required for the development of EMT-related renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction in mice. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2018;315(4):F769–80.
37. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(6):375–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
38. Lai X, Zheng X, Mathew JM, Gallon L, Leventhal JR, Zhang ZJ. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol*. 2021;12(May):1–13.
39. Kim MY, Brennan DC. Therapies for Chronic Allograft Rejection. *Front Pharmacol*. 2021;12(April):1–18.
40. Lei Y, Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect* [Internet]. 2012;14(3):262–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003>
41. Lee W Bin, Choi WY, Lee DH, Shim H, Kim-Ha J, Kim YJ. OAS1 and OAS3 negatively regulate the expression of chemokines and interferon-responsive genes in human macrophages. *BMB Rep*. 2019;52(2):133–8.
42. Liberman AC, Budziński ML, Sokn C, Gobbi RP, Steininger A, Arzt E. Regulatory and mechanistic actions of glucocorticoids on T and inflammatory cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(MAY):1–14.
43. Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in

Solid Organ Transplantation. 2018;9(November):1–14.

44. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauinat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int.* 2022;101(4):692–710.
45. Choi H, Song H, Jung YW. The roles of CCR7 for the homing of memory cd8+ t cells into their survival niches. *Immune Netw.* 2020;20(3):1–15.
46. Yuan ZC, Xu WD, Liu XY, Liu XY, Huang AF, Su LC. Biology of il-36 signaling and its role in systemic inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2019;10(OCT):1–8.
47. Zhao Y, Qu Y, Hao C, Yao W. PD-1/PD-L1 axis in organ fibrosis. *Front Immunol.* 2023;14(May):1–22.
48. Blum S, Shapir N, Miari R, Lerner B, Koren B, Doenyas-Barak K, et al. TARGT Gene Therapy Platform for Correction of Anemia in End-Stage Renal Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(2):189–91.
49. Huo JL, Wang YT, Fu WJ, Lu N, Liu ZS. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. *Front Immunol.* 2022;13(July):1–10.
50. Tsai H i., Wu Y, Liu X, Xu Z, Liu L, Wang C, et al. Engineered Small Extracellular Vesicles as a FGL1/PD-L1 Dual-Targeting Delivery System for Alleviating Immune Rejection. *Adv Sci.* 2022;9(3):1–13.