

**Mas, Luciana Anahí**

# **Rol de la angiogénesis en la progresión a Nefropatía Crónica del Injerto: Fibrosis Intersticial/Atrofica Tubular**

---

**Tesis para la obtención del título de posgrado de  
Doctor en Bioquímica**

**Director: Mas, Valeria Raquel**

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5





**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**“Rol de la angiogénesis en la progresión a**

**Nefropatía Crónica del Injerto:**

**Fibrosis Intersticial/Atrofia Tubular”**

**Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica de la**

**Universidad Católica de Córdoba**

**por**

**Luciana Anahí Mas**

**Córdoba, 2016.**

**Directora de tesis: Dra. Valeria Mas**

Universidad de Virginia, USA.

**Co-Directora de tesis: Dra. Carolina Touz**

Instituto de Investigación Médica

Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba.

**Comisión de Tesis Doctoral**

**Dra. Mariana Maccioni**

Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Carla Asteggiano**

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas

Universidad Nacional de Córdoba.

Cátedra Farmacología, Facultad de Medicina,

Universidad Católica de Córdoba

**Dr. Néstor Soria**

Universidad Católica de Córdoba.

Laboratorio de Análisis Clínicos Especializados,

Córdoba.



***“A mi familia”***

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a mi directora de tesis, Dra Valeria Mas, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por su excelente supervisión y por ser una fuente constante de inspiración y apoyo durante mi proyecto. Su capacidad para guiar ha sido un aporte invaluable.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra Carolina Touz, por su disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra Teresita Alvarellos por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis, por sus consejos, por compartir su entusiasmo y pasión por la investigación y por haberme permitido llevar a cabo esta tesis en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Hospital Privado.

Para todos los miembros del Servicio de Nefrología-Programa de Trasplante Renal como también el Servicio de Patología del Hospital Privado, vayan también mis más sinceros agradecimientos.

A Patricia Barrios, por colaborar con las orinas de los pacientes trasplantados y a Natalia Peano por sus tardecitas ayudándome con el crióstato para procesar las biopsias.

A todos mis compañeros de trabajo por participar de una u otra manera y brindarme su apoyo para que esto se pudiera llevar a cabo.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, cooperación e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta tesis.

Por último, agradecer a toda la gente (amigos, conocidos, compañeros, familia) que ha entendido y compartido la alegría que este paso supone para mí.

A todos, gracias.

## ÍNDICE GENERAL

### Introducción.

#### 1. Disfunción Crónica del Aloiinjerto Renal

1.1.	Generalidades .....	2
1.2.	Trasplante Renal. El problema en números .....	2
1.3.	Disfunción Crónica del Aloiinjerto. Definición.....	3
1.3.1.	Factores asociados al desarrollo de CAD .....	3
1.3.2.	Factores inmunológicos asociados al desarrollo de CAD.....	5
1.3.3.	Factores no inmunológicos en el desarrollo de CAD.....	9
1.3.4.	Presentación clínica.....	10
1.3.5.	Patogénesis .....	10
1.3.6.	Histología .....	15
1.4.	Caracterización de las biopsias de aloinjertos renales. Clasificación Banff .....	15
1.5.	Marcadores de laboratorio. Valor del eGFR .....	18
1.6.	Tecnología en genómica .....	19
1.6.1.	Aplicación de la genómica en CAD .....	19
1.7.	Biomarcadores en trasplante renal .....	20

#### 2. Angiogénesis y su rol en la progresión a CAD

2.1.	Generalidades .....	22
2.2.	Modos de formación de vasos. Angiogénesis .....	22
2.2.1.	Angiogénesis: ramificación, maduración y quiescencia de los vasos .....	23
2.2.2.	Regulación de la angiogénesis. Factores positivos directos .....	26
2.2.3.	Regulación de la angiogénesis. Factores positivos indirectos .....	27
2.2.4.	Regulación de la angiogénesis. Factores negativos .....	30
2.2.5.	Angiogénesis e injuria por isquemia-reperfusión.....	30
2.2.6.	Injuria de isquemia-reperfusión en CAD.....	32
2.2.7.	Angiogénesis y CAD .....	32

## Objetivos.

1. Premisas .....	34
2. Hipótesis .....	35
3. Objetivos .....	35
3.1. Objetivo principal .....	35
3.2. Objetivos específicos .....	35

## Pacientes, Materiales y Métodos.

1. Diseño del estudio .....	37
1.1. Pacientes y muestras .....	37
1.2. Tejido de aloinjerto renal .....	39
1.2.1. Clasificación de las biopsias .....	39
1.2.2. Obtención de biopsias de tejido .....	39
1.2.3. Cortes de las biopsias por congelación .....	40
1.3. Obtención de muestras apareadas .....	40
1.4. Orinas .....	40
1.4.1. Recolección seriada de orinas .....	40
1.4.2. Procesamiento de las orinas .....	41
1.5. Extracción de ARN de biopsias y orinas .....	41
1.6. Control de calidad, pureza y concentración de los ARNs .....	43
1.7. Reacciones.....	44
1.7.1. Reacciones de <i>microarrays</i> .....	44
1.7.2. Transcripción Reversa .....	45
1.7.3. PCR en tiempo Real .....	46
1.8. Análisis de los resultados .....	47
1.8.1. Análisis de la expresión génica usando <i>microarrays</i> .....	47
1.8.2. Redes de interacción y análisis funcional .....	48
1.8.3. Análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real .....	48
1.9. Análisis Estadístico .....	49

## Resultados.

1. Expresión de genes asociados a angiogénesis en biopsias de pacientes trasplantados renales .....	51
1.1. Pacientes .....	51
1.1.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes .....	51
1.2. Biopsias de aloinjerto renal .....	52
1.2.1. Caracterización histológica de las biopsias en estudio .....	52
1.3. Prueba de principio: Estudio de expresión génica mediante microarrays .....	54
1.3.1. Análisis de vías canónicas (IPA) .....	55
1.4. Correlación entre los genes constitutivos .....	61
1.5. Reacciones de los genes en estudio mediante PCR en tiempo real.....	62
1.6. Sub-clasificación del grupo IF/TA .....	68
1.7. Expresión de los genes en estudio en los grupos NTA, RCA, IF/TA grado I e IF/TA grado II .....	71
1.8. Incorporación de biopsias de protocolo al estudio. Controles de aloinjerto normal.....	72
1.9. Conclusiones .....	77
2. La orina como biomarcador del status del aloinjerto renal .....	78
2.1. Muestras apareadas.....	78
2.1.1. Estudio de la expresión génica en muestras apareadas.....	79
2.1.2. Análisis de regresión lineal en muestras apareadas.....	79
2.2. Conclusiones.....	79
3. Valor predictivo de la orina en la detección temprana de los cambios que conducen a IF/TA.....	81
3.1. Modelo longitudinal .....	81
3.2. Características demográficas y clínicas de los pacientes .....	81
3.2.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes, según grupos NP y P .....	82
3.2.2. Análisis de la expresión génica en los grupos NP y P .....	85
3.2.3. Valor predictivo de la orina en la progresión a IF/TA .....	86
3.3. Conclusiones .....	90

Discusión .....91

Bibliografía ..... 104

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AN	Aloinjerto Normal
ANG1	Angiopoyetina 1
ANG2	Angiopoyetina 2
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
β2M	Beta 2 Microglobulina
C4d	Producto de la degradación del factor del Complemento C4
CAD	Disfunción Crónica del Aloinjerto
CAN	Nefropatía Crónica del Injerto
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CNI	Inhibidores de la Calcineurina
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
Ct	Ciclo Umbral
DGF	Función Tardía del Injerto
eGFR	Índice de Filtrado Glomerular estimado
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
END	Endostatina
FDR	Tasa de Falso Descubrimiento
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GAPDH	Gliceraldehido 3 Fosfato Dehidrogenasa
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HIF	Factor inducible por Hipoxia
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
I-R	Isquemia-Reperfusión
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular 1
IF/TA	Fibrosis Intersticial/Atrofia Tubular
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinasa de Matriz
NFAT-1	Factor Nuclear de Células T Activadas 1

NF-kB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NP	No Progresores
NTA	Necrosis Tubular Aguda
P	Progresores
PAI-1	Inhibidor del Activador de Plasminógeno tipo 1
P-Ang	Panel de Angiogénesis
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PRA	Panel de Anticuerpos Reactivos
PYK2	Tirosina Quinasa 2 rica en prolina
RCA	Rechazo Celular Agudo
SEL-E	Selectina E
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
TIF	Tiempo de Isquemia Fría
TR	Transcripción Reversa
TSP-1	Trombospondina 1
VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular 1
VEGF	Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular
VEGFR-	Receptor del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular
VSMC	Células de Músculo Liso Vasculares

## RESUMEN

*Fundamento:* La Disfunción Crónica del Aloiinjerto (CAD) es la causa más prevalente de pérdida tardía de injertos renales. Los cambios estructurales asociados con CAD (fibrosis intersticial/atrofia tubular, IF/TA) contribuyen a la mantención de un estado hipóxico, fundamental para la iniciación de la angiogénesis. Resultó de interés investigar el estado quiescente o angiogénico presente en CAD. El perfil de ARNm celular urinario puede contribuir a detectar y predecir el daño temprano post-trasplante.

*Pacientes:* Se estudiaron 140pacientes trasplantados renales (PTR) de quienes se obtuvieron biopsias que fueron clasificadas según los criterios Banff en Necrosis Tubular Aguda (NTA), n=48; Rechazo Celular Agudo (RCA), n=27; IF/TA, n=32. Aloiinjertos normales (AN, n=33) fueron el grupo control.

Se recolectaron orinas (n=34) a t=1, 3, 6, 9, 12 y 24 meses post-trasplante. Se agruparon los PTR según índice de filtrado glomerular estimado (eGFR) a t=12 meses en: *No Progresores* (NP, n=14, eGFR > 45 ml/min) y *Progresores* (P, n = 20, eGFR < 45 ml/min).

Once muestras apareadas (biopsia/orina) se utilizaron para evaluar su correlación.

Los niveles de expresión génica de ANG1, ANG2, PDGF, VEGF, END, TSP-1, VCAM-1, SEL-E, EGFR, TGF- $\beta$ , FGF y HGF se cuantificaron utilizando PCR en Tiempo Real. Los análisis se realizaron utilizando Test T-Student, ANOVA, correlación de Pearson y regresión lineal y logística.

*Resultados:* Se obtuvieron niveles significativamente aumentados para FGF ( $p=0,0003$ ), PDGF ( $p=0,0005$ ) y TGF- $\beta$  ( $0,0002$ ), mientras que VEGF ( $p<0,0001$ ), SEL-E ( $p<0,0001$ ), ANG1 ( $p<0,0001$ ), ANG2 ( $p<0,0001$ ) se hallaron disminuidos en IF/TA, comparado con AN. No se encontraron diferencias con los otros grupos histológicos. La correlación de muestras apareadas mostró para VEGF,  $R^2$  Aj = 0,77 ( $p=0,003$ ) y TSP-1,  $R^2$  Aj = 0,88 ( $p<0,001$ ).

En las orinas a t=3meses se encontraron TGF- $\beta$  y PDGF incrementados en P ( $p < 0,0001$  en ambos casos) y VEGF disminuido ( $p=0,0235$ ). El modelo de regresión logística múltiple mostró que las variables PDGF y TGF- $\beta$  a t=3 meses tienen la capacidad de predecir pronóstico (sensibilidad 100%, especificidad 93%).

*Conclusiones:* La angiogénesis es un mecanismo crítico en la progresión a CAD. La expresión temprana de determinados genes predice el curso del riñón trasplantado.

*Palabras Clave:* Angiogénesis, Disfunción Crónica del Injerto, Orina, Marcador no invasivo, Predicción.

## SUMMARY

*Background:* Chronic Allograft Dysfunction (CAD) is the most prevalent cause of late renal graft loss. Structural changes associated with CAD (Interstitial Fibrosis / Tubular Atrophy, IF/TA) contribute to maintaining a hypoxic state, fundamental to the initiation of angiogenesis. It was interesting to investigate the quiescent or angiogenic state present in CAD. Urine mRNA profile can help to predict the early post-transplant damage.

*Patients:* 140 kidney transplant patients (KTP) and their biopsies were classified according to Banff criteria as Acute Tubular Necrosis (ATN), n=48; Acute Cellular Rejection (ACR), n=27; IF / TA, n=32. Normal allograft (AN, n=33) were used as control group. Urines were collected (n=34) at t=1, 3, 6, 9, 12 and 24 months post-transplant. KTP were classified at t=12 months according to estimated glomerular filtration rate (eGFR) as Non-Progressors (NP, n=14, eGFR>45 ml / min) and Progressors (P, n=20, eGFR<45 ml / min). Eleven paired samples (biopsy / urine) were used to evaluate their correlation. Gene expression levels of ANG1, ANG2, PDGF, VEGF, END, TSP-1, VCAM-1, SEL-E, EGFR, TGF- $\beta$ , FGF and HGF were quantified using Real-Time PCR (QPCR). Analyses were performed using Student T-test, ANOVA, Pearson correlation, and logistic regression.

*Results:* FGF (p=0.0003), PDGF (p=0.0005) and TGF- $\beta$  (p=0.0002) significantly increased levels were obtained, while VEGF (p<0.0001), SEL-E (p<0.0001), ANG1 (p<0.0001) and ANG2 (p<0.0001) were found decreased in IF / TA compared with AN. There were no differences with the other histological groups. Paired samples correlation showed VEGF, Adj R<sup>2</sup>=0.77 (p=0.003) and TSP-1, Adj R<sup>2</sup>=0.88 (p<0.001). In urine at t=3 months, TGF- $\beta$  and PDGF were increased in P (p<0.0001 both) and VEGF decreased (p=0.0235). A multiple logistic regression model showed that PDGF and TGF- $\beta$  in urine at t=3 months can to predict prognosis (sensitivity 100%, specificity 93%).

*Conclusions:* Angiogenesis is a critical mechanism in CAD progress. QPCR data generated from urine samples show that early expression of PDGF and TGF- $\beta$  genes predicts the transplanted kidney course.

**Key words:** Angiogenesis, Chronic Allograft Dysfunction, urine, non-invasive marker, prediction.

# Introducción

## 1. Disfunción Crónica del Aloiinjerto Renal.

### 1.1. Generalidades.

La ciencia del trasplante renal ha progresado considerablemente en el último medio siglo, en gran parte debido a las mejoras en el entendimiento del rol del sistema inmune en el rechazo del aloinjerto, el desenredo de los mecanismos moleculares subyacentes al rechazo y el mejor manejo de la inmunosupresión (1, 2). Sin embargo, a pesar de las mejoras en los resultados tempranos del trasplante, la sobrevida del injerto a largo plazo continúa siendo pobre.

En la década pasada, la sobrevida del aloinjerto a 10 años en Estados Unidos era del 51% en receptores de donante cadavérico y 68% en receptores de donantes vivos (3,4). Las dos causas más comunes de pérdida del injerto a largo plazo siguen siendo la muerte con injerto funcionando debido a enfermedades cardiovasculares y la **Disfunción Crónica del Aloiinjerto (CAD**, según sus siglas en inglés) (5). El deterioro crónico de los aloinjertos normales es una entidad clínica y patológica que es mediada por muchos mecanismos y hasta el momento carece de terapia específica (6).

### 1.2. Trasplante Renal. El problema en números.

El trasplante renal es el tratamiento de elección en la enfermedad renal crónica terminal y es considerado como el *"Gold Standard"* o método de referencia en cuanto a terapias de reemplazo. Los resultados en trasplante de órganos sólidos han avanzado significativamente durante las últimas dos décadas. Las mejoras en los regímenes de inmunosupresión han reducido los índices de rechazo agudo (7); el diagnóstico y tratamiento de las complicaciones infecciosas como los protocolos de profilaxis han permitido a los receptores de trasplante tolerar terapias inmunosupresoras más intensas (8). Sin embargo, las mejoras sustanciales en la sobrevida a largo plazo se han convertido en una meta difícil de alcanzar. Esto queda demostrado en el trabajo de Meier-Kriesche HU y col. (7), donde se analizaron 57961 trasplantados renales con donante cadavérico y 19976 con donante vivo, en el periodo comprendido entre 1988 y 1995 (base de datos del Registro de Trasplante Renal científico de los Estados Unidos, SRTR), con el fin de examinar los efectos a largo plazo del trasplante sobre los resultados de los pacientes. La sobrevida global del injerto mostró vidas medias relativamente similares entre los pacientes que trasplantaron en 1988

comparados con los que trasplantaron en 1995. En el año 2004 se hizo evidente que las mejoras generales en la sobrevida del injerto después del trasplante renal fueron realmente impulsadas por las mejoras en la sobrevida dentro del primer año, mientras que a largo plazo se mantuvo prácticamente sin cambios durante décadas. Resulta indiscutible que nuevas mejoras en la sobrevida a largo plazo deben aparecer a través de mejoras en el mantenimiento del injerto a largo plazo.

En el reporte de Lamb KE y col. del año 2011, se describió la sobrevida de 252910 pacientes que recibieron un trasplante renal entre 1989 y 2009 en los Estados Unidos (9). Las vidas medias de los trasplantes con donante cadavérico fueron de 6,6 años en 1989 e incrementó a 8 años en 1995, y permaneció con ese valor hasta el 2000. Posteriormente, en 2005 la sobrevida llegó a una media de 8,8 años. Ambos reportes demuestran que el progreso significativo que tuvo lugar en trasplante renal ha sido conducido principalmente por mejoras en la sobrevida del injerto a corto plazo, mientras que los resultados a largo plazo mejoran muy lentamente.

### **1.3. Disfunción Crónica del Aloinjerto (CAD): Definición.**

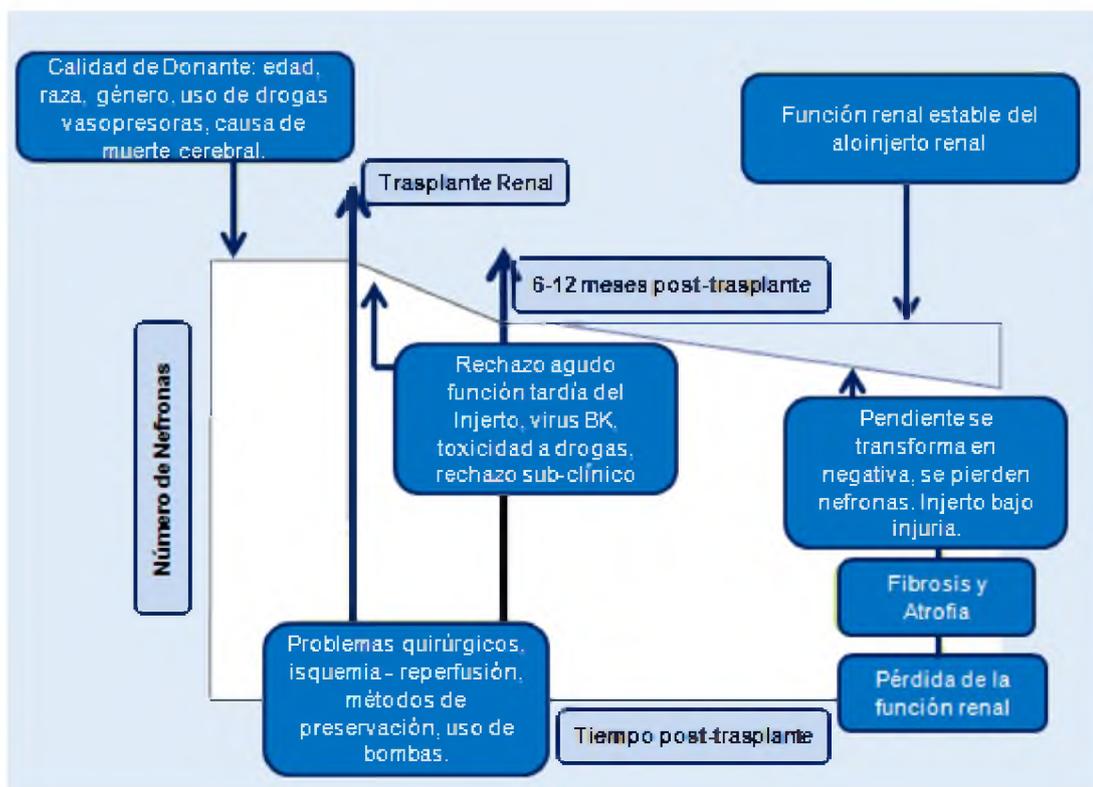
Los receptores de aloinjerto renal, especialmente aquellos que recibieron un órgano proveniente de donante cadavérico, frecuentemente padecen un deterioro lento de la función renal o CAD (10). CAD es definida como deterioro funcional y morfológico del aloinjerto renal luego de 3-6 meses de trasplante. Según los criterios Banff, CAD abarca cambios histológicos como Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular (IF/TA), glomeruloesclerosis, engrosamiento de la membrana basal capilar y/o hiperplasia vascular intimal (11). Es la causa más prevalente de pérdida tardía de injertos, con una patogénesis compleja, multifactorial y no completamente comprendida (12).

#### **1.3.1. Factores asociados al desarrollo de CAD.**

La pérdida de injertos luego del primer año de trasplante puede ser debido a factores combinados que pueden incluir factores inmunológicos y no-inmunológicos (13, 14). La biopsia de un trasplante renal con falla crónica usualmente muestra cambios terminales no específicos, por lo que la contribución relativa de enfermedad pre-existente en el aloinjerto y factores inmunológicos y no inmunológicos son difíciles de distinguir. Además, un gran

número de factores de riesgo clínicos han sido correlacionados con fallo del injerto renal (15,16).

La masa nefronal original presente en el injerto al momento del trasplante es mayormente dependiente de la calidad del donante. Se estima que entre el 35 y 45% en la variabilidad de la función temprana del injerto depende de factores asociados al donante (17). Luego del trasplante renal, y como consecuencia del procedimiento quirúrgico, métodos de preservación, isquemia, rechazo agudo y otros factores de estrés, el número inicial de nefronas en el riñón del donante puede reducirse. Usualmente, 6 meses luego del trasplante, el número de nefronas permanece constante, resultando en un aloinjerto con función normal. Sin embargo, para un número sustancial de aloinjertos, la pérdida de nefronas continua, reflejando injuria permanente sobre el injerto (Figura 1.1). Esta condición lleva a fibrosis y atrofia, con el evento final de pérdida de función del aloinjerto. Es poco claro por qué ciertos riñones mantienen una función estable y otros evolucionan hacia la injuria con la inevitable progresión a fibrosis y CAD con IF/TA (18).



**Figura 1.1: Línea de tiempo del Trasplante Renal.** La función a largo plazo y el fallo del riñón trasplantado reflejan la injuria acumulada total, resultante de mecanismos inmunes y no inmunes que causan estrés e inflamación en el tejido renal, llevando en el curso del tiempo a la fibrosis intersticial crónica y atrofia tubular. Modificado de Mas VR y col, 2010 (18).

### 1.3.2. Factores Inmunológicos asociados al desarrollo de CAD.

- Las moléculas de histocompatibilidad fueron inicialmente descubiertas por ser las principales responsables de las reacciones de rechazo de tejidos trasplantados entre individuos de la misma especie. Los *loci* genéticos reguladores de las síntesis de esos antígenos se agrupan en una región denominada “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (CMH) y se consideran los más polimórficos dentro del genoma humano (19).

El CMH, en humanos denominado HLA (*Human Leukocyte Antigen*, según sus siglas en inglés), contiene los genes de clase I que serán expresados por todas las células somáticas (20). En contraste, los genes de clase II son normalmente expresados por un subgrupo de células inmunes denominadas Células Presentadoras de Antígeno (CPA) que incluyen células B, células T activadas, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales tímicas (21). La función de ambas clases de moléculas, I y II, es la presentación de péptidos pequeños a las células T, un proceso que inicia la respuesta inmune adaptativa (22).

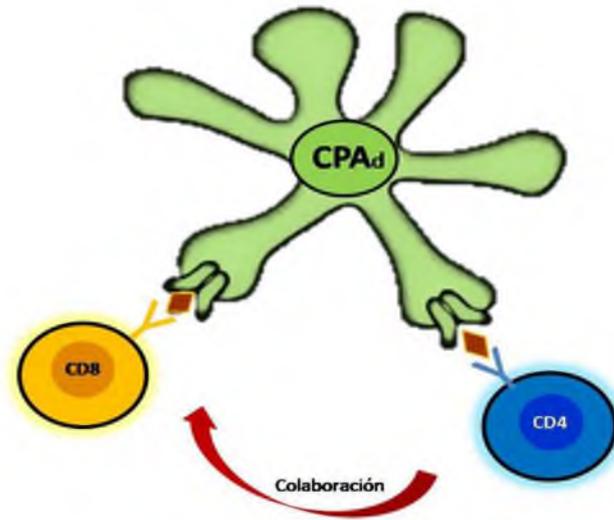
- *Missmatch HLA*. Ha sido demostrado que el menor número de *missmatches* reduce el riesgo de rechazo y el fallo del aloinjerto en trasplante de órgano sólido (23). Por definición, el “cero missmatch” se define como los antígenos de histocompatibilidad encontrados en el donante que están presentes en la tipificación de antígenos de histocompatibilidad del receptor (24).

- Vías de Alorreconocimiento. Las tres vías de presentación de aloantígenos pueden contribuir separadamente o en conjunto para mediar el rechazo del trasplante, llevando a CAD (23).

*Alorreconocimiento* es el término utilizado para definir el reconocimiento inmunológico de antígenos histoincompatibles entre individuos genéticamente distintos de la misma especie. En el contexto del trasplante, la consecuencia del alorreconocimiento es la iniciación de una respuesta inmune adaptativa con reclutamiento de células T. Esta respuesta es conocida como *alorrespuesta* (26). Existen tres vías de alorreconocimiento descriptas.

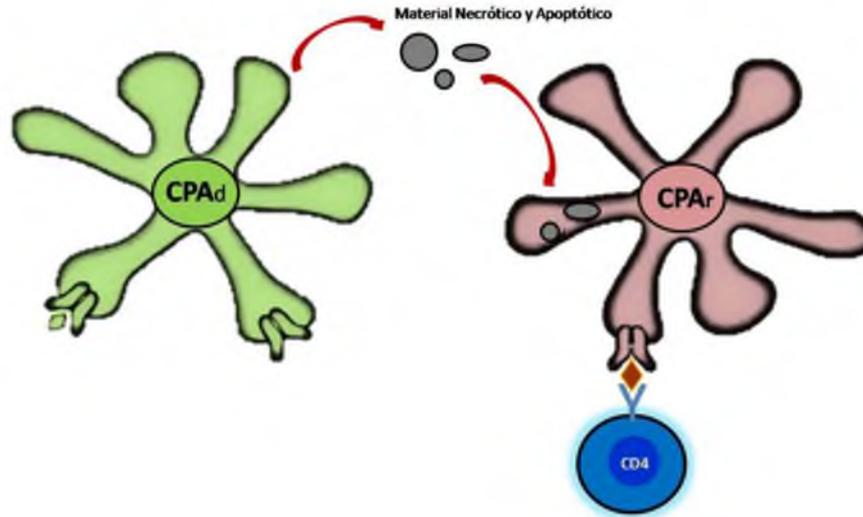
*Alorreconocimiento Directo*. La vía directa es el mecanismo por el cual las células T del receptor reconocen determinantes antigénicos sobre los CMH-péptido, expuestas sobre la superficie de células trasplantadas, sin el requerimiento del procesamiento antigénico por la CPA del receptor (27)(Figura 1.2). Bajo la influencia de señales pro-inflamatorias generadas por el procedimiento del trasplante, las células dendríticas del donante migran

hacia los tejidos linfoides secundarios del receptor e inician la respuesta directa en estos sitios (28, 29).



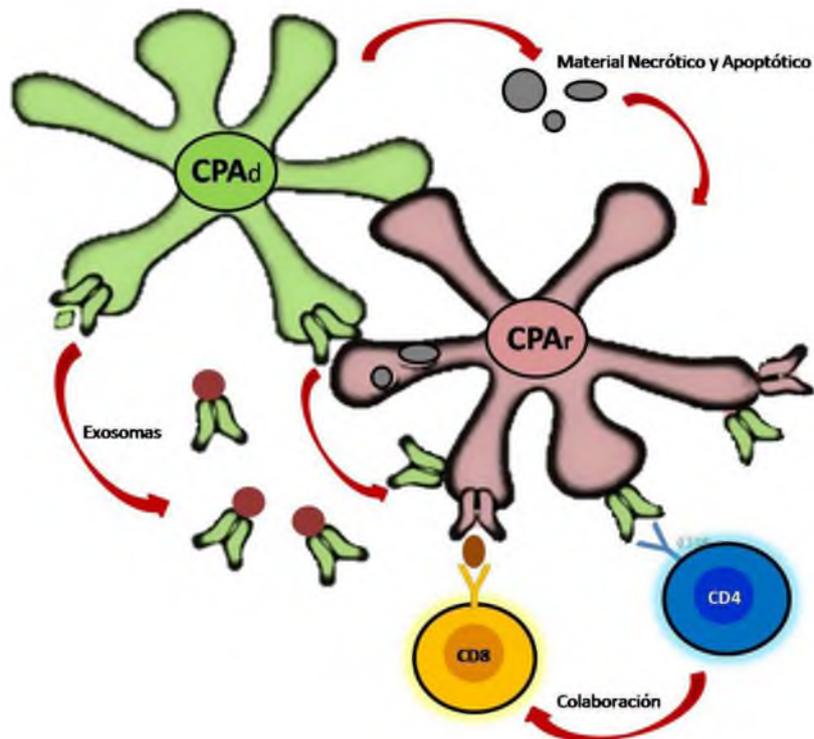
**Figura 1.2: Vía de Alorreconocimiento Directa.** Reconocimiento del CMH intacto sobre la CPA del donante por parte de los linfocitos T del receptor. Modificado de Afzali B y col., 2008 (26).

*Alorreconocimiento Indirecto.* La vía indirecta de alorreconocimiento es más representativa de cómo el sistema inmune típicamente reconoce un antígeno. Las células T reconocen los antígenos del donante que han sido procesados y presentados en el contexto del CMH propio sobre la CPA del receptor (30) (Figura 1.3). La presentación indirecta de aloantígenos, en el contexto del CMH clase II propio, invariablemente resulta en alorespuestas que son dominadas por células T CD4<sup>+</sup>. Como las células T colaboran con las células B en el cambio de clase de inmunoglobulinas y diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, la presencia de aloanticuerpos es indicativa de ayuda provista por la vía indirecta de células T (26).



**Figura 1.3: Vía de Alorreconocimiento Indirecta.** Presentación del CMH alogénico procesado, proveniente de células del donante. La CPA del receptor representa los péptidos procesados en el contexto del CMH clase II propio a los linfocitos T CD4+. Modificado de Afzali B y col., 2008 (26).

*Alorreconocimiento Semi-directo.* Las células dendríticas son capaces de adquirir complejos CMH-peptídico intactos derivados de otras células dendríticas y células endoteliales, y presentarlas a células T alorreactivas (31, 32). Esta observación es el fundamento de la vía semi-directa de alorreconocimiento, la cual propone que la CPA del receptor adquiere complejos CMH-peptídicos alogénicos intactos a través de la transferencia de CMH (que estimulan células T CD8+ a través de la vía directa), como así también presentan péptidos de antígenos alogénicos de histocompatibilidad de material celular necrótico fagocitado (el cual es internalizado, procesado y presentado por el propio CMH clase II a través de la vía indirecta a células T CD4+) (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Vía de Alorreconocimiento Semi-Directa.** El contacto célula-célula entre las CPA del donante y receptor permite transferir componentes intactos de la membrana, incluyendo el alo-CMH. La CPA del donante puede liberar endosomas conteniendo el CMH intacto, el cual se fusiona con la membrana de la CPA del receptor. Modificado de Afzali B y col., 2008 (26).

- **Presentación Aloantigénica.** La forma más común de rechazo agudo del aloinjerto es iniciado cuando los aloantígenos del donante son presentados a los linfocitos T del receptor mediante CPAs. Las células dendríticas inmaduras dentro del injerto llevan antígenos del donante desde el órgano trasplantado hasta los nódulos linfáticos y bazo del receptor (33). Las CPA del receptor circulan a través del injerto, viajan hacia los órganos linfoides donde activan a las células T, las cuales se diferencian en varios subgrupos y retornan al aloinjerto donde toman parte en la destrucción del órgano trasplantado. La sensibilización puede ocurrir en la periferia o en los órganos linfáticos terciarios que se desarrollan dentro del órgano trasplantado (34). Inicialmente, solo pocas células T reconocen antígenos indirectamente, pero la vía indirecta se convierte cada vez más importante en la injuria inmune al aloinjerto a largo plazo, luego que las CPA del donante han desaparecido (35).

- **Anticuerpos Preformados.** El panel de anticuerpos reactivos o PRA ha sido utilizado para medir la sensibilización de un paciente a las moléculas HLA, desde que los anticuerpos donante específicos preformados se asociaron con rechazo hiperagudo en

trasplante renal. PRA se refiere al porcentaje de células de ciertos donantes contra las cuales reacciona el suero del paciente (36). El impacto perjudicial de los anticuerpos anti-HLA citotóxicos que se desarrollan luego del trasplante es otro factor que soporta la participación inmunológica en CAD (37).

### 1.3.3. Factores no inmunológicos en el desarrollo de CAD.

La mayoría de los aloinjertos fallan luego de un período de disminución de la función, los compartimentos histológicos son representados por glomeruloesclerosis, atrofia tubular, fibrosis intersticial y arterioesclerosis (38). Los principales factores no inmunológicos incluyen muerte cerebral en el donante, injuria de isquemia-reperfusión, toxicidad por inhibidores de la calcineurina, hipertensión, diabetes mellitus (post-trasplante o pre-existente), hiperlipidemia, infección por citomegalovirus, entre otros (39).

La *edad del donante* es un factor importante en el desarrollo de CAD. Se hipotetiza que el desarrollo de injuria crónica del aloinjerto puede estar asociada a senescencia replicativa. La hipótesis de la senescencia se basa en el agotamiento celular que conduce a la disfunción endotelial y epitelial con atrofia y, por consiguiente, persistencia del estímulo profibrótico (40).

La *muerte cerebral* es frecuentemente asociada con hipotensión severa, incremento en catecolaminas, anormalidades de electrolitos e hipertensión intracraneal que puede favorecer la sobreproducción de citoquinas y factores de crecimiento que llevan a la sobreexpresión de aloantígenos sobre las células tubulares y endoteliales (41).

La *isquemia del tejido y la reperfusión* representan una interacción compleja entre factores bioquímicos, celulares, vasculares endoteliales y específicos de tejido. La injuria de isquemia-reperfusión ha demostrado causar injuria endotelial con la consecuente sobre-regulación de moléculas de adhesión e infiltrados de leucocitos y por consiguiente crea un estado proinflamatorio y profibrótico dentro del injerto (42).

La *hipertensión* es frecuente entre los receptores de trasplante renal y puede ser observada aun comenzando desde la primera semana luego del trasplante, donde las dosis de agentes inmunosupresores como esteroides e inhibidores de la calcineurina son usualmente altos (43). La prevalencia de hipertensión en la era pre-ciclosporina osciló entre 40 y 60% y luego de la introducción de ciclosporina en la mitad de 1980, incrementó a 80-90% (44). El uso de bloqueantes de canales de calcio es frecuentemente considerado una

terapia de primera línea, especialmente tempranamente luego del trasplante, debido a que son efectivos en contrarrestar los efectos de vasoconstricción de altas dosis de inhibidores de la calcineurina dados en el periodo peri-trasplante (45).

La prevalencia de *proteinuria* en receptores de trasplante renal oscila entre 10 y 25% (44). Las causas principales de proteinuria persistente luego del trasplante renal son la injuria crónica del injerto, glomerulonefritis crónica y nefrotoxicidad asociada a drogas. Independientemente de su origen, la proteinuria representa un factor de riesgo para la pérdida del aloinjerto (46). Ciertamente, no sólo es un marcador de injuria renal progresiva, sino que también contribuye a la progresión de la disfunción renal y fibrosis a través de la absorción de proteínas aberrantes del túbulo proximal y toxicidad directa en la célula tubular (47).

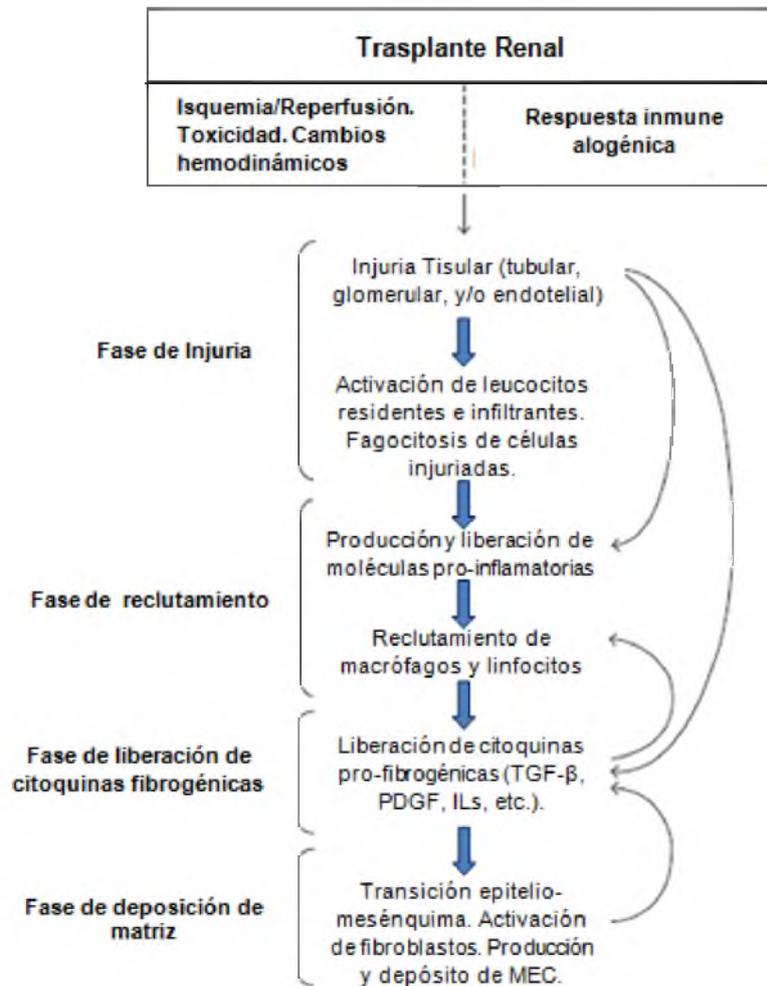
La *toxicidad por drogas inmunosupresoras*, especialmente por inhibidores de la calcineurina (CNIs) es quizás una de las causas que llevan a CAD. Esto indica que la elección de terapia inmunosupresora tiene además un impacto considerable en los resultados a largo plazo. La combinación de CNIs con esteroides ofrece una inmunosupresión potente, pero también puede causar efectos adversos llevando a una disfunción progresiva del injerto o un incremento en el riesgo de muerte (48-50). Tanto ciclosporina como tacrolimus pueden causar vasoconstricción renal y sistémica, a través de un incremento en la liberación de endotelina-1, activación del sistema renina-angiotensina, producción incrementada de tromboxano A y disminuida producción de vasodilatadores como óxido nítrico y prostaciclina (51).

#### **1.3.4. Presentación clínica.**

Clínicamente CAD se manifiesta como un deterioro progresivo en la función renal con proteinuria asociada y declinación en el índice de filtrado glomerular, en ausencia de otra patología específica (52). En el 80% de los pacientes luego del diagnóstico histológico de CAD, la caída de la función renal sigue una relación lineal entre la creatinina sérica y el tiempo (53). Debido a estos fuertes indicadores clínicos, el diagnóstico de CAD es realizado puramente luego de los hallazgos histológicos.

### 1.3.5. Patogénesis

La injuria crónica implica un proceso inflamatorio de múltiples estadios con infiltración de células inflamatorias, activación de fibroblastos y mesangio, transición epitelio-mesénquima, apoptosis celular y expansión de la matriz extracelular que es organizada por una red de citoquinas/quimoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y procesos de señalización (54, 55) (Figura 1.5).



**Figura 1.5: Fibrosis en trasplante renal.** Implica un proceso multifactorial complejo con participación e interacción de células infiltrantes con diferentes tipos celulares en el riñón. Participan citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y procesos de señalización. Estos eventos incluyen múltiples fases en un proceso dinámico en el cual muchos de ellos ocurren simultáneamente.

*Activación de la célula endotelial.* Los factores aloinmunes y no aloinmunes resultan en la activación del endotelio vascular del injerto que resulta en la retracción endotelial, inducción de un estado procoagulante, liberación de citoquinas proinflamatorias, expresión

de moléculas de adhesión, activación de leucocitos en el sitio de la injuria y vasoconstricción (56). La activación del endotelio desencadena una cascada de eventos que, a través de la coagulación, pérdida de capilares y vasoconstricción, llevan a la disfunción vascular y finalmente a la pérdida del órgano. El endotelio activado secreta receptores de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), quimoquinas (IL-8, MCP-1), proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ /1 $\beta$ ) y factores de crecimiento (PDGF, TGF- $\beta$ ) (54).

*Infiltración leucocitaria.* El eflujo de citoquinas proinflamatorias aumenta la migración y localización de neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos T en el sitio de la injuria endotelial. Adicionalmente, el ambiente alterado por citoquinas incrementa la expresión de moléculas de adhesión (Selectina-E, ICAM-1, VCAM-1) y de moléculas del CMH clase I y II. Los leucocitos se adhieren firmemente mediante moléculas de la familia de las integrinas e ICAM-1. Existe evidencia de que la naturaleza de células T colaboradoras circulantes / infiltrantes pueden contribuir a la progresión de CAD. Desafortunadamente, hay contradicciones acerca de cuál subconjunto de células T está asociado a la generación de CAD y cuál juega un rol protector (57).

Los macrófagos secretan receptores de citoquinas profibróticas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PDGF, FGF, TGF- $\beta$ ) y proteínas de matriz. Las citoquinas liberadas por estas células y el endotelio activado inducen un cambio fenotípico en las células efectoras de CAD resultando en acumulación de MEC característica (58).

*Células Efectoras.* Las células efectoras principales que median la fibrosis y el depósito de matriz extracelular son las células mesenquimales, que se denominan células mesangiales en el glomérulo, fibroblastos y pericitos en el intersticio y células vasculares de músculo liso en los vasos. Estas células pueden estar afectadas directamente o responder a un estímulo parácrino (59). En respuesta a un ambiente de citoquinas alterado, ciertas células claves efectoras sufren un cambio fenotípico. Las células musculares lisas vasculares quiescentes, contráctiles, se convierten en células migratorias; las células mesangiales en el glomérulo son activadas y los fibroblastos intersticiales son estimulados a convertirse en miofibroblastos (60-62).

Las vías que contribuyen a la injuria podocitaria y glomeruloesclerosis incluyen al Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) (63), entre otros. Las células musculares lisas vasculares en respuesta a PDGF migran a la íntima, proliferan y secretan proteínas de la MEC, como colágeno tipo I, elastina, laminina, fibronectina y metaloproteinasas de la matriz (MMPs), las cuales facilitan aún más la migración de las

células musculares lisas vasculares (64, 65). Las células mesangiales son las células efectoras directas responsables de la deposición de MEC y el desarrollo de glomeruloesclerosis durante la injuria (66, 67) (Figura 1.6). Al igual que las células endoteliales glomerulares, las células mesangiales tienen un alto potencial de regeneración con el mesangio periglomerular como una importante fuente de renovación mesangial (68). La producción de MEC por células mesangiales glomerulares es regulada por los efectos parácrinos y autócrinos de las citoquinas IL-1, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (69-71).

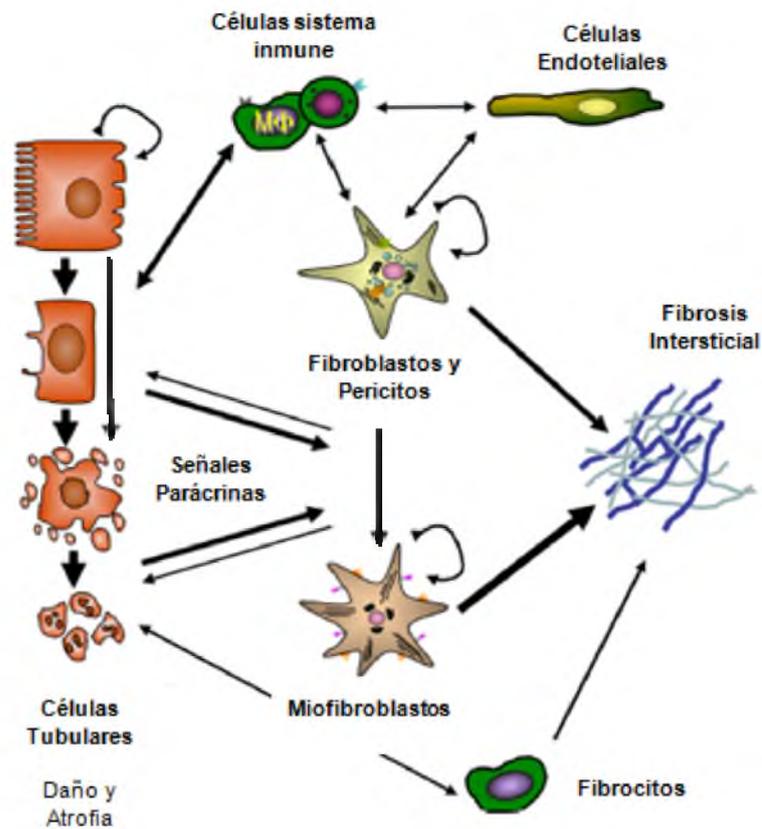


**Figura 1.6: Mecanismos celulares involucrados en la fibrosis glomerular.** Panel izquierdo: Glomérulo normal con B) Cápsula de Bowman, P) Podocitos; C) Capilares; M) Mesangio. Panel Central: el estrés de las células glomerulares ya sea mediado por células inflamatorias (verde) que hacen rodamiento sobre el endotelio activado o vía injuria directa de podocitos, células endoteliales o de mesangio resultan en su activación e inducción de un intercambio recíproco entre estas células, perpetuando la injuria. Panel derecho: el daño progresivo resulta en el depósito exagerado de MEC y en la obliteración de los capilares glomerulares, así como también en la formación de un puente celular sólido entre penacho glomerular y la cápsula de Bowman. Extraído y modificado de Boor P y col., 2015 (59).

Durante CAD, los fibroblastos intersticiales cambian el fenotipo y se convierten en miofibroblastos (Figura 1.7). Éstos se caracterizan por su expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), y han sido encontrados en abundancia en los estudios histológicos de aloinjertos con CAD (72, 73). Son potentes secretores de colágeno, PDGF y TGF- $\beta$  (74), y su presencia continua puede deberse a la trans-diferenciación de las células epiteliales tubulares o activación persistente de los fibroblastos intersticiales como consecuencia de la prolongada tubulitis asociada con CAD (75).

El sello distintivo en la etiología de CAD es la acumulación de MEC, la cual puede ocurrir en el intersticio, íntima del endotelio vascular o en el glomérulo, causando las lesiones características. El exceso de MEC depositada es de composición diferente a la normalmente encontrada en el riñón y además cambia de acuerdo a los estadios de CAD

(76). La MEC es un sistema dinámico de proteínas bajo degradación y síntesis continua. En estados patológicos, la homeostasis normal de la MEC se altera resultando en una acumulación neta de matriz con la consecuente fibrosis. Las alteraciones en los mecanismos por los cuales se regula la MEC son fundamentales en la generación de CAD. La homeostasis de la MEC es dependiente de MMPs y factores de crecimiento (77).



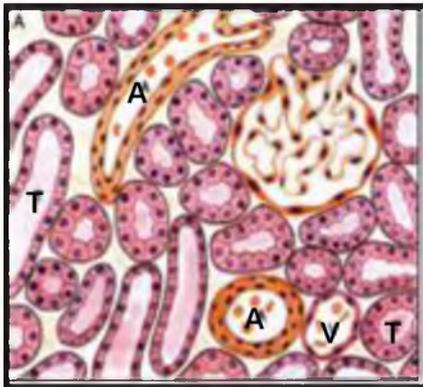
**Figura1.7: Células involucradas en IF/TA.** Virtualmente todas las células túbulo-intersticiales están involucradas en la patogénesis de la fibrosis intersticial, es decir, en el depósito y la alteración de la matriz extracelular. Las células principales responsables de la fibrosis intersticial son los fibroblastos, pericitos, miofibroblastos y potencialmente los fibrocitos. El tipo de célula residente más sensible al estrés probablemente sea la célula tubular. La atrofia tubular y el daño llevan a una señalización parácrina profibrótica y afluencia de células inflamatorias. Otros tipos de células, como las células endoteliales, también reaccionan a la injuria, sin embargo, estos cambios no son tan fácilmente medidos y visibles. La comunicación recíproca entre todas las células participantes existe, y además se encuentra bien documentada. En medio de varias células del sistema inmune, ya sean residentes o infiltrantes, el rol de los macrófagos en fibrosis es contundente mientras no se sabe demasiado o la información es controvertida cerca de células dendríticas, células T y otros linfocitos o mastocitos. Extraído y modificado de Boor P. y col, 2015 (59).

### **1.3.6.Histología.**

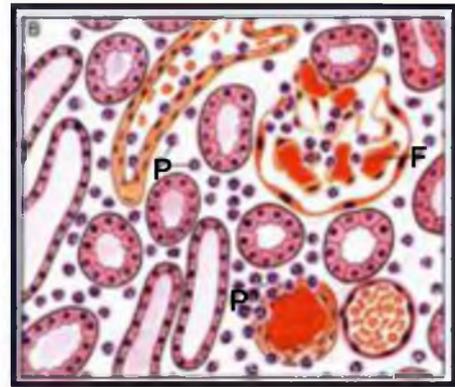
CAD es asociada con una variedad de cambios fibrosantes/esclerosantes en el aloinjerto. El glomérulo puede presentar un aumento progresivo de la matriz y/o desarrollar esclerosis segmentaria o global. Puede haber un engrosamiento en la íntima arterial por fibrosis y acumulación de material hialino en arterias pequeñas y arteriolas. Los capilares peritubulares desarrollan multilaminación de la lámina basal y se encuentra engrosamiento de las paredes de los capilares glomerulares con reduplicación de la membrana basal e interposición mesangial. Puede ser progresivo el incremento en la matriz intersticial, resultando en fibrosis intersticial con progresiva atrofia tubular, un acompañamiento casi inevitable (78, 79).

### **1.4. Caracterización de las biopsias de aloinjertos renales. Clasificación Banff.**

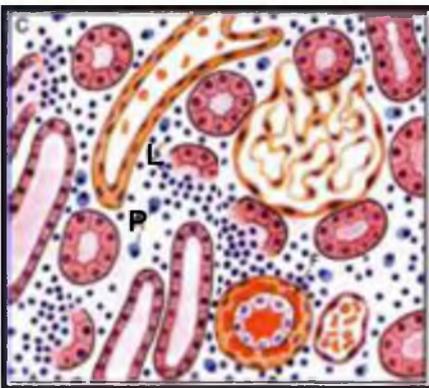
Hasta los inicios de la de cada del '90, el rechazo del aloinjerto renal fue clasificado dentro de tres posibles tipos: hiperagudo, agudo (con la variante "agudo acelerado") y crónico (Figura 1.8) (80). Sin embargo, hubo heterogeneidad considerable entre patólogos en la caracterización de las biopsias de aloinjerto renal. Por lo tanto, se consideró que la estandarización era necesaria para guiar la terapia y ayudar a establecer un corte objetivo en ensayos clínicos. Así, un grupo de patólogos, nefrólogos, y cirujanos de trasplante se reunieron en Banff, Canadá, en 1991, para formular un esquema de nomenclatura y clasificación de la patología del aloinjerto renal.



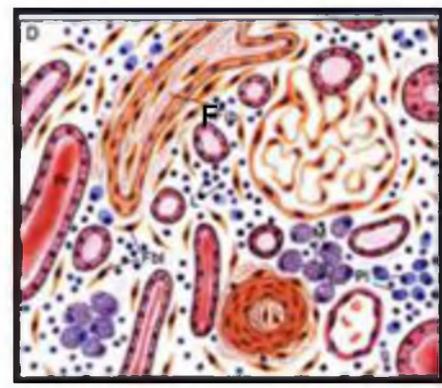
**A) Aloiinjerto Normal**



**B) Rechazo Hiperagudo**



**C) Rechazo Celular Agudo**



**D) Disfunción Crónica del Injerto**

**Figura 1.8: Representación esquemática de la histología renal normal y en los diferentes tipos de rechazo al injerto.** A) Riñón normal B) Rechazo Hiperagudo: Polimorfonucleares (PMN) en endotelio arteriolar (P), capilares glomerulares y peritubulares, Inmunoglobulinas y complemento en paredes vasculares, micro trombos glomerulares, necrosis fibrinoide de paredes arteriales (F), C) Rechazo Celular Agudo: Edema intersticial e infiltración inflamatoria (linfocitos pequeños, medianos y escasos grandes CD4+ y CD8+ (L), células plasmáticas (P), hemorragias intersticiales focales, capilares glomerulares y peritubulares con infiltración perivascular, vasculitis necrotizante: PMN, Ig, C', fibrina, trombosis, necrosis glomerular, trombosis de arteriolas corticales e infarto cortical. Vasculitis sub-aguda. D) Disfunción Crónica del Injerto (IF/TA): Fibrosis densa de la íntima (degeneración hialina vascular) de arterias corticales, isquemia renal: obsolescencia glomerular y fibrosis intersticial (F), atrofia tubular (disminución del parénquima), ocasionalmente arteritis aguda, infiltración mononuclear intersticial menos intensa que en rechazo agudo.

En la histopatología, las biopsias de aloinjertos renales se clasificaron en: normal, rechazo hiperagudo, rechazo agudo en las formas celular y mediado por anticuerpos y rechazo crónico, nefropatía crónica del injerto o CAD con IF/TA.

*Rechazo Hiperagudo:* La causa del mismo es la pre-sensibilización del receptor a aloantígenos expresados sobre la superficie del endotelio del injerto (81), como ABO, anti-HLA clase I, anti-HLA clase II y antígenos presentes en la superficie de la célula endotelial. La unión del anticuerpo al endotelio activa complemento, y el anticuerpo conjuntamente con el complemento induce un gran número de cambios en el endotelio del injerto que promueven la trombosis intravascular. Actualmente, el rechazo hiperagudo del aloinjerto es usualmente mediado por anticuerpos IgG dirigidos contra aloantígenos proteicos que surgen como resultado de exposiciones previas a aloantígenos a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes previos o múltiples embarazos. Si el título de estos anticuerpos alorreactivos es bajo, el rechazo hiperagudo puede desarrollarse lentamente, durante varios días. En este caso, es referido como rechazo acelerado del aloinjerto, debido a que el comienzo es más temprano que el típico para rechazo agudo (23).

*Rechazo Agudo:* El rechazo agudo es un proceso de injuria vascular y parenquimal mediada por células T y anticuerpos. Los linfocitos T juegan un rol central en el rechazo agudo, respondiendo a los aloantígenos como moléculas del CMH presentes sobre el endotelio vascular y células parenquimales. Las células T activadas causan la muerte directa de las células del injerto o producen citoquinas que reclutan y activan células inflamatorias las cuales producen injuria sobre el injerto. En órganos vascularizados como el riñón, las células endoteliales son los blancos principales del rechazo agudo.

Según el mecanismo efector, el rechazo agudo puede clasificarse en rechazo celular o humoral.

*a- Rechazo celular agudo (RCA).* En la examinación histológica, este tipo de rechazo es caracterizado por infiltrado de linfocitos que invaden y destruyen componentes del injerto. Los infiltrados celulares son marcadamente enriquecidos en células CD8+ citotóxicas. La presencia de ARNm que codifica para genes específicos de linfocitos T citotóxicos (ej., granzima B y perforina) fue utilizado como un indicador sensible y específico de rechazo agudo clínico. Además de la muerte directa de las células del injerto por las células T citotóxicas, los linfocitos T colaboradores CD4+ activados y CD8+ citotóxicos, producen citoquinas que reclutan y activan células inflamatorias, las cuales también dañan el injerto. En injertos vascularizados como el riñón, las células endoteliales son los principales targets del rechazo agudo (82, 23).

*b- Rechazo agudo mediado por anticuerpos.* Los aloanticuerpos causan rechazo agudo uniéndose a antígenos, principalmente moléculas HLA, sobre células vasculares endoteliales, causando injuria endotelial y trombosis intravascular que resultan en la destrucción del injerto. Además, los aloanticuerpos unidos a la superficie endotelial pueden

alterar directamente la función endotelial induciendo señales intracelulares que incrementan la expresión en la superficie de moléculas pro-inflamatorias y pro-coagulantes. La identificación inmunohistoquímica del fragmento del complemento C4d en capilares de aloinjertos renales, es utilizada clínicamente como indicador de la vía clásica del complemento y rechazo humoral (81).

El *rechazo crónico, Nefropatía Crónica del Injerto o IF/TA*: se desarrolla insidiosamente durante meses o años y puede o no ser precedido de episodios de rechazo agudo. La lesión dominante del rechazo crónico en injertos vascularizados es la oclusión arterial como resultado de la proliferación de células musculares lisas intimaes, y el injerto eventualmente falla principalmente debido al daño isquémico resultante. La inflamación, especialmente cuando se asocia con fibrosis en las biopsias renales de protocolo, es un factor de riesgo para el fracaso del trasplante a largo plazo (83). La clasificación de Banff introdujo la categoría 'Nefropatía Crónica del Aloinjerto' (CAN) como un correlato anatomo-patológico de CAD. Los cambios crónicos en el intersticio (ci), túbulos (ct), vasos (cv), y glomérulos (cg) fueron igualmente clasificados en 0, 1, 2, y 3. La gravedad de la fibrosis intersticial y atrofia tubular, como también la glomerulopatía crónica del trasplante y vasculopatía fueron utilizadas para clasificar CAN en leve, moderada y severa.

En la 8<sup>va</sup> Conferencia Banff del año 2005 se procedió a eliminar del término CAN debido a que no es una entidad homogénea. Es el resultado final de varios procesos injuriosos en el glomérulo, túbulo intersticio y compartimentos microvasculares, resultando en fibrosis y atrofia tubular. Las causas pueden presentarse de manera simple o en combinación. En lugar de encontrar la causa exacta de fallo, el reporte de la biopsia debe decir "fibrosis intersticial y atrofia tubular sin evidencia de causa específica" (11).

### **1.5. Marcadores de laboratorio. Valor del eGFR.**

El descenso progresivo en la función renal medido mediante creatinina sérica o el desarrollo evidente de proteinuria, son los primeros indicadores que alertan la presencia de CAD. La evaluación de gran cantidad de datos de registros, sin embargo, han demostrado que la creatinina sérica tiene un bajo valor predictivo para la pérdida posterior del injerto. Un solo rango de referencia para creatinina sérica puede ser engañoso y frecuentemente subestima el deterioro de la función renal, especialmente a un eGFR entre 30 y 70 ml/min/m<sup>2</sup> (84).

La evolución de la función renal a los 3 meses post-trasplante medido mediante eGFR, ha demostrado ser más predictivo de la pérdida de la función del injerto que la creatinina sérica, con un deterioro de la función renal de más de un 10% a los 3 meses post-trasplante estando asociado con un riesgo relativo de 2,5 veces de pérdida de injerto a 10 años y prediciendo una reducción de aproximadamente 15% en la supervivencia del injerto a largo plazo (85). Si los clínicos esperan hasta que los pacientes comienzan mostrando niveles incrementados en la creatinina sérica, seguramente un daño considerable ya se encuentra instaurado y puede ser muy tarde para una intervención exitosa (86).

## **1.6. Tecnología en genómica.**

La expresión génica es el proceso por el cual la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional. Los científicos generalmente estudian cambios, incrementos o disminuciones, en la expresión de un gen particular o un grupo de genes mediante la medición de la abundancia de transcritos específicos del gen. Los avances recientes en la tecnología genómica usando microarrays han hecho posible detectar los patrones de expresión de cientos de genes simultáneamente. A través de los *microarrays* se genera un gran conjunto de datos que representan un amplio perfil de expresión de genes del genoma, denominado "transcriptoma" (87).

La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, según sus siglas en inglés) en tiempo real cuantitativa ha sido utilizada para muchas aplicaciones biológicas incluyendo polimorfismos de nucleótido simple (*SNPs*, según sus siglas en inglés), estado de metilación del ADN, carga viral entre otras. Una de las aplicaciones más frecuentes de la *PCR* en tiempo real es la cuantificación de los niveles de ARN (88).

### **1.6.1. Aplicación de la genómica en la Disfunción Crónica del Injerto.**

La aplicación de la tecnología de *microarrays* en trasplante renal es relativamente reciente. El primer estudio fue publicado en el año 2001, el cual reportó un set de genes que se encontraron persistentemente sobreexpresados en muestras de biopsias renales de pacientes con rechazo agudo (89). En general, se utilizan los estudios de *microarrays* para identificar la llamada firma o sello distintivo de los genes que caracterizan enfermedades o se generan listas de genes que proveen conocimiento dentro de la patogénesis subyacente de enfermedades específicas (90). Se espera que jueguen un rol crítico en trasplante de

órganos en problemas asociados a la identificación de mecanismos moleculares de rechazo agudo, injuria crónica, efecto de la toxicidad por drogas y tolerancia. Se espera que los *microarrays* ayuden a identificar biomarcadores, que puedan utilizarse de manera no-invasiva, en el diagnóstico clínico de rechazo agudo, inducción de tolerancia y progresión temprana a IF/TA (91).

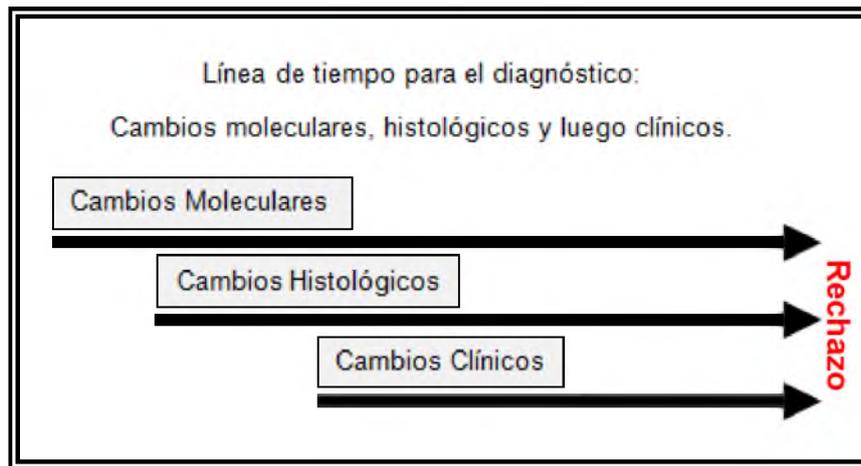
Para encontrar estrategias terapéuticas apropiadas, son esenciales conocimientos más detallados dentro de la patogénesis de la pérdida de función del injerto con IF/TA. Mas VR y col. (92) examinaron el perfil global de transcriptos en biopsias de aloinjerto para dilucidar el perfil molecular distintivo presente en IF/TA, donde muchos de los genes diferencialmente expresados estuvieron asociados a los diferentes pasos de la respuesta inmune al aloinjerto, incluyendo genes vinculados al procesamiento y presentación antigénica, activación de células T, B y respuesta inmune efectora. Como consecuencia de la complejidad de la patogénesis y causas multifactoriales de la enfermedad, es altamente probable que las decisiones terapéuticas individualizadas puedan estar asociadas con opciones futuras de tratamiento. Para ser capaces de individualizar el seguimiento y pronóstico en estos pacientes, son necesarias herramientas precisas que puedan discriminar pacientes en riesgo de progresión a CAD de pacientes que mantendrán una función renal estable (93).

### **1.7. Biomarcadores en trasplante renal.**

En trasplante renal, a pesar de las décadas de investigación, todavía hay una falta de marcadores predictivos útiles para el monitoreo en la rutina clínica (94, 95). Esto es debido en parte, a la escasez de puntos de corte bien definidos y tiempos cortos de seguimiento en estudios de validación. Además, refleja la ausencia de métricas robustas y una dependencia de las medidas subjetivas. Las mediciones de creatinina sérica, índice de filtrado glomerular, proteinuria y biopsia, permanecen siendo los estándares de oro para la evaluación de los aloinjertos renales. Estas pruebas tienen limitaciones significativas en la predicción de cuáles serán los pacientes que permanecerán con función renal estable y quienes evolucionarán hacia la pérdida del injerto.

El diagnóstico actual de injuria aguda y crónica del aloinjerto renal depende de la evaluación de la biopsia realizada a un tiempo definido de protocolo o luego de un incremento en los niveles de creatinina que indiquen una función del injerto disminuida, lo que señalaría que la lesión ha avanzado. El análisis de la expresión génica de biopsias a

través de la *PCR* en tiempo real y *microarrays* ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de los cambios moleculares subyacentes a las lesiones en curso (96, 97). Los cambios moleculares preceden a los histológicos y más aún a los cambios clínicos (Figura 1.9). Sin embargo, se presenta un problema con este enfoque y es la continua necesidad de un procedimiento invasivo: la biopsia.



**Figura 1.9:** Línea de tiempo para el diagnóstico de rechazo. Los cambios moleculares preceden a los cambios histológicos y a los clínicos en el diagnóstico de la patología renal.

Según el NIH (*National Institutes of Health, USA*), a través de *Biomarkers Definitions Working Group 2001* (98), un "marcador biológico o biomarcador" es una característica que se mide de manera objetiva y es evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a intervención farmacéutica. El objetivo de los biomarcadores es permitir el monitoreo sensible y preciso de la función del injerto, el diagnóstico temprano y específico de rechazo y la evaluación de los resultados a largo plazo, lo que permite un tratamiento inmunosupresor adaptado de una manera no invasiva y rentable (99).

Vasconcellos LM. y col. (100), publicaron el primer estudio de expresión génica en sangre periférica como una herramienta de monitoreo menos invasiva para la disfunción del riñón trasplantado. Investigaron la expresión de ARNm de perforina, granzima B y Fas Ligando como marcadores de injuria aguda en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de receptores de trasplante renal, obteniendo alta sensibilidad y especificidad en la predicción de rechazo agudo. En contraste, Graziotto R. y col. 2006 (101), reportaron que los niveles de ARNm en sangre periférica de perforina, granzima y Fas Ligando no son

significativamente mayores durante el rechazo agudo en comparación con el no-rechazo agudo.

Mas VR. y col. (102), evaluaron 3 marcadores diferencialmente expresados en biopsias con IF/TA en sangre periférica y células de orina de los mismos pacientes. Encontraron que los niveles de expresión génica de los marcadores estudiados en muestras de orina eran más representativos de la expresión en las biopsias renales que las muestras de sangre periférica. Estos resultados mostraron que la evaluación de marcadores moleculares en orina pueden representar un recurso invaluable para el monitoreo de receptores de trasplante renal.

El perfil de ARNm celular urinario puede ayudar a entender los mecanismos subyacentes indicando el daño temprano post-trasplante cuando los cambios patológicos están teniendo lugar a nivel molecular, así como pronosticar resultados exitosos en pacientes trasplantados renales (92). La tecnología de los “omics” han provisto una multitud de nuevos biomarcadores prometedores durante los últimos años. Sin embargo, no existe en la actualidad la aplicación de rutina de estos biomarcadores en trasplante renal.

## **2. Angiogénesis y su rol en la progresión a la Disfunción Crónica del Injerto.**

### **2.1. Generalidades.**

A finales de la década del '30, Warren y colaboradores realizaron la primera observación asociando la angiogénesis con el crecimiento tumoral. Más de 30 años después, Judah Folkman lanzó la angiogénesis en tumor como un nuevo campo e introdujo el concepto de inhibidores de la angiogénesis como herramientas potentes para el tratamiento del cáncer (103). Pero habría que esperar hasta los '80 - '90 para el descubrimiento de un gran número de moléculas pro y anti-angiogénicas que impulsaron el desarrollo de un campo amplio y complejo de investigación (104).

### **2.2. Modos de formación de vasos. Angiogénesis.**

Se define como “*Angiogénesis*” a la formación de nuevos capilares desde vasos pre-existentes. Es un proceso complejo que requiere interacción entre diferentes tipos de células, MEC, citoquinas y factores de crecimiento. La angiogénesis aberrante está asociada

con señales que promueven un crecimiento excesivo y una falta de señales suficiente para coordinar espacial y temporalmente el crecimiento, remodelamiento, maduración y estabilización de los vasos. Una respuesta aguda y sostenida a un estímulo no controlado, eventualmente lleva a una angiogénesis patológica (105).

La *hipoxia* es uno de los conductores claves de la angiogénesis. Se ha trabajado mucho en la elucidación de los mecanismos moleculares que median la respuesta hipóxica (106). Las células responden a la baja disponibilidad de oxígeno mediante la estimulación de factores inducibles por hipoxia (HIFs) y moléculas responsables del desarrollo de la vasculatura, placenta, sistema nervioso y otros órganos (107).

La angiogénesis también incluye penetración de vasos dentro de regiones avasculares de tejido y es crucialmente dependiente de las interacciones correctas entre células endoteliales (que forman el revestimiento de los vasos), pericitos o células murales (que interactúan externamente con el endotelio) y células estromales (como fibroblastos), y su asociación con la MEC y la membrana basal vascular (107).

### **2.2.1. Angiogénesis: ramificación, maduración y quiescencia de los vasos.**

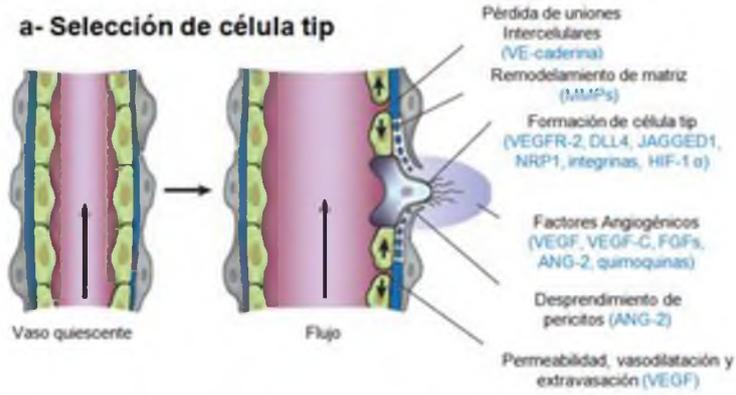
Para una angiogénesis efectiva, se requieren pasos múltiples y secuenciales (108). El primer paso para avanzar hacia regiones avasculares de tejido implica la apertura de capilares existentes y la degradación de parcial de la MEC circundante, lo que permite la infiltración celular. Bajo condiciones hipóxicas, la expresión de HIF1 $\alpha$  es inducida en células endoteliales, resultando en la expresión del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular A (VEGFA) y del Receptor del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular tipo 2 (VEGFR2) (109). Las células endoteliales son guiadas dentro de áreas avasculares por macromoléculas como VEGFA, un factor proangiogénico potente y mitógeno de la célula endotelial (110).

En un adulto sano, las células endoteliales quiescentes tienen vidas medias prolongadas y se encuentran protegidas por la acción autócrina de señales de mantención como VEGF, NOTCH, Angiopoyetina-1 (ANG-1) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFs). Debido a que los vasos suministran oxígeno, las células endoteliales están equipadas con sensores de oxígeno y factores inducibles por hipoxia, que permiten a los vasos reajustar su forma para optimizar el flujo sanguíneo. Las células endoteliales quiescentes forman una monocapa de células "*phalanx*" con una superficie aerodinámica, interconectadas con moléculas de unión como VE-caderina y claudinas. Estas células

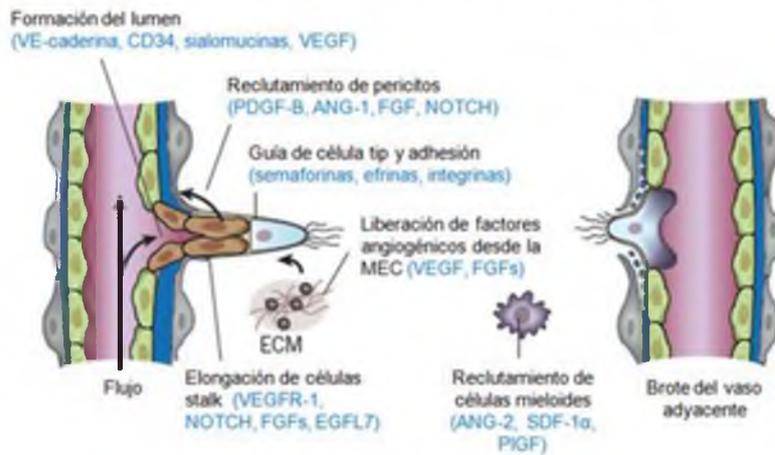
endoteliales están recubiertas por pericitos, los cuales suprimen la proliferación de la célula endotelial y liberan señales de sobrevivencia celular, como VEGF y ANG-1. Las células endoteliales y los pericitos en reposo producen una membrana basal común (111). Cuando un vaso quiescente censa una señal angiogénica, como VEGF, ANG-2, FGFs o quimoquinas, liberadas por una célula tumoral, hipóxica o inflamatoria, los pericitos se desprenden de la pared del vaso (en respuesta a ANG-2) y se liberan de la membrana basal por degradación proteolítica, la cual es mediada por MMPs (Figura 1.10). Las células endoteliales pierden sus uniones intercelulares y el vaso naciente dilata. VEGF incrementa la permeabilidad de la capa de células endoteliales, causando que las proteínas plasmáticas extravasen y establecen una MEC provisoria. En respuesta a la señalización de integrinas, las células endoteliales migran sobre la superficie de la MEC. Las proteasas liberan moléculas angiogénicas almacenadas en la MEC como VEGF y FGF, y remodelan la MEC, convirtiéndola en un medio angio-competente. Para construir un tubo perfundido y evitar que las células endoteliales se muevan en masa hacia la señal angiogénica, una célula endotelial, conocida como célula "*tip*", se convierte en la célula seleccionada para dirigir el avance. El brote de los vasos requiere coordinación entre la célula *tip* migrante y las células proliferativas "*stalk*". Las células endoteliales del borde delantero extienden filopodias y migran siguiendo las señales angiogénicas. En la parte delantera inicial, donde los niveles de VEGF son más altos, éste activa el receptor VEGF-2 para estimular la migración de la célula *tip*. La internalización de VEGFR2 y activación de la señalización a través de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1 / 2) son importantes para la generación del brote. La señalización es esencial para que las células endoteliales en el frente vascular respondan fuerte y rápidamente a las señales angiogénicas (111). La competencia y cambios de posiciones según los niveles de la pareja VEGFR, aseguran que la célula *tip* está óptimamente equipada para censar el gradiente de VEGF. Las células vecinas asumen posiciones subsidiarias como células "*stalk*", las cuales se dividen para elongar el tallo del vaso (estimuladas por NOTCH, Factor de Crecimiento Placentario (PIGF) y FGFs) y establecen el lumen (mediado por VE-caderina, CD34, sialomucinas y VEGF). Las células *tips* están equipadas con filopodias para censar las señales ambientales tales como efrinas y semaforinas (107).

El programa inducible por hipoxia, conducido por HIF-1 $\alpha$ , prepara a las células endoteliales para responder ante la presencia de señales angiogénicas. Para que un vaso se convierta en funcional, debe ser maduro y estable. Las células endoteliales reanudan su estado *phalanx* quiescente, y las señales como PDGF-B, ANG-1, TGF- $\beta$  y NOTCH hacen posible que las células se recubran de pericitos (112). Los inhibidores de proteasas,

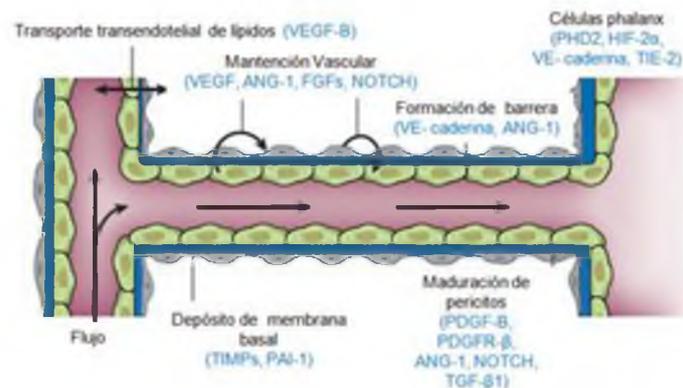
conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1) conducen la deposición de una membrana basal, y las uniones son re-establecidas para asegurar la distribución óptima del flujo. Los vasos experimentan una regresión si no pueden ser perfundidos (107).



**b- Elongación de células stalk y guía de células tip**



**c- Resolución, quiescencia de células phalanx.**



**Figura 1.10: Representación del proceso de angiogénesis. a) Pasos iniciales: selección de la célula *tip*.** Luego de la estimulación con factores angiogénicos, el vaso quiescente se dilata y una célula endotelial *tip* es seleccionada para asegurar la formación de la ramificación. La formación de la célula *tip* requiere la degradación de la membrana basal, desprendimiento de pericitos y pérdida de uniones intercelulares. La permeabilidad incrementada permite la extravasación de proteínas plasmáticas (como fibrinógeno y fibronectina), se deposita una capa de matriz provisional, y las proteasas remodelan la matriz intersticial pre-existente, permitiendo la migración celular. Por simplicidad, sólo la membrana basal entre las CE y los pericitos se representa, pero en realidad ambos están incrustados en esta membrana basal. **b) Guía de célula *tip* y elongación del tallo:** las células *tip* navegan en respuesta a las señales guías (como semaforinas y efrinas) y se adhieren a la matriz extracelular (mediante integrinas) para migrar. Las células *stalk* detrás de la célula *tip* proliferan, elongan y forman el lumen; los brotes se fusionan para crear un neovaso perfundido. La proliferación de las células *stalk* atrae pericitos y las membranas basales se depositan para estabilizarse. **c) Resolución, quiescencia.** Después de la fusión de las ramas vecinas, la formación del lumen permite la perfusión de la neovasos, que reanuda la quiescencia mediante la promoción de un fenotipo *phalanx*, re-establecimiento de uniones intercelulares, la deposición de la membrana basal, la maduración de los pericitos y la producción de señales de mantenimiento vasculares. Extraído y modificado de Carmeliet P y col., 2011 (111).

## 2.2.2.Regulación de la angiogénesis. Factores positivos directos.

La regulación positiva de la angiogénesis es provista por factores que pueden tener una acción directa o indirecta. Los factores regulatorios directos actúan sobre la célula endotelial a través de interacciones con receptores de superficie mientras que los factores indirectos influyen la expresión de factores pro-angiogénicos directos y subsecuentemente la angiogénesis (113, 114) (Tabla 1.1).

*VEGF*. El regulador positivo más potente de la angiogénesis, tanto normal como anormal, ha demostrado ser VEGF, cuyo regulador clave de la expresión de ARN es la tensión baja de oxígeno (115). Dada la complejidad de un proceso como angiogénesis, es notable que un factor de crecimiento simple, VEGF, regule este proceso tan predominantemente. La familia VEGF consiste de sólo unos pocos miembros que se distinguen de otras superfamilias angiogénicas por los roles en gran parte no redundantes de sus miembros. VEGF-A es el componente principal, y estimula la angiogénesis en condiciones normales y patológicas a través de la señalización del receptor VEGF-2 (116, 117). Al igual que la deficiencia de VEGFR-2, la pérdida de VEGF aborta el desarrollo vascular (138). VEGF es un mitógeno específico para las células endoteliales derivadas de estructuras vasculares (arterias, venas y linfáticos) (113) y tiene una influencia positiva sobre la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales induciendo la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 (119).

*FGF*. Los factores de crecimiento de fibroblastos son secretados no clásicamente y regulan la angiogénesis, reparación de tejido, inflamación, carcinogénesis. Son expresados de manera independiente a HIF-1 $\alpha$  durante la isquemia. Promueven la angiogénesis de manera directa e indirecta a través de la expresión de VEGF (120). Los FGFs activan receptores (FGFRs) sobre la célula endotelial o indirectamente estimulan la angiogénesis mediante la inducción de la liberación de factores angiogénicos desde otros tipos de células (121).

FGF también ejerce su efecto proangiogénico a través del incremento en la expresión de osteopontina (glicoproteína también conocida como Eta-1). Osteopontina es un factor quimiotáctico para monocitos proangiogénicos y células endoteliales (122).

### **2.2.3.Regulación de la angiogénesis. Factores positivos indirectos.**

*TGF- $\beta$* . Es otro factor de crecimiento proangiogénico y su rol en el desarrollo de la fibrosis de tejido y durante el proceso de angiogénesis ha sido extensamente revisado (123-125). Sin embargo, el entendimiento de las bases moleculares de esta vía ha ido cambiando debido a resultados inconsistentes. Esto es en parte debido a los efectos contexto dependientes pro y anti-angiogénicos de los miembros de esta familia. TGF- $\beta$  es secretada como un complejo inactivo de pro-citoquinas que consiste en la proteína TGF- $\beta$  activa, madura, unida no covalentemente a un dímero de su pro-péptido N-terminal, la denominada proteína asociada a latencia (LAP), y de forma variable a una proteína latente unida a TGF- $\beta$  (LTBP). Antes de que pueda unirse a sus receptores, TGF- $\beta$  tiene que ser activado extracelularmente (126).

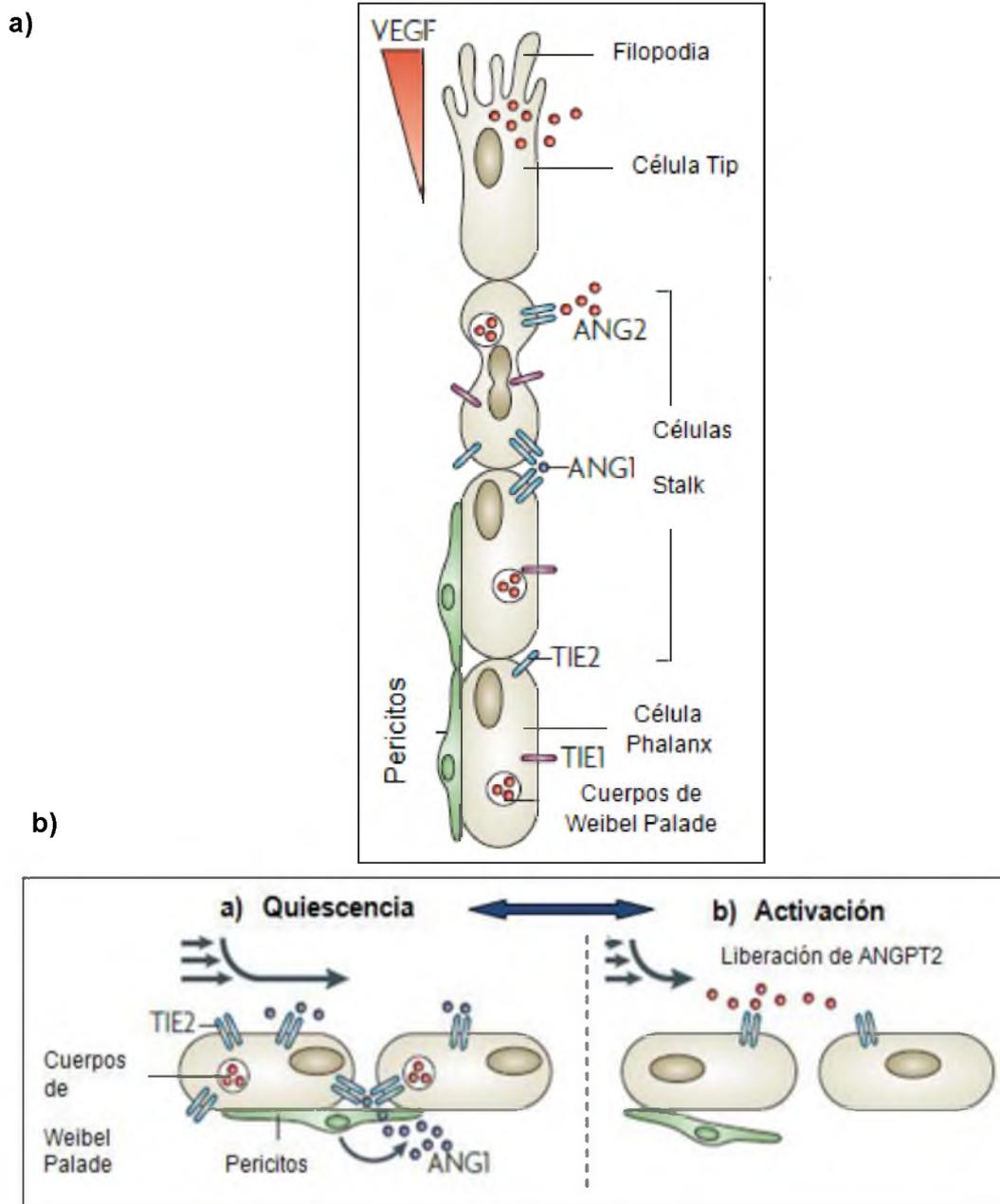
*PDGF*. Para que los vasos funcionen adecuadamente, necesitan estar maduros y recubiertos por células murales o pericitos. Muchas familias de factores de crecimiento, como PDGFs, angiopoyetinas y TGF- $\beta$ , contribuyen a este proceso (127). La familia de PDGF comprende cuatro miembros (PDGF-A hasta D), los cuales se unen con distinta selectividad al receptor tirosina kinasa PDGFR-a y -b, expresado sobre las células endoteliales y células de músculo liso. PDGFB y PDGFR-b juegan un rol esencial en la estabilización de los vasos sanguíneos nacientes mediante el recubrimiento con células de músculo liso (Figura 1.13). Por lo tanto, la deficiencia de pericitos después de la ablación de PDGF-B causa derrame de los vasos, tortuosidad, formación de microaneurismas y hemorragias (128).

**Tabla 1.1: Familias de genes pro-angiogénicos.** Factores angiogénicos y sus ligandos en la participación del proceso de angiogénesis.

Ligando-receptor	Rol en angiogénesis fisiológica
VEGF-VEGFR1	Induce proliferación, gemación y formación de túbulo de CE.
VEGF-VEGFR2	Incrementa la permeabilidad vascular Suprime la apoptosis para la estabilización de los vasos
PDGF-PDGFR	Promueve la migración, reclutamiento y proliferación de pericitos.
ANG1-TIE2	Facilita la interacción CE-matriz y CE-pericitos. Suprime la Apoptosis de la CE.
ANG2-TIE2	Induce la apoptosis de la CE en ausencia de VEGF.
TGF $\beta$ -TGF $\beta$ R	Promueve la producción de MEC y proteasas; promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y células mesenquimales a pericitos.

**ANGIOPOYETINAS.** El sistema de señalización Angiopoyetinas y su receptor Tie fue identificado como un complejo tirosina-quinasa específico esencial para el desarrollo de los vasos. Los receptores Tie son expresados selectivamente por las células endoteliales. Las señales de VEGF promueven los eventos iniciales en la angiogénesis como el brote en la célula endotelial mientras que las señales de angiopoyetina-Tie favorecen la supervivencia de la célula endotelial, el ensamble vascular, la estabilidad y la maduración. La familia de ANG humana consiste en dos receptores, Tie1 y Tie2 y tres ligandos, ANG1, ANG2 y ANG4. A pesar del alto grado de homología estructural, los dos receptores tienen marcadamente diferentes propiedades (129). Funcionalmente, Tie2 se une directamente a las ANG y tiene una fuerte actividad quinasa. En contraste, Tie1 no se une directamente a las angiopoyetinas bajo condiciones normales y tiene una leve actividad quinasa. Luego de la unión a ANG1, Tie2 se fosforila en muchos residuos citoplasmáticos de tirosina, que resultan en la activación de las vías de señalización incluyendo PI3-quinasa / Akt y ERK (111).

ANG2 es expresada abundantemente por células endoteliales, pero el patrón de expresión posicional preciso no está bien definido. Las células *stalk* y las *phalanx* pueden almacenar ANG2 en los cuerpos de *Weibel Palade* (Figura 1.11 a)). La acción parácrina de ANG1 puede agrupar a los receptores Tie2 en contacto con las células endoteliales en *trans* (Figura 1.11b). Durante la transición de fenotipo quiescente a activado, las células endoteliales liberan sus *pool*es almacenados endógenamente de ANG2, y esto antagoniza la señalización ANG1-Tie para facilitar la respuesta a citoquinas exógenas (130).



*HGF*. El factor de crecimiento de hepatocitos es una proteína derivada de mesénquima, descrita como mitógeno para hepatocitos y como un factor derivado de fibroblastos que induce diseminación en células endoteliales polarizadas (131). HGF regula el crecimiento y mortalidad de varios tipos de células e induce la proliferación y migración de células endoteliales. Sengupta S. y col. 2003 (132), mostraron en experimentos *in vivo* e *in vitro* que la exposición al inhibidor de la vía de transducción de VEGF no influencia la angiogénesis inducida por HGF. Por esto, se hipotetiza que HGF actúa como regulador directo de la angiogénesis.

#### **2.2.4.Regulación de la angiogénesis. Factores negativos.**

*TSP*. Las trombospondinas (TSP) conforman una familia de proteínas multifuncionales con capacidades antiangiogénicas. Han sido conocidos como las proteínas multiméricas de unión a heparina (133). TSP-1 es una glicoproteína de MEC que posee múltiples dominios funcionales a los que se han atribuido diferentes actividades biológicas. La expresión de las trombospondinas es regulada por oncogenes de hipoxia y genes supresores de tumor. Se demostró que la hipoxia *in vitro* induce la expresión de ARNm y proteína TSP-1 (134). Su efecto negativo sobre la angiogénesis es mediado por la interacción con el receptor de superficie TSP sobre las células endoteliales y la subsecuente inducción de apoptosis de la célula endotelial (135).

*END*. Endostatina, un fragmento proteolítico carboxi-terminal de 20 kDa del colágeno tipo XVIII, ha sido plenamente estudiado como un potente inhibidor de la angiogénesis desde su descubrimiento en el año 1997 (136). La endostatina inhibe la proliferación de la célula endotelial, migración/invasión y formación del tubo vascular (137) e induce la apoptosis de la célula endotelial (138). Además, interfiere con la señalización VEGF/VEGFR y se ha reportado que disminuye la esclerosis peritoneal mediante la reducción de la expresión de TGF- $\beta$ , el cual es el factor de crecimiento profibrótico más importante (139).

#### **2.2.5.Angiogénesis e injuria de isquemia-reperfusión.**

La isquemia-reperfusión (I-R) es una condición patológica caracterizada por una restricción inicial del suministro de oxígeno a un órgano, seguido de la restauración de la perfusión y re-oxigenación concomitante. En su manifestación clásica, una oclusión del suministro de sangre arterial resulta en un desequilibrio grave de oferta y demanda que

causa hipoxia tisular. La restauración del flujo sanguíneo y re-oxigenación se asocia frecuentemente con una exacerbación de la lesión de los tejidos y una respuesta inflamatoria profunda que en conjunto se denominan "lesión por reperfusión". La I-R es una causa de deterioro estructural del riñón que está omnipresente en trasplante renal y contribuye a la injuria del rechazo renal agudo y crónico, pérdida de la función, estimulación de la inmunidad innata y adaptativa con el evento final de falla del injerto. La limitada disponibilidad de oxígeno que ocurre durante el periodo isquémico está asociado con una alteración de la función de la barrera de células endoteliales y un incremento concomitante en la permeabilidad vascular (140).

El estrés isquémico genera las condiciones necesarias para el establecimiento de un estado permanente de isquemia del tejido, donde se promueven lesiones (destrucción capilar, fibrosis intersticial, inflamación y vasoconstricción) y se activan vías de señalización molecular profibróticas e inflamatorias (HIF-1 $\alpha$  y angiotensina 2) que inician un círculo vicioso que perpetua la isquemia del tejido y el deterioro estructural (141). Los cambios estructurales crónicos asociados con CAD contribuyen a la isquemia (vasoconstricción crónica, arterioesclerosis, y fibrosis intersticial) y son los factores principales que contribuyen a la manutención de un estado hipóxico (142).

Bajo condiciones hipóxicas, HIF $\alpha$  induce la transcripción de cientos de genes que codifican proteínas responsables de la regulación de captación de glucosa y metabolismo, quimiotaxis celular inflamatoria, proliferación y supervivencia celular, formación y recambio de matriz extracelular y angiogénesis (143).

Aunque la expresión de VEGF se ha visto que incrementa en la enfermedad renal y durante la hipoxia, los trabajos experimentales no encontraron ningún incremento en la expresión de VEGF en los modelos de rata de I-R renal. Se hipotetiza que la isquemia reperfusión renal resulta en un cambio neto de factores expresados a favor de la anti-angiogénesis vs angiogénesis/estabilización vascular. Por ejemplo, se han identificado inhibidores potenciales de la angiogénesis que son estimulados en el contexto de la isquemia reperfusión, como endostatina, PAI-I, MMPs, ADAMTS1 y angiostatina (144). De todos modos, esta hipótesis es intuitiva debido a que la hipoxia luego de la isquemia reperfusión se espera que estimule la expresión de moléculas pro-angiogénicas, particularmente VEGF, de manera dependiente de HIF-1 $\alpha$  (145). Debido a que la I-R renal resulta en una hipoxia persistente y daño del sistema vascular, el sistema VEGF debe ser investigado en las fases tempranas y tardías de injuria de este modelo como posible explicación de la pérdida de reparación vascular.

### **2.2.6. Injuria de isquemia-reperfusión en CAD.**

La injuria de I-R ha sido implicada en la etiopatogénesis de CAD (146). Esta injuria perjudica y subsecuentemente activa las células endoteliales que expresan varias citoquinas y moléculas de adhesión. Como resultado, la infiltración inflamatoria del aloinjerto se incrementa, especialmente monocitos y linfocitos T migran en el tejido del injerto donde expresan citoquinas y así estimulan a las células endoteliales a expresar VEGF y TGF- $\beta$ 1: citoquinas involucradas en angiogénesis y desarrollo de fibrosis (147). La correlación estrecha entre angiogénesis, el grado de infiltración inflamatoria y el grado de fibrosis intersticial y glomerular ha sido reportada en varios estudios (113, 148).

### **2.2.7. Angiogénesis y CAD.**

La injuria hipóxica que está involucrada en CAD, es influenciada por la injuria de I-R la cual activa a las células endoteliales, podocitos y células tubulares. Luego, estas células incrementan la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y factores proangiogénicos, como VEGF, por podocitos y células tubulares. En la fase temprana, la angiogénesis representa una tendencia hacia el mantenimiento de la estructura histológica y función normal del aloinjerto. Sin embargo, los efectos quimiotácticos de los factores proangiogénicos junto con la expresión de moléculas de adhesión incrementada han sido asociados con la infiltración de células T y monocitos. Subsecuentemente, ocurre la producción de citoquinas antiangiogénicas y profibróticas por las células infiltrantes. La expresión incrementada de citoquinas profibróticas y la reducción del suministro de oxígeno juegan un rol en el desarrollo de fibrosis y en el subsecuente fallo del aloinjerto (149).

## Objetivos

## 1. Premisas.

- CAD es un proceso complejo que involucra factores inmunológicos y no inmunológicos, y resulta en reemplazo del tejido normal por fibrosis como consecuencia de la respuesta crónica a mecanismos de injuria/reparación en el aloinjerto.

- Los cambios estructurales asociados con CAD contribuyen a la isquemia del tejido (vasoconstricción, arterioesclerosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular) y a la mantención de un estado hipóxico, fundamental para la iniciación de la angiogénesis. En el curso del tiempo los factores anti-angiogénicos expresados por los macrófagos y MEC pueden resultar en signos funcionales e histológicos de CAD.

- La detección de CAD con IF/TA requiere de procesos invasivos (biopsias del injerto: evaluación histológica). Los métodos actuales para el diagnóstico de CAD carecen de sensibilidad para detectar el daño significativo del órgano antes del establecimiento de las manifestaciones clínicas. Cuando el diagnóstico de IF/TA es realizado, el daño es avanzado, y no hay opciones terapéuticas posibles.

- La expresión génica en sedimento urinario puede ser un marcador relevante y no invasivo de CAD.

*Resulta de interés investigar el estado presente en CAD: quiescente o angiogénico?*

*¿Es posible identificar marcadores moleculares asociados a angiogénesis que caractericen CAD con IF/TA?*

*¿Es posible utilizar la orina como marcador no invasivo de la expresión de los genes asociados a angiogénesis identificados en biopsias con IF/TA?*

*¿Es posible identificar precozmente aquellos aloinjertos que estén evolucionando hacia CAD con IF/TA antes de la alteración de los parámetros clásicos de laboratorio y de la histología mediante la expresión génica?*

## 2. Hipótesis.

La expresión diferencial de genes asociados al proceso de angiogénesis podría identificar precozmente aloinjertos que estén evolucionando a IF/TA antes de la alteración de los parámetros clásicos de laboratorio y de la histología.

## 3. Objetivos.

### 3.1. Objetivo Principal

Identificar marcadores moleculares involucrados en el proceso de angiogénesis y su asociación en la progresión a IF/TA en biopsias y orinas de pacientes trasplantados renales.

### 3.2. Objetivos Especificos

*Objetivo 1:* Estudiar la expresión de los genes **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*), **PDGF** (*Platelet Derived Growth Factor*), **EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*), **TGF- $\beta$ 1** (*Transforming Growth Factor Beta*), **ANG 1** (*Angiopoietin 1*), **ANG 2** (*Angiopoietin 2*), **TSP-1** (*Thrombospondin 1*), **END** (*Endostatin*), **VCAM-1** (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), **SEL-E** (*E-Selectin*), **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*) y **FGF** (*Fibroblast Growth Factor*), en biopsias de pacientes trasplantados renales con diagnóstico de IF/TA.

*Objetivo 2:* Estudiar los niveles de expresión de los ARN mensajeros de los genes mencionados en células de orina de los pacientes con IF/TA.

*Objetivo 3:* Estudiar el valor predictivo de estos marcadores moleculares en la detección temprana de IF/TA en pacientes trasplantados renales.

## **Pacientes, Materiales & Métodos**

## 1. Diseño del estudio.

### 1.1. Pacientes y muestras.

Los estudios fueron realizados bajo la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud del Hospital Privado, Universitario de Córdoba (número de protocolo HP 4-139). El proyecto fue inscripto en el Registro Provincial de Investigaciones en Salud (RePIS) bajo el número 1504. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

Participaron del estudio 140 pacientes trasplantados renales adultos, 107 incluidos en el Programa de Trasplante Renal del Hospital Privado Universitario de Córdoba y 33 pertenecientes del Programa de Trasplante de la Universidad de Virginia. No fueron incluidos en el estudio aquellos pacientes que recibieron doble trasplante (riñón-páncreas, riñón-hígado); pacientes VIH positivos y bajo condición de re-trasplante.

El diseño del estudio incluyó (1) una sección transversal y (2) una sección longitudinal (Figura 3.1). La sección transversal consistió en una prueba de principio que tuvo como objetivo investigar si la angiogénesis era uno de los procesos involucrados en el desarrollo de CAD con IF/TA utilizando *microarrays*. Por otro lado, se cuantificaron los niveles de expresión génica de factores angiogénicos en biopsias con diagnóstico de IF/TA y se compararon con los niveles de otras entidades histológicas, utilizando *PCR* en tiempo real.

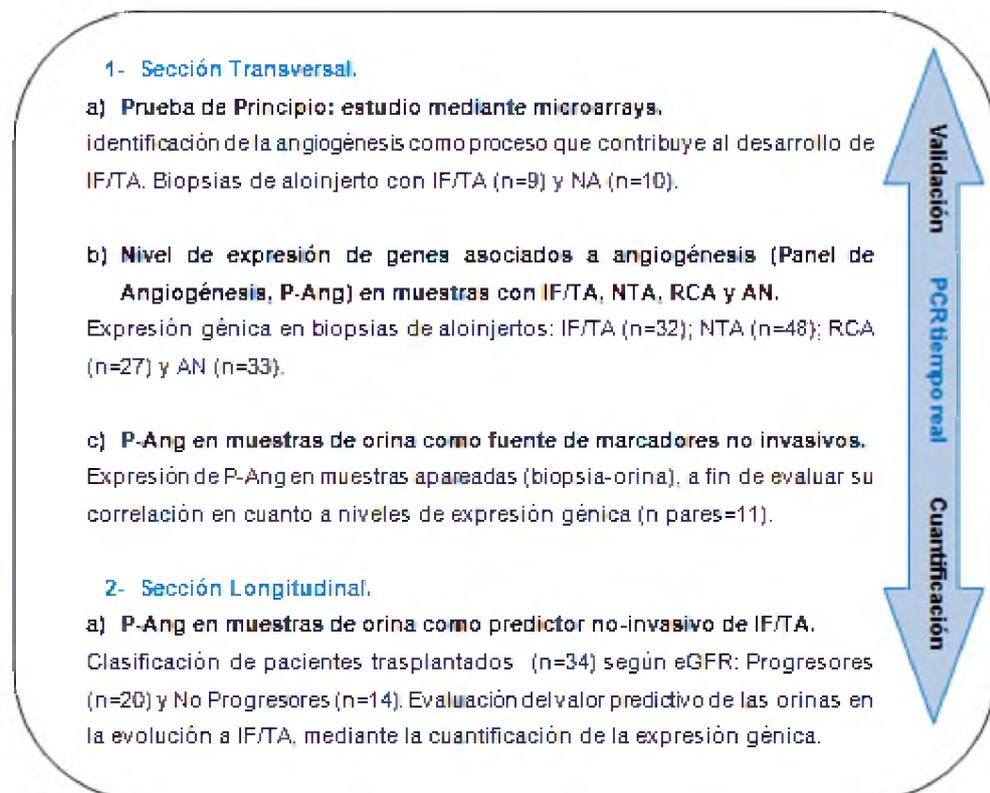
Se recolectaron biopsias de aloinjertos renales (n=107) indicadas “por causa”, según parámetros clínicos y de laboratorio (creatinina progresivamente elevada y/o proteinuria). En el caso de biopsias tempranas (dentro de los 7 días post-trasplante), la manifestación clínica fue anuria/oliguria, con retardo de la función del injerto y requerimiento de diálisis en algunos casos. Esta entidad es definida clínicamente como Función Tardía del Injerto (*DGF*, según sus siglas en inglés) e histológicamente como Necrosis Tubular Aguda (NTA).

Mediante una colaboración con el *Translational Genomics Transplant Laboratory*, perteneciente a la Universidad de Virginia de los Estados Unidos, fue posible incorporar al estudio biopsias de aloinjertos normales (AN, n=33) para realizar la comparación de los niveles de expresión de los factores angiogénicos en estudio con el grupo de estudio IF/TA. Las muestras de AN corresponden a receptores de trasplante renal de  $\geq 24$  meses de trasplante, con histología normal e índice de filtrado glomerular (*eGFR*, *estimated*

*Glomerular Filtration Rate*, según sus siglas en inglés)  $> 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ . El eGFR fue calculado usando la fórmula abreviada de MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease Study Group*) (84). El protocolo fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de Investigación en Ciencias de la Salud, protección de la Aprobación de los Sujetos Humanos (HSR#HM11454).

Con la finalidad de utilizar la orina como fuente de marcadores no invasivos, se realizó una *correlación de muestras*, donde se analizaron 11 especímenes apareados (biopsia/orina) de 11 pacientes para evaluar la asociación entre ambas muestras en cuanto a niveles de expresión génica.

En la sección longitudinal del estudio, se evaluó el valor predictivo de la orina en la evolución hacia CAD. Se recolectaron orinas de pacientes trasplantados renales ( $n=34$ ), a tiempos pautados post-trasplante ( $t=1$  semana, 1 mes, 3, 6, 9, 12 y 24 meses) y se cuantificaron los niveles de expresión génica según la clasificación basada en eGFR realizada a los 12 meses post trasplante.



**Figura 3.1: Diseño del Estudio.** Se incluyó una sección transversal, donde se realizaron análisis de *microarrays* como prueba de principio y de expresión génica mediante PCR en tiempo real en los grupos IF/TA, NTA, RCA y AN. La sección longitudinal comprendió la evaluación del valor predictivo de las orinas en la detección de IF/TA.

## 1.2. Tejido de aloinjerto renal.

### 1.2.1. Clasificación de las biopsias.

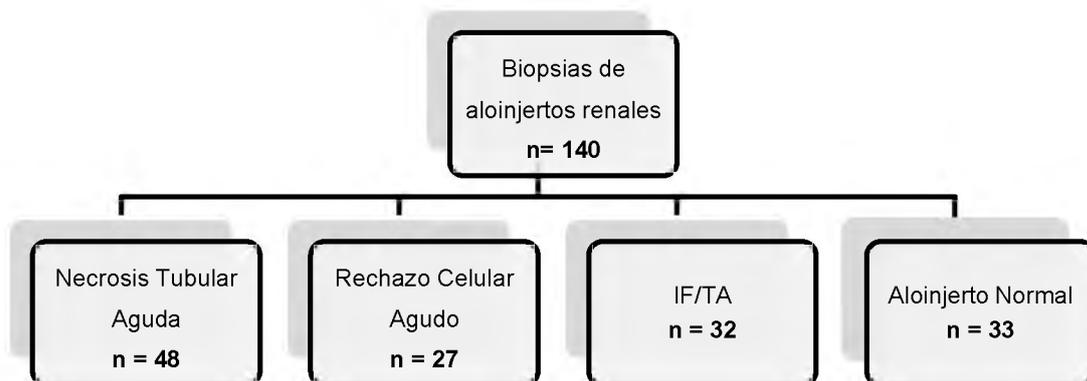
Las biopsias de aloinjerto renal fueron clasificadas en base a los hallazgos histológicos y criterios Banff (78), por el Departamento de Patología del Hospital Privado (Figura 3.2):

*\*Necrosis Tubular Aguda (NTA), n=48*

*\*Rechazo Celular Agudo (RCA), n=27*

*\*Fibrosis Intersticial / Atrofia Tubular (IF/TA), n=32*

*\*Aloinjerto Normal (AN), n=33*



**Figura 3.2: Clasificación de las biopsias de aloinjerto renal.** Se clasificaron las biopsias de aloinjerto renal según los criterios Banff, en Necrosis Tubular Aguda (n=48); Rechazo Celular Agudo (n=27), IF/TA (n=32) y Aloinjerto Normal (n=33).

### 1.2.2. Obtención de biopsias de tejido.

Las biopsias de los pacientes trasplantados renales fueron realizadas mediante una punción del aloinjerto renal utilizando una aguja automática de corte tipo tru-cut 16g. Las muestras se colocaron en tubos de almacenamiento conteniendo *RNA later* (Ambion Inc.,

Austin, TX). Luego de permanecer durante 24 horas a 4°C, los tubos conteniendo las muestras se colocaron a -20°C y se mantuvieron hasta el momento del procesamiento.

Un set de biopsias de aloinjerto renal se utilizó para evaluar la expresión génica usando *microarrays* (*Human Genome U133A 2.0*). Los grupos incluyeron 9 biopsias clasificadas como IF/TA y 10 como AN. Para la cuantificación mediante PCR en tiempo real se utilizó la totalidad de las biopsias incluidas en el estudio (n=140).

### **1.2.3. Cortes de biopsias por congelación.**

Cada una de las biopsias fue colocada en una platina con medio de montaje para crióstato "*Cryoplast*" (Biopack, Buenos Aires, Argentina) para realizar los cortes por congelación (figura 3.4). Se obtuvieron 12 cortes transversales de 10 µm cada uno para obtener material representativo de la totalidad de la biopsia. Los cortes se colocaron en TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD) a -20°C hasta la extracción del ARN.

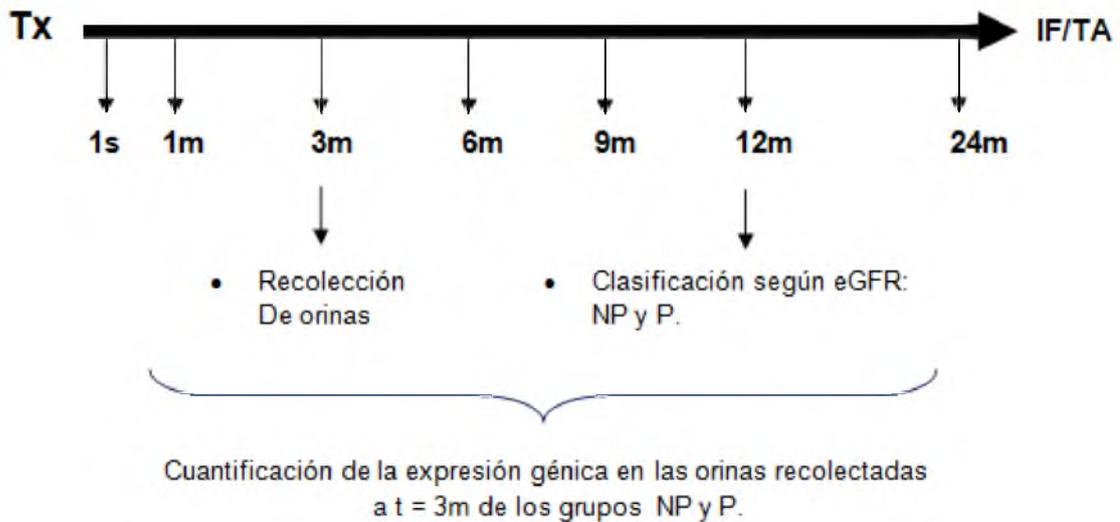
### **1.3. Obtención de muestras apareadas (biopsias/orinas).**

Se recolectaron 11 orinas conjuntamente con sus respectivas biopsias de tejido de aloinjerto renal, a fin de tener muestras apareadas para analizar su correlación. Se descartaron 3 pares por no cumplimiento de requisitos mínimos para la clasificación Banff de las biopsias.

### **1.4. Orinas.**

#### **1.4.1. Recolección seriada de orinas.**

Un grupo de 34 pacientes trasplantados renales fue evaluado de manera longitudinal, mediante la recolección seriada de muestras de orina a la semana y a 1, 3, 6, 9, 12 y 24 meses de trasplante (Figura 3.3). A los 12 meses de trasplante, los pacientes se clasificaron según eGFR. Se les asignó el nombre de *No-Progresores* (NP, n=14) a aquellos que tuvieron eGFR > 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup> y *Progresores* (P, n=20) a los pacientes con eGFR < 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Mediante esta clasificación, se cuantificó la expresión de los genes en estudio en la orina recolectada a t=3 meses.



**Figura 3.3: Esquema del segmento longitudinal del estudio.** Los pacientes se clasificaron a los 12 meses post-trasplante según eGFR y se estudiaron los niveles de expresión génica en los grupos en las orinas a t = 3 meses.

#### 1.4.2. Procesamiento de las orinas.

Las orinas se recolectaron en frasco estéril y se procesaron dentro de las 2 horas post-emisión. Los tubos con cada muestra de orina se centrifugaron a 2,000 g a temperatura ambiente y posteriormente se descartó el sobrenadante. Los sedimentos fueron resuspendidos en Buffer Fosfato Salino (PBS), transferidos a criotubos y centrifugados a 16,000 g durante 20 minutos a 4°C. Se descartó sobrenadante. Se agregaron 400 µl de *RNA later* al tubo conteniendo el sedimento celular urinario, se mezcló y centrifugó a 16,000 g. Se mantuvo a -20°C hasta la extracción del ARN.

#### 1.5. Extracción de ARN de biopsias y orinas.

El ARN fue extraído de los cortes de biopsia y orinas según el protocolo de TRIzol-Cloroformo (150). En este método, las células son lisadas mediante incubación con un reactivo de lisis monofásico conteniendo fenol, sales de guanidina y agentes solubilizantes. Se describen los pasos a continuación (Figura 3.4):

a- Los cortes de biopsia realizados en crióstato y almacenados en TRIzol fueron descongelados para la extracción del ARN. Se realizó vórtex para homogeneizar la suspensión y permitir que los cortes se integren en el TRIzol. En el caso de las orinas, se

descongelaron los tubos conteniendo los sedimentos urinarios; se centrifugaron a 16,000 g y se les extrajo el *RNA later* que se les había agregado como conservante de ARN.

b- Se agregaron 1000  $\mu$ l de TRIzol a cada uno de los tubos conteniendo los pellets urinarios. Se realizó vórtex para desintegrar los sedimentos.

Los pasos siguientes en el proceso de extracción de ARN fueron los mismos tanto para biopsias como para orinas.

c- Se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se incubó 5 minutos a TA, realizando vórtex constantemente.

d- Se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos.

e- Posteriormente se extrajo la fase acuosa (superior) y se transfirió a otro tubo *ependorf*.

f- Se agregó 1 volumen de isopropanol frío (200  $\mu$ l aproximadamente, según volumen de fase acuosa).

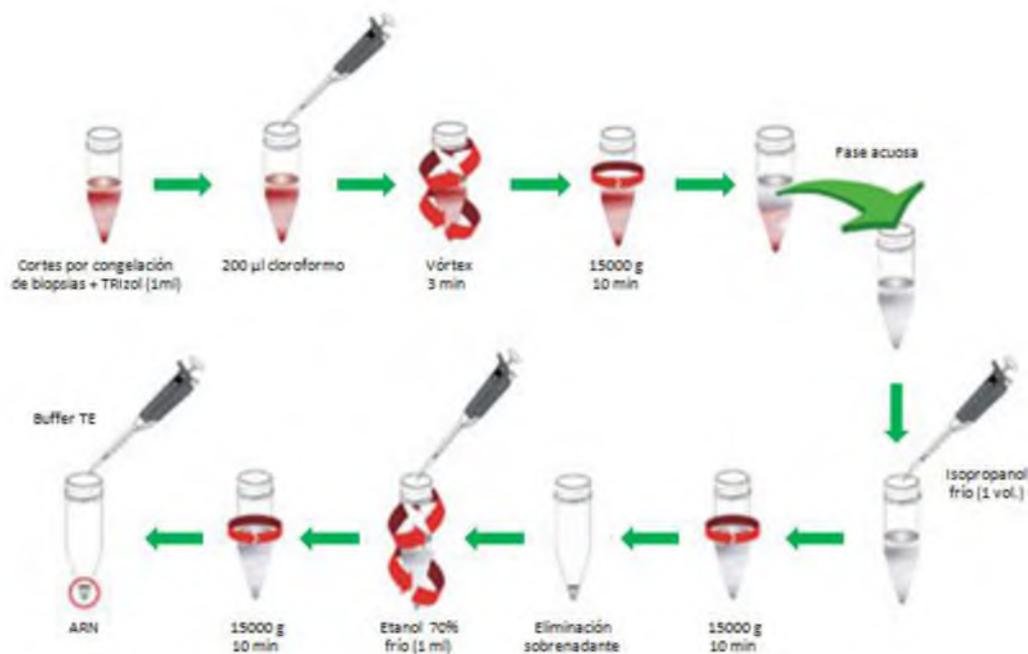
g- Se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante.

h- Se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 70% frío.

i- Se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante.

j- Se resuspendió el ARN en buffer Tris-EDTA.

k- El ARN se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.4: Esquema del protocolo de extracción de ARN mediante TRIzol-Cloroformo.** Técnica utilizada en la extracción de ARN desde biopsias y orinas.

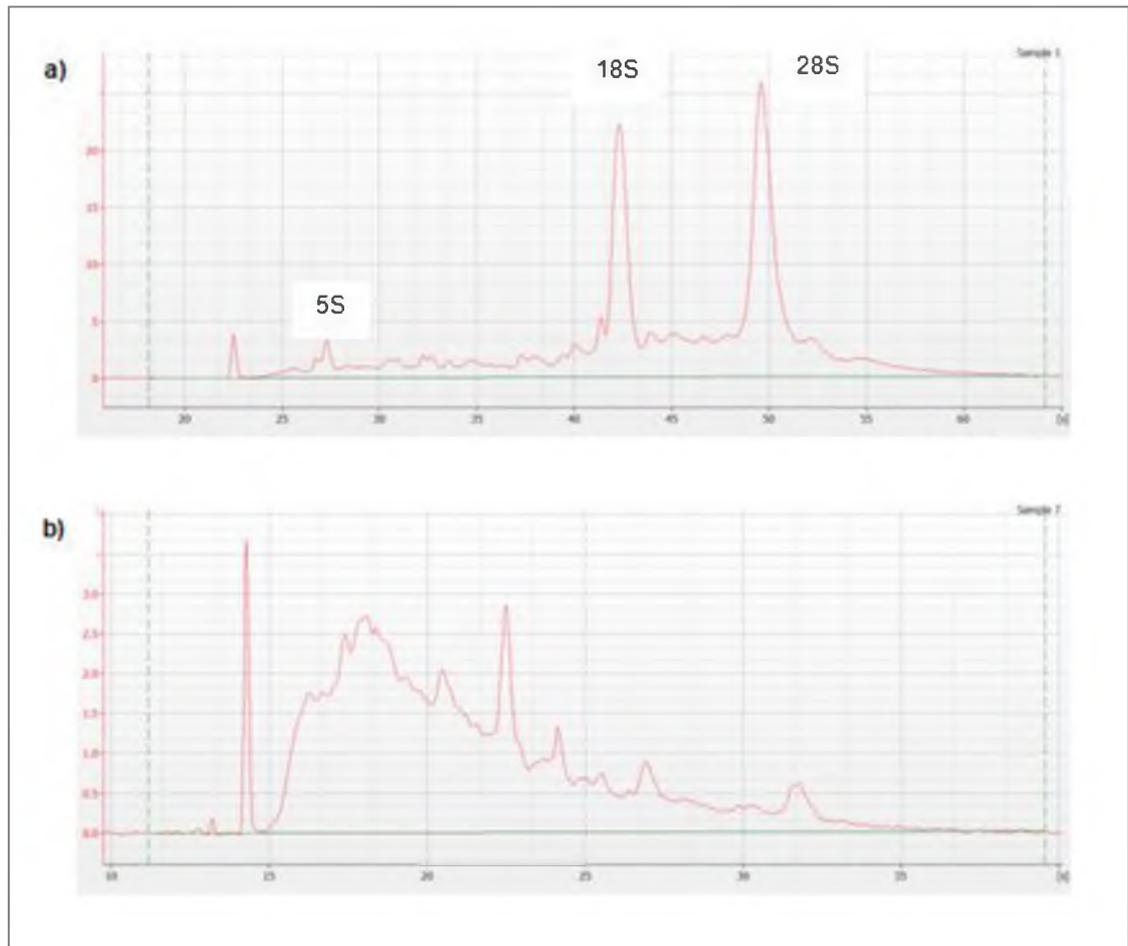
## 1.6. Control de calidad, pureza y concentración de los ARNs.

*Muestras utilizadas en microarrays.* El bioanalizador 2100 de *Agilent Technologies* es una plataforma basada en la microfluídica, que permite el análisis electroforético de muestras de ARN, ADN y proteínas. El software calcula la concentración del ARN, y dos parámetros numéricos que indican la integridad del ARN: la relación entre los ARN ribosómicos 28S y 18S (28S/18S), y el número RIN (Número de Integración del ARN). El parámetro RIN fue introducido por *Agilent Technologies* con el fin de estandarizar el proceso de interpretación de la integridad del ARN y eliminar el sesgo asociado a la interpretación individual. El algoritmo del RIN permite la clasificación de las muestras de ARN eucariótico total en base a un sistema numérico de 1 a 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta (Figura 3.5). Este sistema permite comparar cuantitativamente la integridad de todas las muestras de ARN del experimento, ya que para que los resultados de microarrays sean comparables todas las muestras deben tener una calidad similar.

La integridad del ARN de tejido renal fue testado usando un bioanalizador *Agilent 2100* y se requirió para realizar el análisis de microarrays que las muestras de ARN tuvieran una relación 28S/18S mayor a 1.5.

*Muestras utilizadas en PCR tiempo real.* Los dobles enlaces conjugados de las bases nitrogenadas hacen que los ácidos nucleicos absorban luz ultravioleta. El espectro de absorción característico de ácidos nucleicos presenta un máximo a  $\lambda \sim 260 \text{ nm}$ . La absorbancia de una muestra diluida de ARN es medida a 260nm (absorción de ácidos nucleicos) y a 280nm (absorción proteínas). Es posible establecer mediante la relación A260/A280 el grado de pureza del ARN. Una relación A260/A280 de 1.9-2.1 es indicativa de una muestra de ARN altamente pura. Una lectura a 260 de 1.0 es equivalente a  $\sim 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$  de ARN simple cadena (151).

La concentración y pureza de los ARNs extraídos de las muestras de biopsias y orinas fue establecida mediante el uso de *MaestroNano Spectrophotometer* (*MaestroGen, NV, USA*).



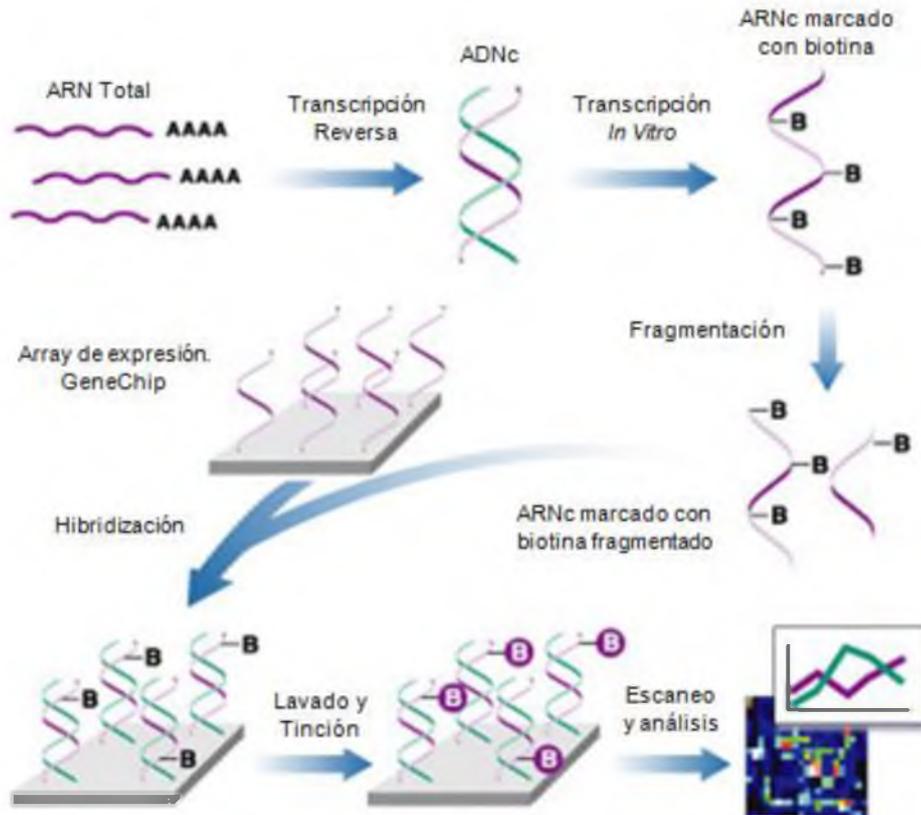
**Figura 3.5: Electroferogramas.** a) Electroferograma obtenido de una muestra de ARN de excelente calidad donde se observa la presencia de los picos de ARN ribosomal (18S; 28S). Muestra apta para la utilización de *microarray*. b) Panel de ARN con alto nivel de degradación: presencia de ARN fragmentado que aparece temprano en el electroferograma. El ARN degradado perteneciente a esta muestra no pudo ser utilizado para el estudio mediante *microarray*.

## 1.7. Reacciones.

### 1.7.1. Reacciones de *microarrays*.

El ARN extraído fue transcrito usando cebadores T7-poly dT y convertido a ADNc doble cadena mediante un sistema de elección *Superscript (One-Cycle Target Labeling and Control Reagents, Affymetrix, Santa Clara, CA)*. Los templados se utilizaron para la reacción de Transcripción *in vitro* a 37°C durante 8 horas para obtener ARNc anti-sentido marcado con biotina. El ARNc marcado fue químicamente fragmentado; se realizó la mezcla de hibridación de acuerdo al protocolo *Affymetrix GeneChip*, el cual fue luego hibridado a un

chipU133A 2.0 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). La imagen del chip fue generada por el escáner de alta resolución GeneChip 3000 de Affymetrix. Los datos fueron analizados usando el programa Affymetrix Microarray Suite, versión 5.0. (Figura 3.6).



**Figura 3.6: Representación general del proceso de *microarrays*.** Posteriormente a la extracción del ARN total se realizó la transcripción reversa para obtener ADNc, seguido de una transcripción *in vitro* para lograr ARNc. Luego de ser marcado con biotina, el ARNc se fragmentó para hibridar con el chip de expresión (*Array*). Seguidamente de los lavados y tinción, se escaneó el chip y se analizaron los resultados obtenidos. Extraído y modificado de Affimetrix.com.

### 1.7.2. Transcripción Reversa.

Se realizaron las reacciones de transcripción reversa (TR) utilizando cebadores hexaméricos aleatorios (*random primers*) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y enzima MMLV (Promega, WI, USA), según el protocolo que se muestra en la tabla 3.1. El programa de transcripción consistió en una incubación a 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos (152). Una vez finalizada la reacción, todos los ADN complementarios permanecieron a -20°C hasta su uso como molde de las reacciones de PCR en tiempo real para cada uno de los genes en estudio.

**Tabla 3.1: Protocolo de la reacción de Transcripción Reversa.** El ARN total extraído desde las muestras de biopsias y orinas fue transcrito a ADNc utilizando *random primers* y enzima MMLV (152).

Transcripción Reversa	
Buffer de la Enzima (5X)	:10 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	:11 µl
dNTPs (10mM)	:10 µl
<i>Random Primers</i> (3 µg/µl)	:0,2 µl
MMLV (200 U/µl)	:0,3 µl
Agua	:16 µl
ARN total (0,5 µg)	:2,5 µl
Volumen final	:50 µl

### 1.7.3. PCR en tiempo real.

Las reacciones de PCR en tiempo real para los estudios de expresión génica se ajustaron según las indicaciones de *Applied Biosystems* para los productos *TaqMan® Gene Expression Assays* (Catálogo #4331182) (Tabla 3.2), en un sistema de amplificación *Rotor-Gene 6000* (Corbett, Life Science). Estos ensayos consisten en un par de cebadores no marcados, una sonda *TaqMan* con FAM o VIC como fluorescentes en el extremo 5' conjuntamente con MGB y un *quencher* o apagador no fluorescente (NFQ) sobre el extremo 3'. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando la *Master Mix Universal Taqman 2X* (Catálogo #4304437) que provee la mezcla de PCR para ser usada con los sets de sonda y cebadores.

**Tabla 3.2: Protocolo de amplificación para la PCR en Tiempo Real.** Mezcla de reacción conteniendo Master mix universal, cebadores/sonda y ADNc.

Amplificación. PCR Tiempo Real	
Master Mix Universal 2X	10 µl
Cebadores/Sonda 20X	1 µl
Agua	5 µl
ADNc	4 µl
Volumen final	20 µl

Se realizaron las reacciones de PCR tiempo real para los siguientes genes:

- *Genes específicos:* ANG1, ANG2, PDGF, VEGF-a, END, TSP-1, VCAM-1, SEL-E, EGFR, TGF- $\beta$ , FGF, HGF. Reportero: FAM
- *Genes constitutivos:*  $\beta$ 2Microglobulina, GAPDH. Reportero: VIC.

Todas las reacciones usaron el mismo programa de ciclado que consistió en a) Activación de la enzima (50°C durante 2 minutos), b) Desnaturalización inicial (95°C durante 5 minutos) y c) Ciclado (desnaturalización a 95°C durante 15 segundos; pegado de los cebadores y extensión de la hebra de ADN naciente a 60°C durante 60 segundos) (Figura 3.7.).

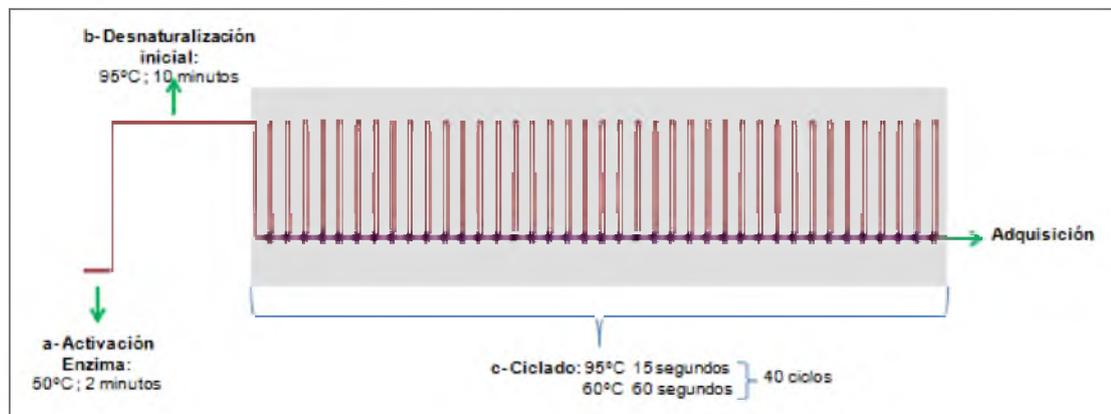


Figura 3.7: Programa de ciclado de la PCR en Tiempo Real para todos los genes en estudio. a- Activación de la enzima, b- Desnaturalización inicial, c- Ciclado general.

## 1.8. Análisis de los resultados.

### 1.8.1. Análisis de expresión génica usando *microarrays*.

En este segmento del trabajo, el análisis de expresión génica diferencial fue llevado a cabo usando muestras de aloinjertos renales a fin de identificar los cambios moleculares que ocurren en los aloinjertos con IF/TA comparados con AN. Puntualmente, como prueba de principio, se evaluó si la expresión de genes asociados al proceso de angiogénesis era diferente en el grupo IF/TA, con respecto a AN.

Los datos a nivel de las sondas se leyeron utilizando el paquete *affy Bioconductor*. El método promedio *multiarray* fue utilizado para obtener resúmenes de expresión del *probeset*. Se realizó un test T de dos muestras y los *probesets* fueron considerados

significantes usando  $\alpha=0.05$  con la corrección de Bonferoni. Además, los valores p resultantes del Test T fueron subsecuentemente usados en la obtención de la tasa de falso descubrimiento (FDR), utilizando el método de valor q.

### **1.8.2.Redes de interacción y análisis funcional.**

El análisis de ontología y de interacción de genes fue ejecutado usando *Ingenuity Pathways Analysis (IPA)*. La herramienta de IPA permite la identificación de las redes biológicas, funciones globales y las vías funcionales de un conjunto de datos en particular. El programa también brinda el valor de significancia de los genes, los otros genes con los que interactúa, y cómo los productos de los genes actúan directa o indirectamente sobre la otra, incluyendo aquellos que no participan en el análisis de microarrays. El valor p asociado con una función o una vía en el Análisis Funcional Global y Vías Canónicas Globales, es una medida de la probabilidad de que la asociación entre un conjunto de genes en estudio en un experimento y una vía sea debido al azar. Cuanto menor sea el valor de p menor será la probabilidad de que la asociación sea aleatoria y más significativa la asociación. En resumen, el valor p identifica la sobre-representación estadísticamente significativa de genes en estudio en un proceso establecido. Procesos funcionales o vías más representadas son procesos que tienen más genes en estudio de lo esperado por azar. En IPA, un valor p corregido por múltiples tests puede calcularse usando el método Benjamini-Hochberg (153). El procedimiento Benjamini-Hochberg es una forma ampliamente utilizada, una vía computacionalmente eficiente que permite a los usuarios controlar la tasa de descubrimientos falsos en pruebas de hipótesis estadísticas. Un valor p corregido puede ser interpretado como un límite superior para la fracción esperada de hipótesis nulas falsamente rechazadas (ej., la hipótesis de que la asociación de funciones/información es sólo azar) entre todas las funciones con valores p menores que P (<http://www.ingenuity.com>).

### **1.8.3.Análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real.**

Tradicionalmente, los genes que tienen expresión estable han sido empleados como controles en los ensayos de expresión génica. La medida de la expresión génica por medio de TR - PCR en tiempo real es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un

gen constitutivo (*gen housekeeping*) cuya expresión no varía en las condiciones del experimento. Hay numerosos modelos matemáticos disponibles para calcular la expresión génica normalizada (151, 154).

En este estudio, la expresión génica se analizó mediante el establecimiento de los valores de referencia y de umbral en el gráfico de amplificación para cada gen. Luego, se utilizó el ciclo umbral (Ct) para calcular los cambios en la expresión de cada gen, relativo al gen normalizador (*housekeeping*), utilizando el método  $\Delta Ct$  (Ct gen específico – Ct gen normalizador). El valor numérico del Ct se encuentra inversamente relacionado a la cantidad de amplicón en la reacción (menor Ct, mayor cantidad de amplicón) (154). Los genes que tuvieron un valor de Ct > 40 se hallaron por debajo del nivel de detección del ensayo.

### 1.9. Análisis Estadístico.

Para estimar que las diferencias observadas entre los grupos no fueron al azar así como para comparar estadísticamente los resultados entre los distintos grupos, se utilizaron los siguientes tests estadísticos.

- a- Test T-Student (\*); Prueba de Mann-Whitney.
- b- ANOVA (\*); Prueba de Kruskal-Wallis.

(\*): Cumplimiento de los supuestos de Normalidad y homogeneidad de varianza (estadística paramétrica).

El coeficiente de correlación de Pearson se empleó en la evaluación de la relación lineal entre dos variables cuantitativas. El análisis de regresión lineal simple fue utilizado para poner a prueba la dependencia de una variable “y” (orinas) con respecto a otra variable “x” (biopsias). Las regresiones logísticas simple y múltiple permitieron establecer el valor predictivo de los genes en estudio en la anticipación de los cambios que conducen a CAD. La regresión logística es un tipo de análisis de regresión utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (una variable que puede adoptar un número limitado de categorías) en función de las variables independientes o predictivas. Un valor p menor a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

## **Resultados**

## **1. Expresión de genes asociados a angiogénesis en biopsias de pacientes trasplantados renales.**

Ha sido demostrado que los cambios estructurales asociados con IF/TA contribuyen a la isquemia del tejido (vasoconstricción crónica, arterioesclerosis, transformación capilar y fibrosis intersticial) y a la mantención de un estado hipóxico (142), un estímulo fundamental para la iniciación del proceso de angiogénesis. Esto pone de relieve la importancia de investigar el papel de los factores angiogénicos en IF/TA con el fin de mejorar la comprensión de la patogénesis de la enfermedad e identificar marcadores tempranos antes de que los cambios clínicos e histológicos tengan lugar, como también favorecer nuevos objetivos para la terapia.

### **1.1. Pacientes.**

#### **1.1.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes trasplantados renales.**

En la tabla 4.1 se resumen las características demográficas y asociadas al procedimiento de trasplante de todos los grupos de pacientes, agrupados según la caracterización histológica de la biopsia. La distribución de la edad de los receptores de aloinjerto renal al momento del trasplante mostró diferencia entre el grupo NTA con una media de  $50,10 \pm 14,80$ , con respecto a RCA e IF/TA, que tuvieron  $42,48 \pm 16,35$  y  $42,19 \pm 16,10$  años respectivamente ( $p=0,0028$ ).

Un total de 48 biopsias fueron incluidas dentro del grupo NTA; el tiempo promedio desde el trasplante hasta la realización de la biopsia fue de  $1,21 \pm 1,87$  meses (rango 0 - 6 meses). El grupo RCA estuvo conformado por 27 muestras de aloinjerto con un valor medio de realización de biopsia de  $2,44 \pm 2,85$  meses (rango 0 - 9 meses) e IF/TA, con 32 muestras, tuvo una media de 52,78 meses (rango 6 - 120 meses). Se halló una diferencia significativa entre los grupos en la comparación del tiempo transcurrido desde el trasplante y la obtención de la biopsia de aloinjerto ( $p<0,0001$ ), concordante con el tiempo en que se desarrollan cada una de estas entidades clínico-patológicas en el periodo post-trasplante (155).

**Tabla 4.1: Características demográficas y clínicas de los pacientes trasplantados renales.** Variables asociadas a los pacientes y al procedimiento de trasplante, para cada uno de los grupos estudiados. La edad promedio de los pacientes y el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta la realización de la biopsia arrojaron diferencias significativas entre los grupos ( $p=0,0028$  y  $p<0,0001$ , respectivamente). Tests ANOVA y Chi Cuadrado. Valores expresados como media  $\pm$  desvío estándar.

Características demográficas y clínicas de los pacientes				
Clasificación	NTA	RCA	IF/TA	p
Pacientes (n)	48	27	32	
<b>Características receptores</b>				
	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	
Edad (años)	50,10 $\pm$ 14,80	42,48 $\pm$ 16,35	42,19 $\pm$ 16,10	<b>0,0028</b>
Género (M/F)	30 / 18	17 / 10	22 / 10	0,8336
<b>Trasplante</b>				
	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	
Tipo de donante (DV/DC)	6 / 42	6 / 21	22 / 10	0,3214
TIF (horas)	22,54 $\pm$ 13,42	23,89 $\pm$ 15,81	18,44 $\pm$ 15,12	0,1690
Tiempo Tx- Bx (meses)	1,21 $\pm$ 1,87	2,44 $\pm$ 2,85	52,78 $\pm$ 35,65	<b>&lt;0,0001</b>
MM	3,48 $\pm$ 1,18	3,15 $\pm$ 1,06	3,16 $\pm$ 1,20	0,3581
PRA	13,65	5,75	7,34	0,2540

Tx: Trasplante. Bx: Biopsia. DV: Donante Vivo. DC: Donante Cadavérico.  
PRA: Porcentaje de Anticuerpos anti-HLA. TIF: Tiempo de Isquemia Fría. MM: Missmatch HLA

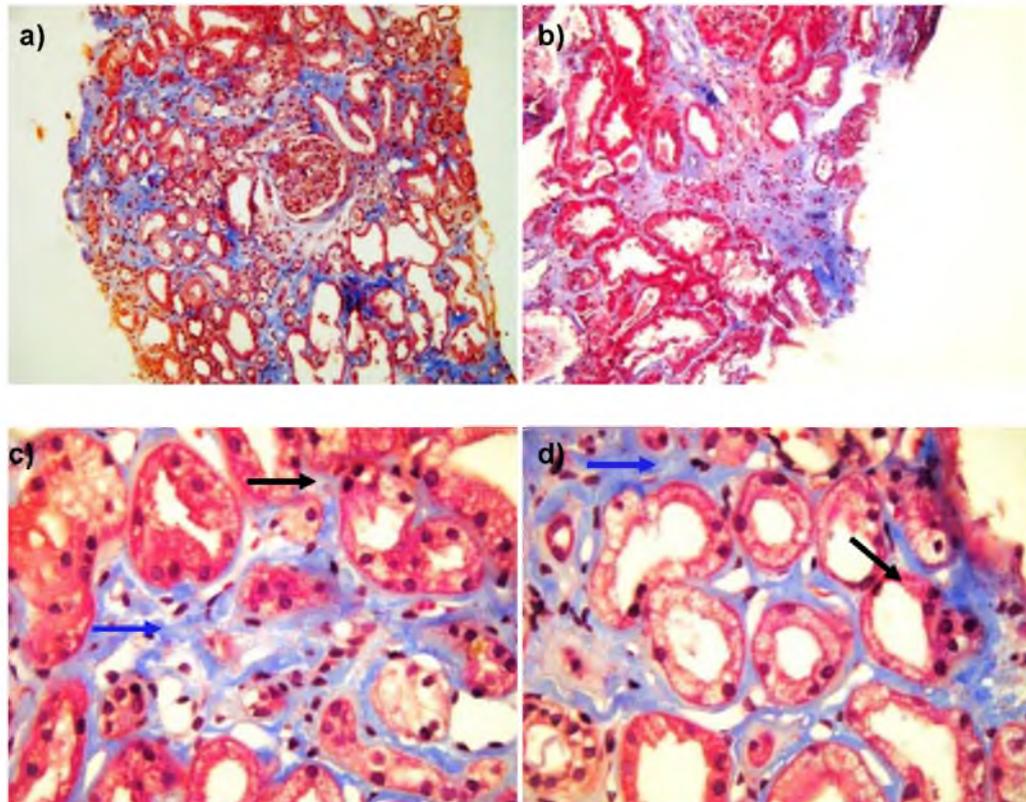
Dentro de los factores asociados al trasplante que pueden ejercer influencia sobre la expresión de los genes en estudio como tipo de donante (41) y TIF (156) no se encontraron diferencias entre los grupos, al igual que en factores inmunológicos como el número de missmatch HLA en *loci* A, B y DR, Porcentaje de Anticuerpos anti-HLA (PRA) y esquema de inmunosupresión.

## 1.2. Biopsias de aloinjerto renal.

### 1.2.1. Caracterización histológica de las biopsias en estudio.

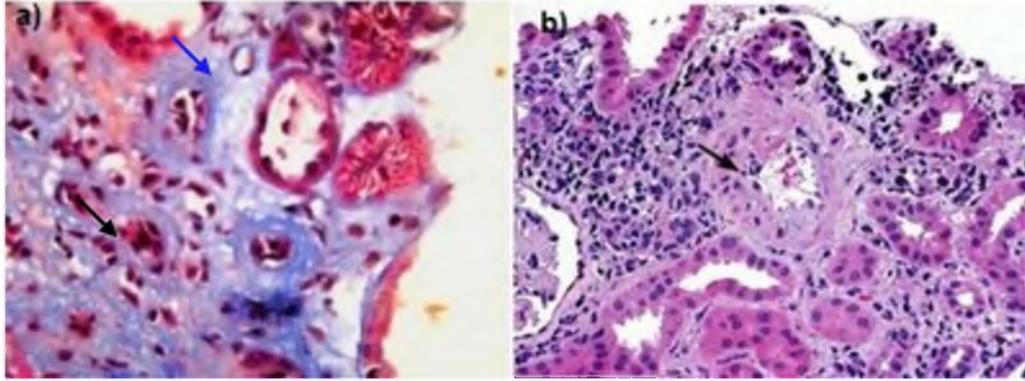
Las biopsias renales también fueron procesadas por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Privado, Centro Médico de Córdoba, donde se les realizaron las coloraciones habituales: Hematoxilina-Eosina, PAS (*Periodic Acid-Schiff*) y Tricrómico de Masson, para identificar los hallazgos característicos de las lesiones del aloinjerto renal. Algunas de las biopsias en estudio se describen a continuación, según la caracterización histológica.

*Biopsias con diagnóstico histológico de IF/TA.* Las dos lesiones principales que caracterizan CAD son las celulares y las vasculares, ambas presentes en las biopsias de los pacientes estudiados que se detallan a continuación (Figura 4.1). Los linfocitos son generalmente de tamaño mayor que los linfocitos comunes y son las responsables de la disfunción crónica. Es frecuente la disminución de la luz de los vasos debido al engrosamiento de la íntima, generalmente consecuencia de la respuesta inmune humoral también involucrada en el proceso.



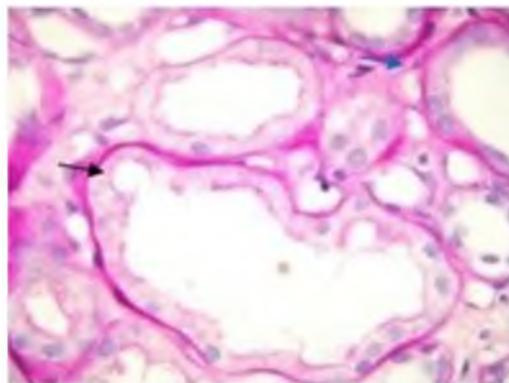
**Figura 4.1: Lesión histológica crónica: IF/TA.** Fibrosis Intersticial (flecha azul) y Atrofia Tubular (flecha negra) avanzadas, donde la fibrosis aparece teñida en color azulado. Coloración Tricrómico de Masson. Aumento X40 (a y b) y aumento X100 (c y d). Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Privado.

*Biopsias con diagnóstico histológico de RCA.* Se considera que existe RCA ante la presencia de infiltrado de linfocitos activados en el intersticio y túbulos, tal como de muestra en las imágenes correspondientes a las biopsias de los aloinjertos del grupo estudiado (Figura 4.2). En el intersticio el infiltrado se encuentra en focos o difuso y la severidad del infiltrado correlaciona con la severidad de la respuesta inmune y, en gran medida, con la presentación clínica.



**Figura 4.2: Rechazo celular agudo.** a) En el intersticio se observa infiltrado linfocítico (flecha negra) y en los túbulos aislados linfocitos intraepiteliales. Las arterias exhiben leve fibrosis de la íntima (flecha azul). Coloración Tricrómico de Masson. Aumento X100. b) Presencia de trombo en la luz de un vaso (flecha negra), hallazgo típico en rechazo agudo. Servicio de Patología Hospital Privado.

*Biopsia con diagnóstico histológico de NTA.* Las biopsias renales muestran vacuolas citoplasmáticas irregulares en el epitelio tubular renal y necrosis coagulativa focal. La isquemia severa resulta en la presencia de trombos e infiltrado de neutrófilos en los glomérulos (Figura 4.3).



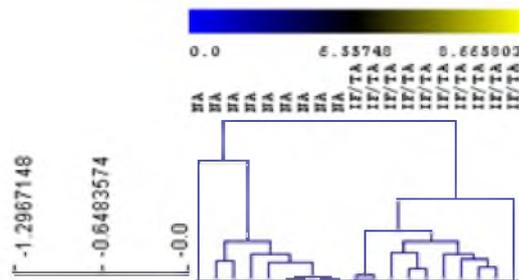
**Figura 4.3: Necrosis Tubular Aguda.** Vacuolas citoplasmáticas en el epitelio tubular (flecha negra). Los túbulos presentan necrosis tubular aguda leve. Las arterias poseen leve fibrosis de la íntima (flecha azul). Coloración Hematoxilina-Eosina. Aumento: X100. Servicio de Patología Hospital Privado.

### 1.3. Prueba de principio: Estudio de expresión génica mediante ensayos de *microarrays*.

El estudio mediante *microarrays* se utilizó como prueba de principio a fin de validar la hipótesis y justificar el desarrollo del estudio. El análisis de *microarray* identificó 8936 *probe*

sets, correspondientes a 6711 genes diferencialmente expresados entre las biopsias IF/TA vs AN.

Se realizó el análisis de conglomerado jerárquico (*Hierarchical Clustering*); el dendograma se muestra en la Figura 4.4. Las 19 muestras se agruparon según la expresión diferencial de los genes en IF/TA y AN, de acuerdo a la clasificación histológica original. Las 10 muestras clasificadas como IF/TA según los parámetros histológicos, fueron agrupadas conjuntamente según su expresión génica. De igual manera se clasificaron las biopsias AN. Ninguna biopsia fue clasificada erróneamente.



**Figura 4.4: Agrupación jerárquica de las muestras utilizando los genes diferencialmente expresados identificados.** Todas las muestras fueron clasificadas mediante la expresión génica diferencial, de acuerdo a la asignación original. Las 10 muestras clasificadas como IF/TA (histológicamente) fueron agrupadas conjuntamente según su expresión génica. De igual manera se clasificaron las biopsias AN.

### 1.3.1. Análisis de vías canónicas (*IPA, Ingenuity Canonical Pathways*).

Los conjuntos de datos que representan los genes con perfil de expresión alterado derivado del análisis de microarrays se importaron en *Ingenuity Pathway Analysis Tool (IPA tool)*; Ingenuity H Systems, Redwood City, CA, Estados Unidos, <http://www.ingenuity.com>). En IPA, los genes expresados diferencialmente fueron mapeados en redes genéticas disponibles en la base de datos *Ingenuity* y calificados por puntuación. La base del programa IPA consiste en una base de conocimientos (*Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB)*) que se deriva de las funciones e interacciones de genes publicados en la literatura disponible.

Las listas de los genes expresados diferencialmente (con FDR <5%) fueron cargados en la herramienta IPA y analizados basándose en la librería IPA de vías canónicas. La significancia de la asociación entre cada lista y una vía canónica fue medida mediante el test exacto de Fisher. Como resultado, se obtuvo un valor p, determinando la probabilidad de

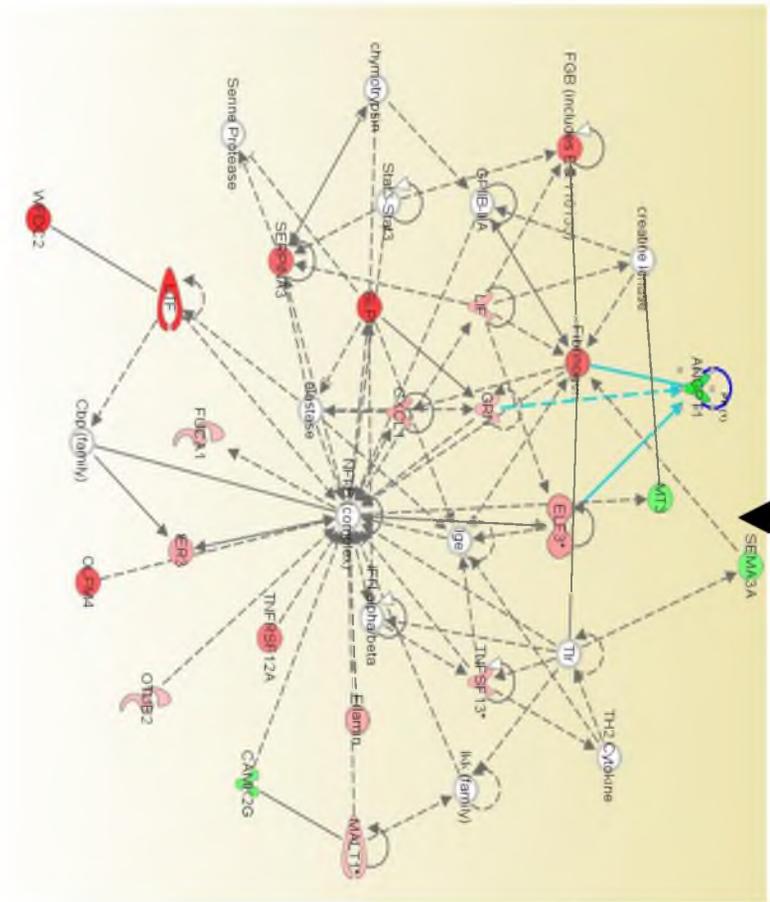
que la asociación entre los genes en el set de datos y la vía canónica pueda ser explicada solo por casualidad.

El sistema identificó los genes diferencialmente expresados en el experimento y los colocó en una red validada para establecer que las asociaciones no son al azar sino estadísticamente significativas. En la Figura 4.5 se muestra el número de moléculas sobre-reguladas (rojo), sub-reguladas (verde) y sin cambio (gris) en cada vía.

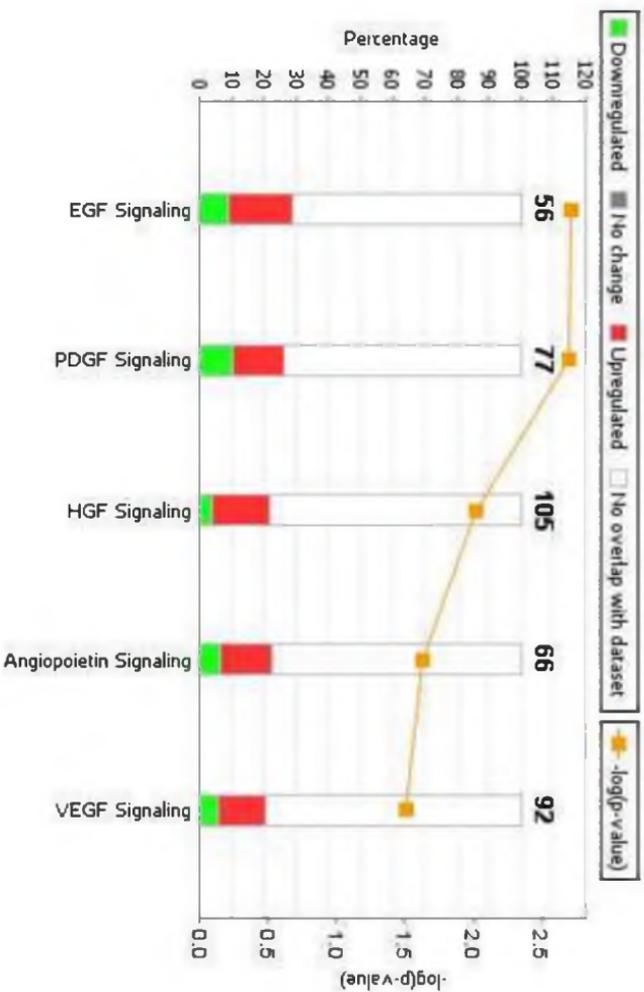
Las vías canónicas significativas para el set de datos que están involucradas en el análisis se muestran a lo largo del eje x. En el eje y se muestra el  $-\log$  del valor p el cual es calculado mediante el test exacto de Fisher. Así, las barras más altas equivalen a un aumento de la significancia.

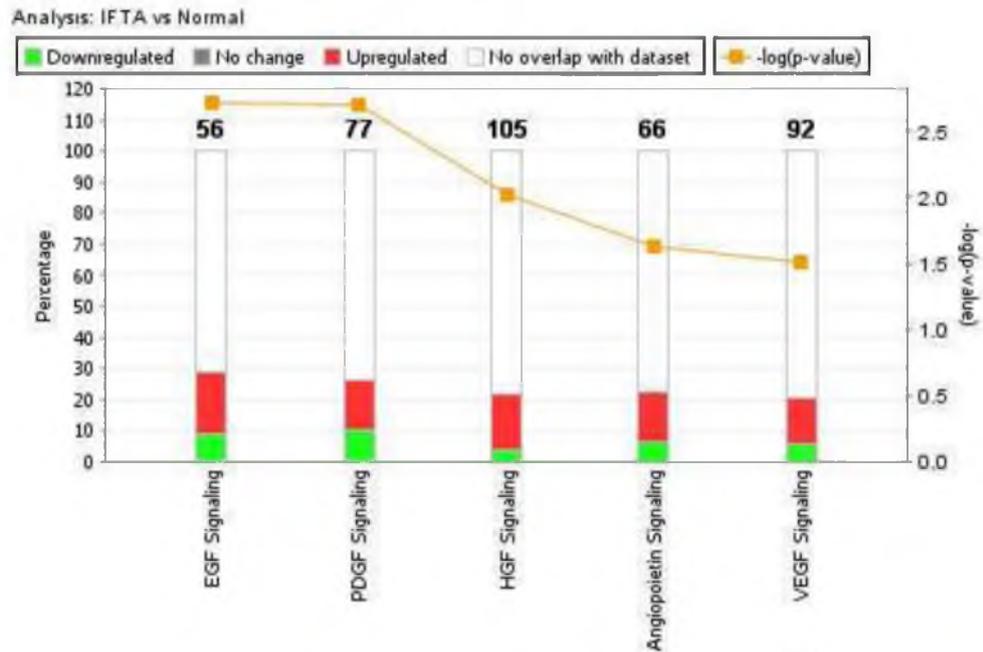
Los puntos anaranjados conectados por una línea delgada representan la relación entre el número de genes en una vía determinada que cumplen los criterios de corte, dividido por el número total de genes que componen esa vía y que están en el conjunto de genes de referencia.

b)

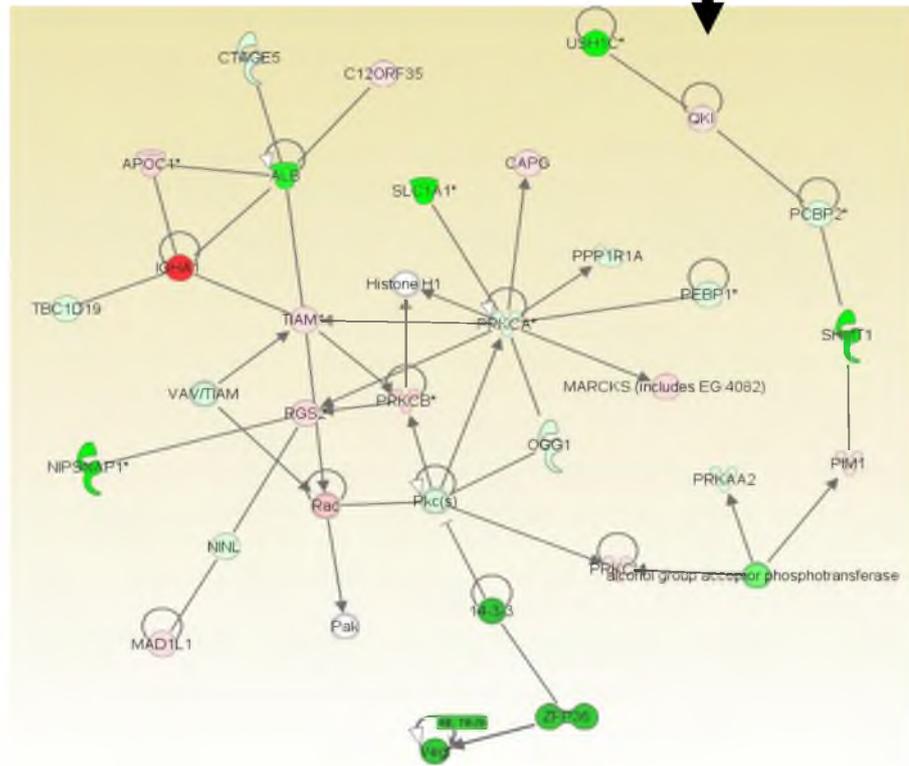


a)  
Analysis: IFTA vs Normal





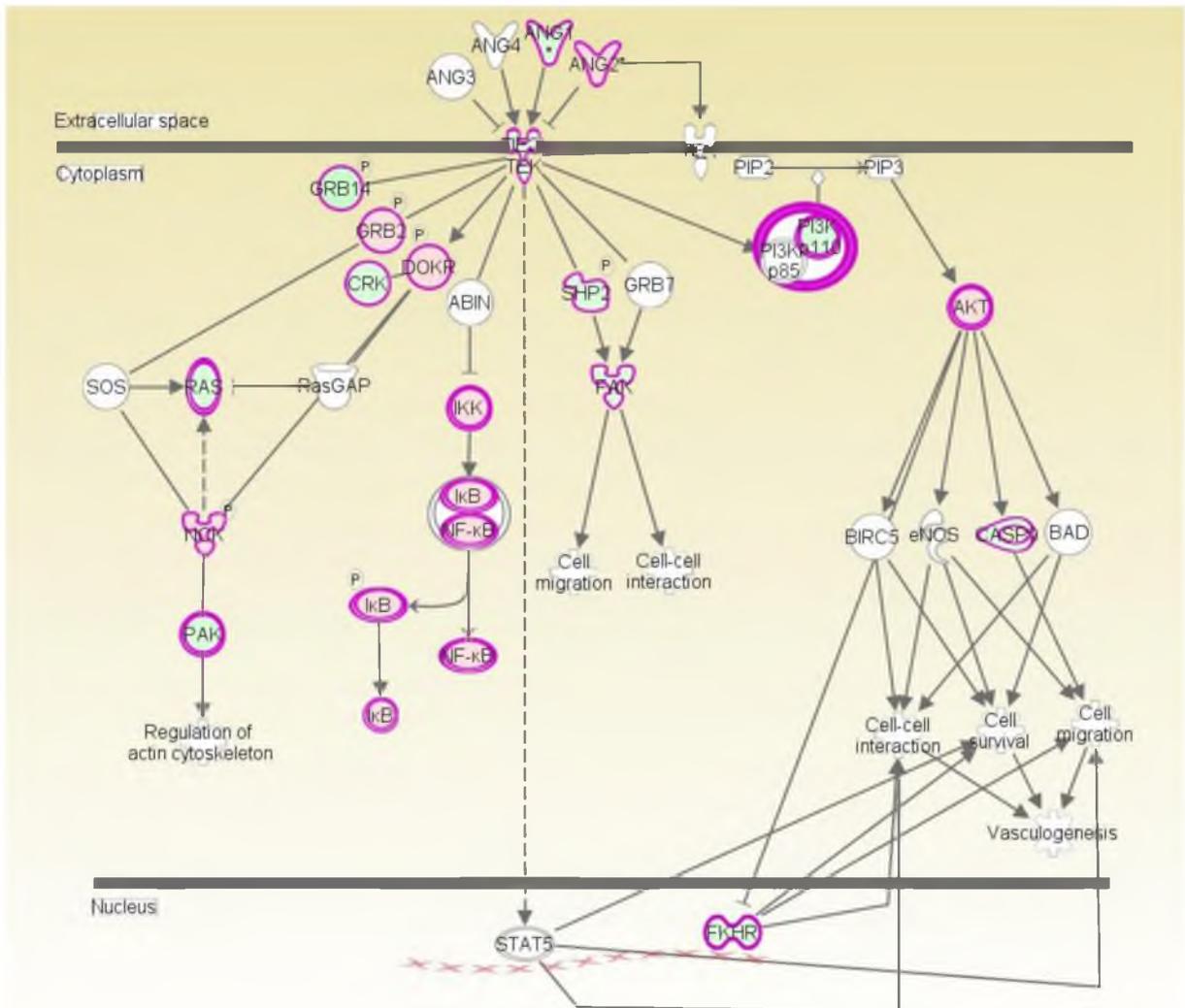
c)



**Figura 4.5: Vías canónicas identificadas del análisis de los genes diferencialmente expresados entre IFTA y AN. a)** Las vías canónicas se muestran a lo largo del eje x; el eje y exhibe  $-\log$  del valor p, el cual es calculado con el test exacto de Fisher. Cada barra representa el porcentaje de genes sobre-expresados (rojo), de expresión disminuida (verde) o no afectados / no detectados (blanco) dentro de la vía identificada. **b) y c)** Red de ANG1 y VEGF donde se identifican los genes diferencialmente expresados.

## - Señalización de ANG.

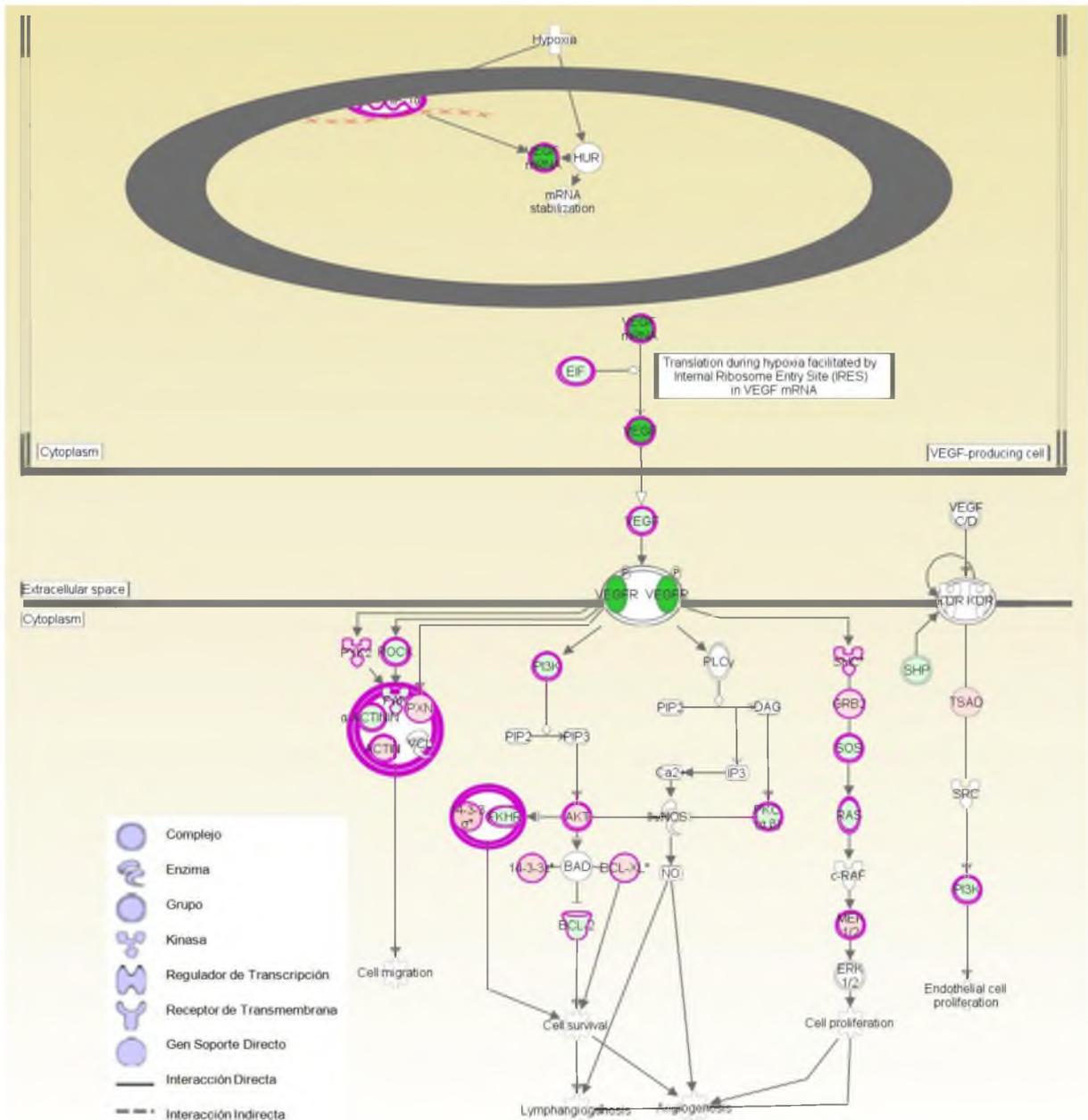
La Figura 4.7 muestra la sobre-regulación de ANG2 en las muestras IF/TA en comparación con muestras AN (significancia para la expresión génica: FDR <5%, significancia de la vía:  $p < 0,05$ ), y la sub-regulación de ANG1 para el mismo análisis, demostrando un proceso dinámico en curso.



**Figura 4.7: Representación gráfica de la señalización ANG de los genes diferencialmente expresados entre IF/TA vs AN, usando IPA.** ANG2 fue hallado significativamente sobre-regulado en las muestras de aloinjerto con IF/TA, mientras que ANG1 se encontró sub-regulada para el mismo análisis. Referencia: genes sobre-regulados ○ genes sub-regulados ○

- **Señalización VEGF.**

La familia VEGF desempeña un rol fundamental en el crecimiento y diferenciación de las células endoteliales vasculares y linfáticas. Este gen se encontró sub-regulado en las muestras con IF/TA (significancia para la expresión génica: FDR <5%, significancia de la vía:  $p < 0,05$ ). En la figura 5.8 se destacan los eventos moleculares importantes que participan en la señalización de este gen.

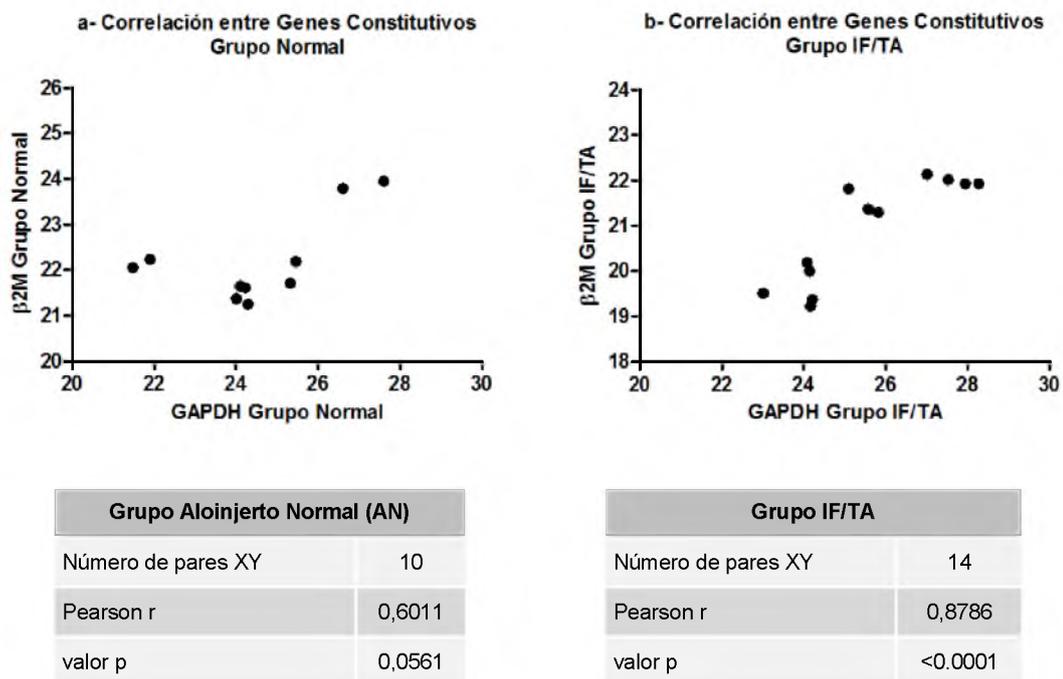


**Figura 4.6: Representación gráfica de la señalización VEGF de los genes diferencialmente expresados entre IF/TA vs AN, usando IPA.** Este gen fue hallado significativamente disminuido en las muestras de aloinjerto con IF/TA. Referencia: genes sobre-regulados (círculo rosa) sub-regulados (círculo azul)

#### 1.4. Correlación entre los genes constitutivos para el análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Los genes constitutivos se expresan como resultado de la interacción entre la ARN polimerasa y el promotor, sin necesidad de regulación adicional. Se caracterizan por tener niveles constantes en todas las células y condiciones de un mismo organismo (154).

Con la finalidad de validar la utilización de un gen constitutivo para el análisis de cuantificación relativa, se evaluaron los niveles de expresión de dos genes ( $\beta$ 2M: Beta 2 Microglobulina y GAPDH: Gliceraldehído 3 Fosfato Dehidrogenasa) para un set de biopsias de aloinjertos renales, 10 provenientes del grupo de AN y 14 del grupo IF/TA. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para dicho propósito. En la Figura 4.8 a) y b), se puede constatar que los genes constitutivos GAPDH y  $\beta$ 2M están asociados y poseen una correlación lineal positiva que se demuestra en el grupo AN y en el grupo IF/TA (Pearson  $r=0,6011$  y  $0,8786$  respectivamente).

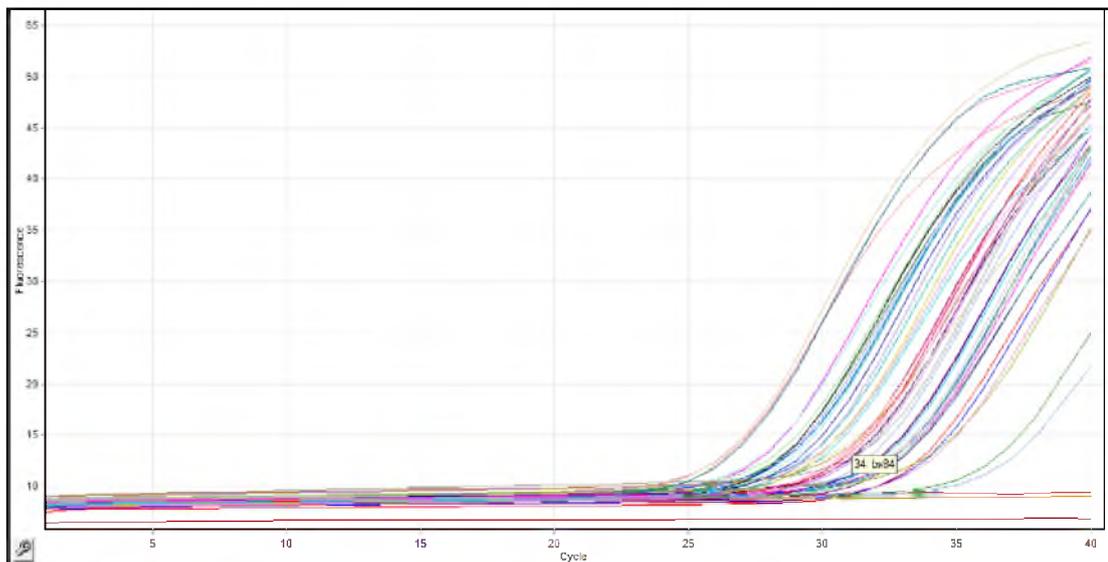


**Figura 4.8: Coeficiente de correlación de Pearson entre genes constitutivos.** Gráficos de correlación de valores Ct, para los genes *housekeeping* GAPDH y  $\beta$ 2M en dos grupos de estudio: Normal (Pearson  $r=0,6011$ ,  $p=0,0561$ ) e IF/TA (Pearson  $r=0,8786$ ,  $p<0,0001$ ).

Según los resultados obtenidos del análisis estadístico, ambos genes pueden ser utilizados para el análisis de expresión génica. Arbitrariamente se decidió utilizar  $\beta 2M$  como gen de expresión constitutiva para el análisis.

### 1.5. Reacciones específicas de los genes en estudio mediante PCR en tiempo real.

Utilizando la técnica de TR seguida de PCR en tiempo real, según se detalló en el capítulo de materiales y métodos, el ARN total extraído de cada biopsia fue utilizado en las reacciones específicas de cuantificación (Figura 4.9) para los genes específicos en estudio (VEGF, FGF, HGF, VCAM-1, SEL-E, END, TSP-1, EGF-R, TGF- $\beta$ , ANG1, ANG2) y gen constitutivo ( $\beta 2M$ ). En el gráfico de amplificación de cada gen es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal (*línea threshold* o umbral). El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (*threshold cycle*). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral (157).



**Figura 4.9: Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real.** Curva correspondiente al gen VCAM-1. En el eje x se muestra el número de ciclos de la PCR y en el eje y la fluorescencia detectada por el termociclador. Cada una de las curvas de amplificación corresponde a una biopsia de aloinjerto.

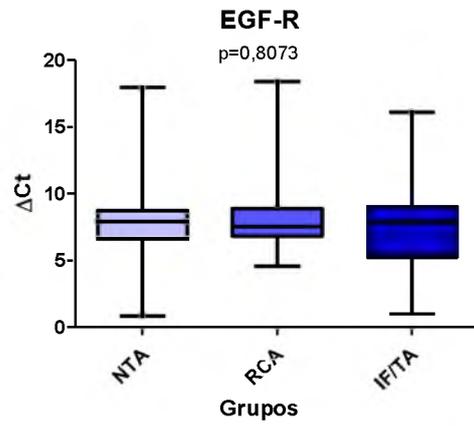
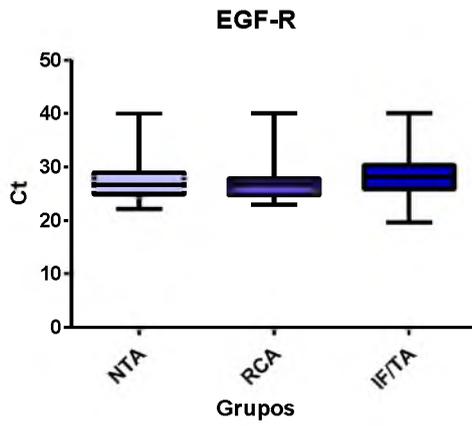
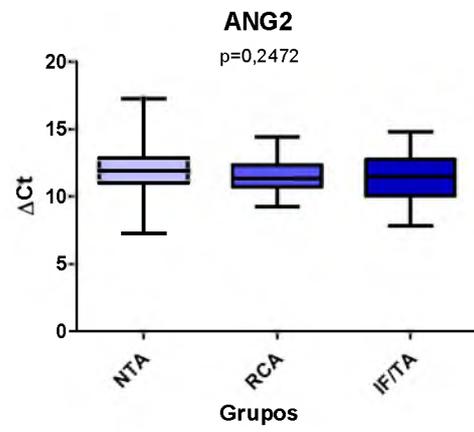
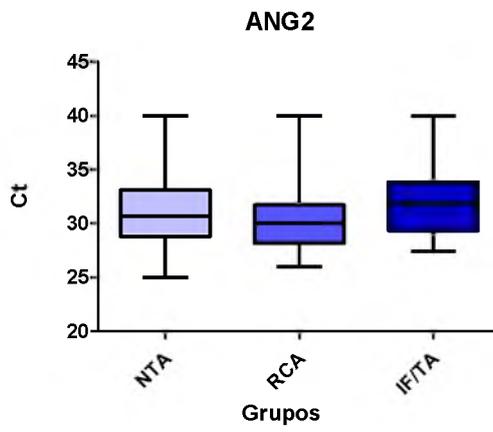
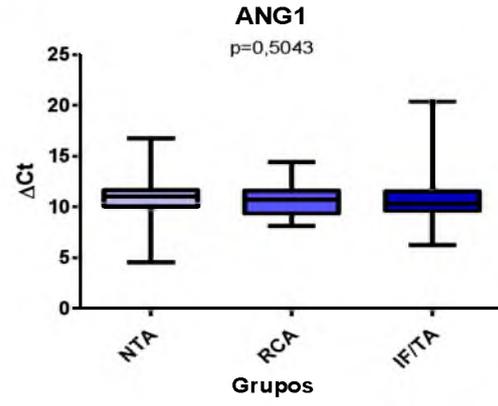
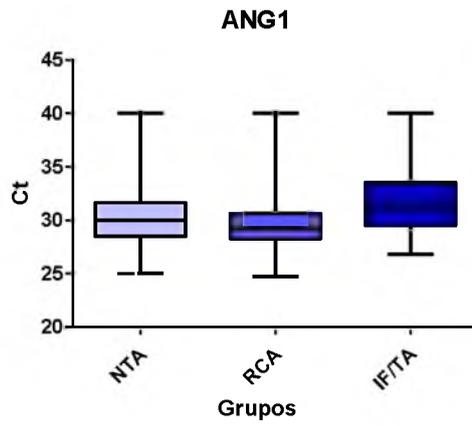
Se analizaron los niveles de expresión génica mediante el uso del método de cuantificación relativa, para cada uno de los genes específicos. Mediante un análisis de la varianza, se compararon las medias de cada uno de los grupos para los genes en estudio. Se encontraron diferencias entre los grupos histológicos para los genes END ( $p=0,012$ ) y VCAM-1 ( $p=0,0016$ ) (tabla 4.2).

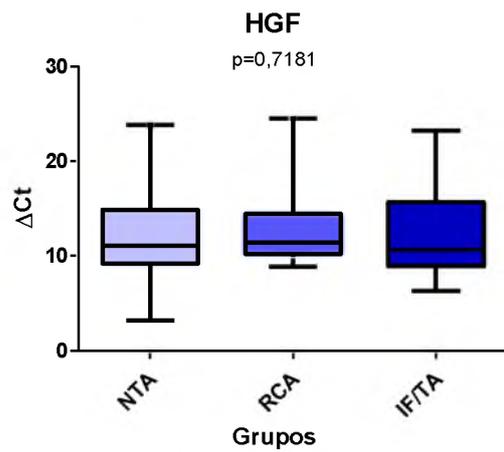
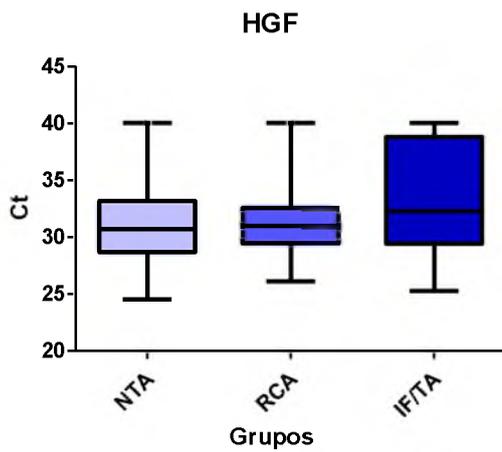
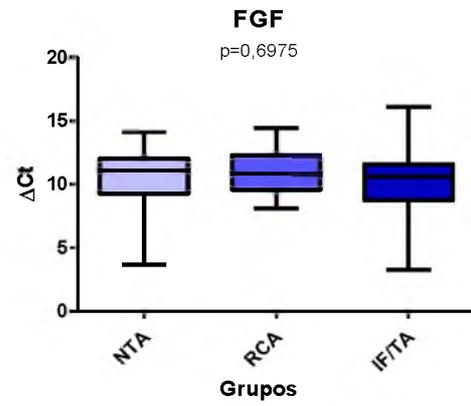
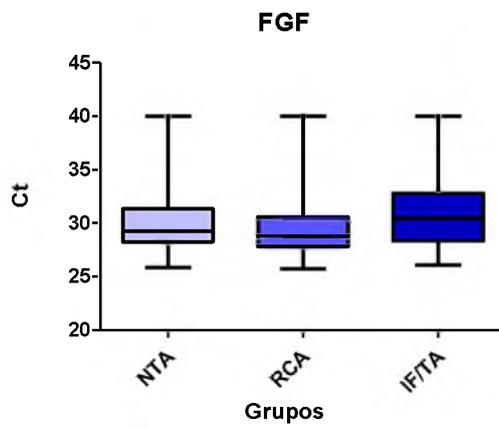
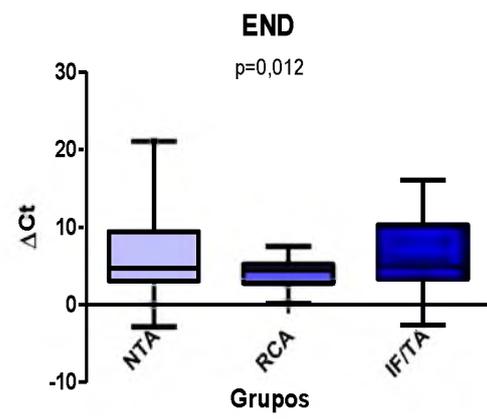
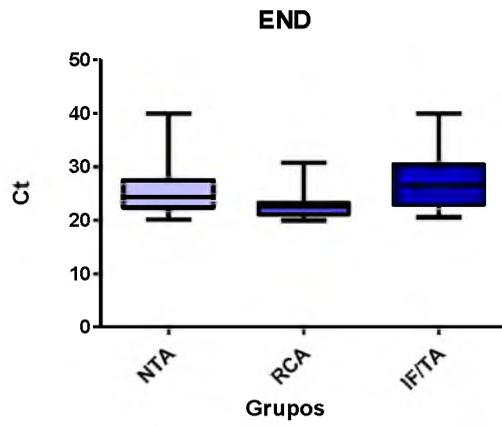
**Tabla 4.2: Valores medios  $\pm$  desviación estándar de los niveles de expresión de los genes en estudio.** END ( $p=0,012$ ) y VCAM-1 ( $0,0016$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Valores expresados como  $\Delta Ct$ .

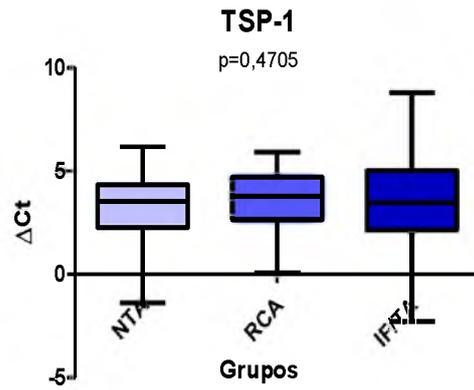
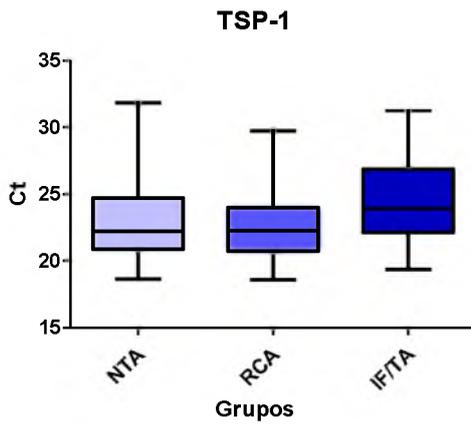
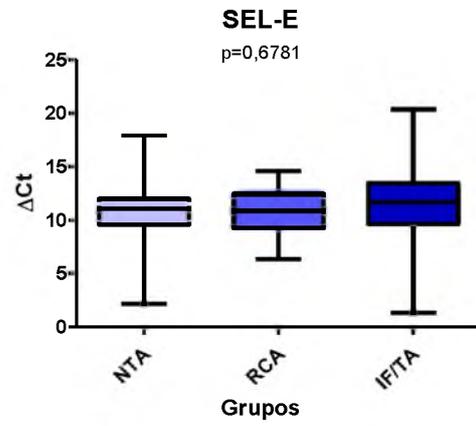
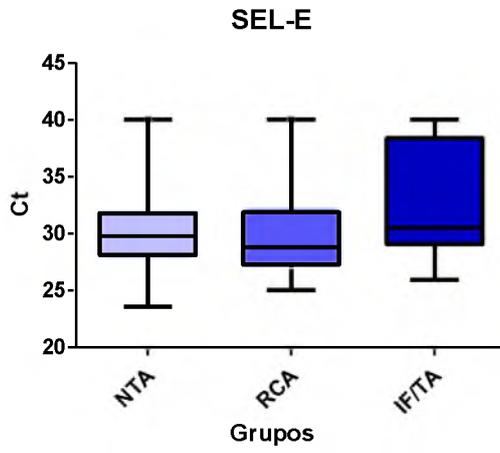
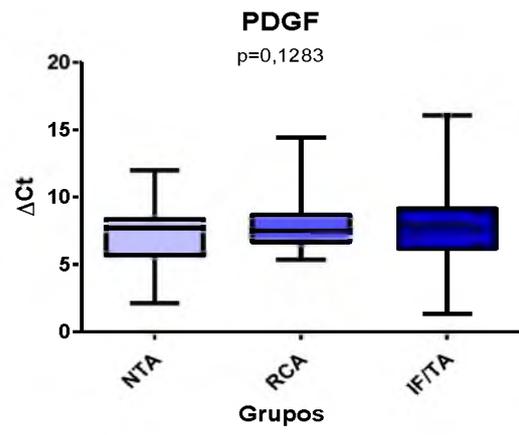
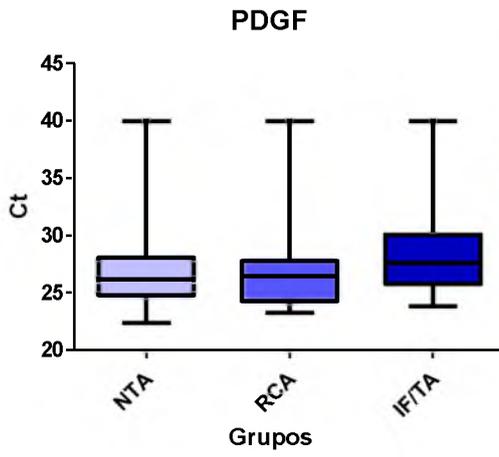
Gen	NTA (n=48)	RCA (n=27)	IF/TA (n=32)	p
ANG1	10,870 $\pm$ 1,619	10,820 $\pm$ 1,574	10,450 $\pm$ 1,534	0,5043
ANG2	11,940 $\pm$ 1,539	11,440 $\pm$ 1,202	11,440 $\pm$ 1,738	0,2472
EGF-R	7,844 $\pm$ 2,942	8,214 $\pm$ 2,797	7,731 $\pm$ 3,034	0,8073
<b>END</b>	6,151 $\pm$ 3,225	4,064 $\pm$ 1,670	6,529 $\pm$ 4,361	<b>0,0120</b>
FGF	10,850 $\pm$ 1,519	10,770 $\pm$ 1,577	10,500 $\pm$ 2,229	0,6975
HGF	12,810 $\pm$ 4,476	12,870 $\pm$ 4,005	12,080 $\pm$ 4,561	0,7181
<b>VCAM-1</b>	5,208 $\pm$ 1,451	5,419 $\pm$ 1,297	6,793 $\pm$ 2,812	<b>0,0016</b>
VEGF	4,791 $\pm$ 1,523	4,785 $\pm$ 1,091	4,813 $\pm$ 2,048	0,9973
TSP-1	3,361 $\pm$ 1,404	3,597 $\pm$ 1,427	3,789 $\pm$ 1,718	0,4705
TGF- $\beta$	5,505 $\pm$ 1,285	5,238 $\pm$ 1,183	5,739 $\pm$ 1,487	0,3817
SEL-E	11,350 $\pm$ 2,079	10,750 $\pm$ 2,332	11,220 $\pm$ 3,930	0,6781
PDGF	7,322 $\pm$ 1,638	7,574 $\pm$ 1,289	8,215 $\pm$ 2,548	0,1283

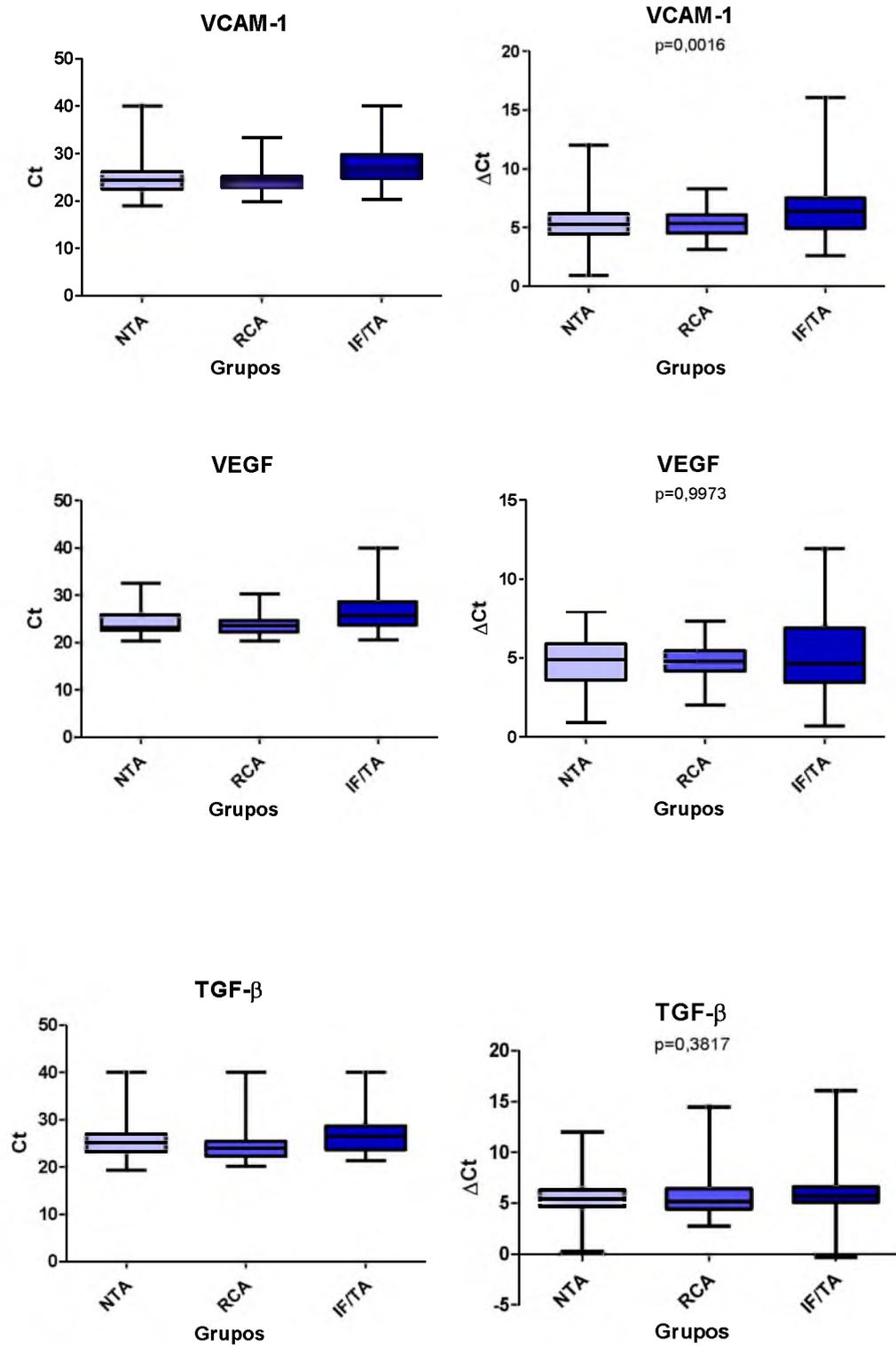
\*Test ANOVA.

En la Figura 4.10 se muestran los gráficos de los valores medios y las desviaciones estándares de los Ct para los grupos de estudio. Simultáneamente, se realizaron los gráficos correspondientes a la normalización de cada gen específico con  $\beta 2M$ . Se muestran juntos ambos gráficos para cada uno de los genes en estudio.









**Figura 4.10: Niveles de expresión de los genes evaluados.** Gráfico de la izquierda corresponde a la expresión sin normalización (Ct) y el gráfico de la derecha corresponde a la expresión con normalización ( $\Delta$ Ct) de los genes en estudio en biopsias de aloinjerto renal para los grupos NTA, RCA e IF/TA.

En el primer análisis, donde se compararon los niveles de expresión de los genes asociados a angiogénesis en los grupos de biopsias clasificadas en base a la histología, sólo dos genes mostraron diferencias significativas. END reveló una mayor expresión en el grupo RCA con un valor promedio de  $4,064 \pm 1,607$ , mientras que en los grupos NTA e IF/TA las medias fueron similares ( $6,151 \pm 3,225$  y  $6,529 \pm 4,361$ , respectivamente). El segundo gen que se encontró diferencialmente expresado fue VCAM-1, cuyos niveles de expresión en IF/TA ( $6,793 \pm 2,812$ ) fueron inferiores a los encontrados en los demás grupos histológicos [(NTA:  $5,208 \pm 1,451$ ) (RCA:  $5,419 \pm 1,297$ )].

La comparación de los niveles de ARNm de los genes en estudio en las biopsias, mostró que no existen diferencias entre el grupo IF/TA con respecto a los otros grupos histológicos (NTA, RCA). Sólo el gen VCAM-1 se encontró diferencialmente expresado en IF/TA, con niveles disminuidos.

#### **1.6. Sub-clasificación del grupo IF/TA.**

El daño renal crónico es caracterizado por cambios morfológicos. De esta manera, en el glomérulo se encuentra expansión del mesangio y glomeruloesclerosis, mientras en el intersticio tubular la modificación característica es IF/TA (155). Considerando que CAD con IF/TA es un proceso complejo donde la severidad de los cambios glomerulares, fibrosis intersticial, atrofia tubular y cambios vasculares se pueden graduar en la escala de 0 a 3 en concordancia con lesiones ausentes (0), medias (1), moderadas (2) y severas (3), se desglosó el grupo IF/TA original y se procedió a clasificar las biopsias en IF/TA grado I (n = 13) e IF/TA grado II (n = 19) (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3: Sub-clasificación histológica de las biopsias con diagnóstico de IF/TA en grado I y II.** Cambios glomerulares (g), intersticiales (i), tubulares (t) y a nivel de los vasos (v). Los cambios crónicos en glomérulos (cg), intersticio (ci), túbulos (ct) y vasos (cv) fueron clasificados en 0, 1, 2, y 3, según el grado de severidad de los mismos.

	g	cg	i	ci	t	ct	v	cv	IF/TA
Bx04	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx06	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx08	0	1	1	2	0	1	0	1	grado I
Bx14	0	1	2	2	1	2	1	1	grado II
Bx15	0	2	2	2	0	2	0	1	grado II
Bx22	0	1	2	2	1	1	0	1	grado I
Bx24	0	1	2	1	1	1	1	1	grado I
Bx39	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx43	0	1	2	2	1	1	0	1	grado II
Bx45	0	1	1	2	0	1	0	1	grado I
Bx48	0	2	1	2	0	2	0	1	grado II
Bx55	0	2	2	3	0	2	0	2	grado II
Bx56	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx59	0	1	1	2	0	2	0	2	grado II
Bx60	0	1	1	2	0	2	0	2	grado II
Bx64	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx65	0	2	1	2	0	2	0	1	grado II
Bx70	0	2	1	1	0	1	0	1	grado II
Bx71	0	2	1	1	0	1	0	2	grado II
Bx77	0	2	1	1	0	1	0	2	grado II
Bx81	0	1	1	2	0	2	0	1	grado II
Bx96	0	2	2	2	0	2	0	2	grado II
Bx99	0	1	1	1	0	1	0	0	grado I
Bx100	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx101	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I
Bx104	0	3	2	2	0	2	0	1	grado II
Bx109	0	1	1	2	1	2	0	1	grado II
Bx115	0	2	1	2	0	2	0	1	grado II
Bx117	0	1	1	1	0	2	0	2	grado II
Bx121	0	1	1	2	0	2	0	1	grado II
Bx122	0	2	2	2	0	2	0	1	grado II
Bx123	0	1	1	1	0	1	0	1	grado I

Se utilizó el test T de Student para comparar los  $\Delta Ct$  entre el grupo IF/TA grado I e IF/TA grado II (Tabla 4.4). Se encontraron diferencias significativas entre los dos subgrupos conformados a partir del grupo IF/TA primario, para los genes ANG1 ( $p=0,0351$ ), TGF- $\beta$  ( $p=0,0414$ ) y SEL-E ( $p=0,0378$ ) (Figura 4.11), demostrando que el nivel de expresión de estos genes se encuentra asociado con la severidad de los cambios en los compartimentos del aloinjerto.

**Tabla 4.4: Niveles de expresión génica para los 2 grupos clasificados como IF/TA grado I e IF/TA grado II.** ANG-1 ( $p=0,0351$ ), TGF- $\beta$  ( $p=0,0414$ ) y SEL-E ( $p=0,0378$ ) mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. Valores expresados como  $\Delta Ct$ .

Gen	IF/TA grado I (n = 13)	IF/TA grado II (n = 19)	P
<b>ANG1</b>	9,735 $\pm$ 1,457	11,470 $\pm$ 2,552	<b>0,0351</b>
ANG2	11,350 $\pm$ 1,621	11,500 $\pm$ 1,855	0,8143
EGF-R	8,968 $\pm$ 3,113	6,903 $\pm$ 2,657	0,0531
END	6,563 $\pm$ 4,878	6,024 $\pm$ 4,497	0,7496
FGF	10,220 $\pm$ 3,002	10,310 $\pm$ 2,253	0,9227
HGF	13,560 $\pm$ 4,907	11,060 $\pm$ 4,133	0,1292
VCAM-1	7,352 $\pm$ 3,677	6,409 $\pm$ 2,057	0,3601
VEGF	4,517 $\pm$ 1,982	5,536 $\pm$ 2,601	0,2422
TSP-1	3,333 $\pm$ 2,210	3,565 $\pm$ 1,895	0,7642
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	6,425 $\pm$ 2,816	5,039 $\pm$ 1,927	<b>0,0414</b>
<b>SEL-E</b>	13,190 $\pm$ 2,680	10,500 $\pm$ 3,695	<b>0,0378</b>
PDGF	8,192 $\pm$ 3,590	7,867 $\pm$ 2,175	0,7517

Test T de Student

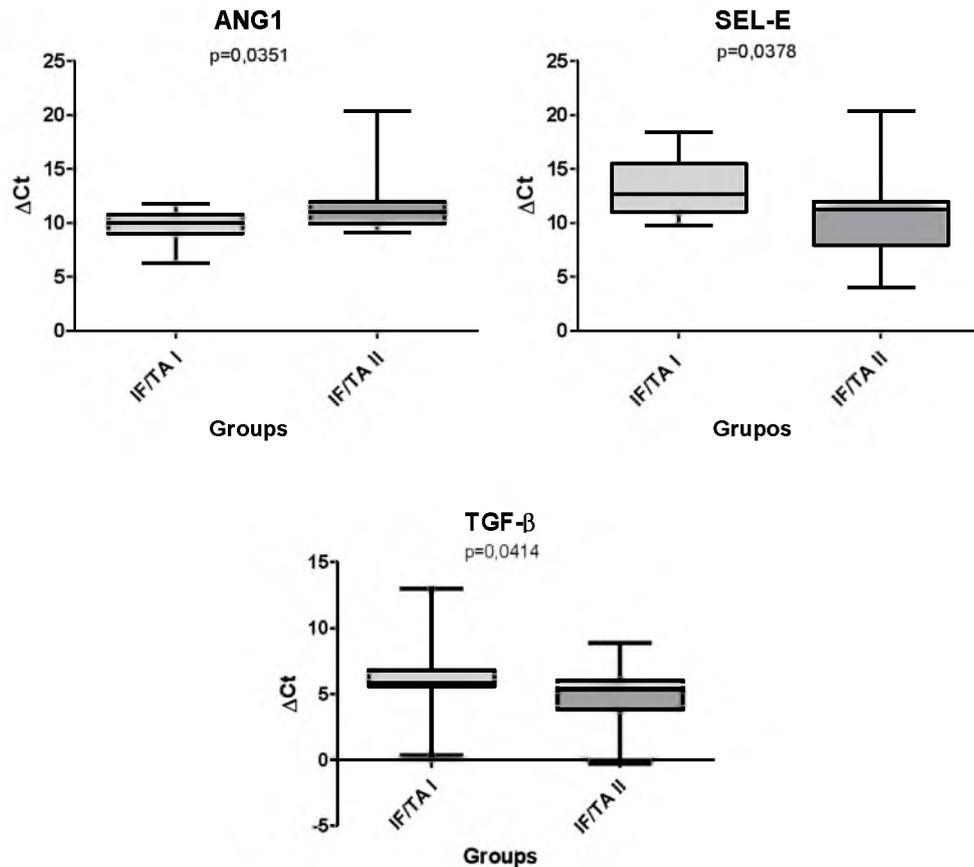
Dado que la cuantificación de la expresión génica utilizando el análisis de  $\Delta Ct$  es inversamente proporcional al nivel de expresión génica, se infiere:

$\Delta Ct$  ANG1: IF/TA grado II > IF/TA grado I

**Expresión Génica ANG1: IF/TA grado I > IF/TA grado II**

$\Delta Ct$  TGF- $\beta$  y SEL-E: IF/TA grado I > IF/TA grado II

**Expresión Génica TGF- $\beta$  y SEL-E: IF/TA grado II > IF/TA grado I**



**Figura 4.11.** Gráficos correspondientes a los genes diferencialmente expresados en los grupos IF/TA grado I e IF/TA grado II. Valores expresados como medias  $\pm$  desviaciones estándares de los  $\Delta$ Ct para los genes ANG1 ( $p=0,0351$ ), SEL-E ( $p=0,0378$ ) y TGF- $\beta$  ( $p=0,0414$ ).

### 1.7. Expresión de los genes en estudio en los grupos NTA, RCA, IF/TA grado I e IF/TA grado II.

Se compararon nuevamente los  $\Delta$ Ct de los grupos IF/TA grado I y grado II, con los  $\Delta$ Ct correspondientes a los grupos diferenciales clasificados como NTA y RCA, según la clasificación Banff (Tabla 4.5). Se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de expresión de VCAM-1 ( $p=0,0021$ ), gen que anteriormente había mostrado diferencias en los niveles de expresión sin desglosar el grupo IF/TA, y SEL-E ( $p=0,0280$ ) que mostró diferencias entre los grupos a partir de la sub-clasificación de IF/TA.

**Tabla 4.5: Comparación de la expresión génica entre los grupos NTA, RCA e IF/TA grado I e IF/TA grado II.** Valores medios de los niveles de expresión de los genes en estudio, expresados como  $\Delta$ Ct. VCAM-1 ( $p=0,0021$ ) y SEL-E ( $p=0,0280$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Gen	NTA (n = 48)	RCA (n = 27)	IF/TA grado I (n = 13)	IF/TA grado II (n = 19)	p
ANG1	10,870 ± 1,619	10,820 ± 1,574	9,735 ± 1,457	11,470 ± 2,552	0,0695
ANG2	11,940 ± 1,539	11,440 ± 1,202	11,350 ± 1,621	11,500 ± 1,855	0,4143
EGF-R	7,844 ± 2,942	8,214 ± 2,797	8,968 ± 3,113	6,903 ± 2,657	0,2276
END	6,151 ± 3,225	4,064 ± 1,670	6,563 ± 4,878	6,024 ± 4,497	0,0575
FGF	10,850 ± 1,519	10,770 ± 1,577	10,220 ± 3,002	10,310 ± 2,253	0,6104
HGF	12,810 ± 4,476	12,870 ± 4,005	13,560 ± 4,907	11,060 ± 4,907	0,3628
<b>VCAM-1</b>	5,208 ± 1,451	5,419 ± 1,297	7,352 ± 3,677	6,409 ± 2,057	<b>0,0021</b>
VEGF-A	4,791 ± 1,523	4,785 ± 1,091	4,517 ± 1,982	5,804 ± 2,391	0,1064
TSP-1	3,361 ± 1,404	3,597 ± 1,427	3,800 ± 1,495	3,781 ± 1,895	0,6819
TGF- $\beta$	5,505 ± 1,285	5,238 ± 1,183	6,425 ± 2,816	5,039 ± 1,927	0,0692
<b>SEL-E</b>	11,350 ± 2,079	10,750 ± 2,332	13,190 ± 2,680	10,500 ± 3,695	<b>0,0280</b>
PDGF	7,322 ± 1,638	7,574 ± 1,289	8,192 ± 3,590	7,867 ± 2,175	0,5046

\*Test ANOVA

### 1.8. Incorporación de biopsias de protocolo al estudio. Controles de aloinjerto normal.

La ausencia de biopsias a tiempos pautados post-trasplante (denominadas biopsias de protocolo) dentro del programa de la institución, imposibilitó la obtención de muestras de aloinjertos normales como grupo control. Mediante una colaboración con el *Translational Genomics Transplant Laboratory* de la Universidad de Virginia de los Estados Unidos fue posible incorporar al estudio las muestras AN.

La tabla 4.6 muestra las características de los grupos de estudio incluyendo los pacientes con biopsias AN. La nueva comparación de características entre los grupos incorporando los controles normales arrojó diferencias para las variables tipo de donante y PRA, además de las encontradas con anterioridad entre los grupos histológicos (edad del receptor, tiempo desde el trasplante hasta la realización de la biopsia).

**Tabla 4.6: Principales características demográficas y clínicas de los pacientes trasplantados renales del estudio, incluyendo pacientes con aloinjertos normales.** Variables asociadas a los pacientes y al procedimiento de trasplante, para cada uno de los grupos estudiados. Edad del receptor ( $p=0,0028$ ), tipo de donante ( $p=0,0184$ ), tiempo desde el trasplante hasta la realización de la biopsia ( $p<0,0001$ ) y PRA ( $p<0,0001$ ) mostraron diferencias significativas entre los grupos.

Características demográficas y clínicas de los pacientes					
Clasificación	NTA	RCA	IF/TA	AN	p
Pacientes (n)	48	27	32	33	
Características receptores					
	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	
Edad (años)	50,10 $\pm$ 14,80	42,48 $\pm$ 16,35	42,19 $\pm$ 16,10	54,55 $\pm$ 12,93	<b>0,0028</b>
Género (M/F)	30 / 18	17 / 10	22 / 10	20 / 13	0,9136
Trasplante					
	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	(media $\pm$ de)	
Tipo de donante (DV/DC)	6 / 42	6 / 21	22 / 10	0 / 33	<b>0,0184</b>
TIF (horas)	22,54 $\pm$ 13,42	23,89 $\pm$ 15,81	18,44 $\pm$ 15,12	17,79 $\pm$ 6,566	0,1690
Tiempo Tx- Bx (meses)	1,21 $\pm$ 1,87	2,44 $\pm$ 2,85	52,78 $\pm$ 35,65	28,32 $\pm$ 5,23	<b>&lt;0,0001</b>
MM	3,48 $\pm$ 1,18	3,15 $\pm$ 1,06	3,16 $\pm$ 1,20	2,94 $\pm$ 1,40	0,3581
PRA	13,65 $\pm$ 26,75	5,75 $\pm$ 10,44	7,34 $\pm$ 21,25	6,23 $\pm$ 1,19	<b>&lt;0,0001</b>

Tx: Trasplante. Bx: Biopsia. DV: Donante Vivo. DC: Donante Cadavérico.  
PRA: Panel de Anticuerpos Reactivos. TIF: Tiempo de Isquemia Fría. MM: Mismatch

Posteriormente, se realizaron las comparaciones de los niveles de expresión de los grupos IF/TA grado I, IF/TA grado II y AN. Los resultados expresados como  $\Delta Ct$  se muestran en la tabla 4.7. Se obtuvieron niveles significativamente diferentes en los genes ANG1 ( $p<0,0001$ ), ANG2 ( $p<0,0001$ ), FGF ( $p=0,0003$ ), HGF ( $p<0,0001$ ), VEGF ( $p<0,0001$ ), TGF- $\beta$  ( $p=0,0002$ ), SEL-E ( $p<0,0001$ ) y PDGF ( $p=0,0005$ ).

**Tabla 4.7: Comparación de los niveles de expresión génica para los grupos IF/TA grado I, IF/TA grado II y AN. VCAM-1 (0,7135) y TSP-1 (0,3234) fueron los genes que no mostraron diferencias significativas entre los grupos.**

Gen	IF/TA grado I	IF/TA grado II	AN	p
<b>ANG1</b>	9,73 ± 1,46	11,47 ± 2,55	5,84 ± 1,08	<b>&lt;0,0001</b>
<b>ANG2</b>	11,35 ± 1,621	11,50 ± 1,855	6,093 ± 1,044	<b>&lt;0,0001</b>
<b>FGF</b>	10,220 ± 3,002	10,310 ± 2,253	12,050 ± 1,268	<b>0,0003</b>
<b>HGF</b>	13,56 ± 4,91	11,06 ± 4,13	4,57 ± 0,69	<b>&lt;0,0001</b>
VCAM-1	7,352 ± 3,677	6,409 ± 2,057	6,825 ± 3,452	0,7135
<b>VEGF</b>	4,517 ± 1,982	5,536 ± 2,601	1,270 ± 3,733	<b>&lt;0,0001</b>
TSP-1	3,333 ± 2,210	3,781 ± 1,895	4,565 ± 3,165	0,3234
<b>TGF-β</b>	6,425 ± 2,816	5,039 ± 1,927	8,555 ± 0,945	<b>0,0002</b>
<b>SEL-E</b>	12,280 ± 4,171	10,500 ± 3,695	5,744 ± 0,994	<b>&lt;0,0001</b>
<b>PDGF</b>	8,192 ± 3,590	7,867 ± 2,175	10,900 ± 1,114	<b>0,0005</b>

Según los valores de media de  $\Delta\text{Ct}$  para cada uno de los grupos, se deduce:

$\Delta\text{Ct ANG1, ANG2, VEGF, SEL-E: IF/TA grado II} > \text{IF/TA grado I} > \text{AN}$

**Expresión Génica: ANG1, ANG2, VEGF, SEL-E: AN > IF/TA grado I > IF/TA grado II**

$\Delta\text{Ct HGF: IF/TA grado I} > \text{IF/TA grado II} > \text{AN}$

**Expresión Génica HGF: AN > IF/TA grado II > IF/TA grado I**

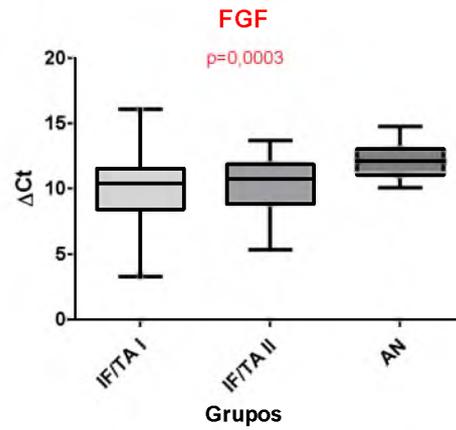
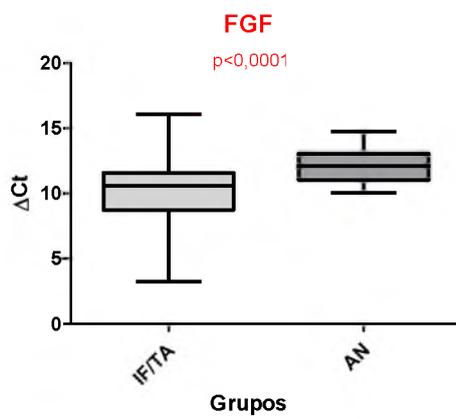
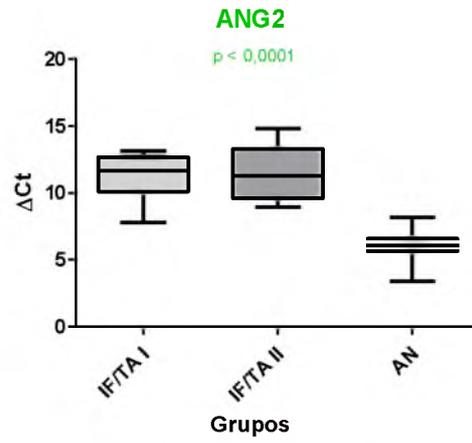
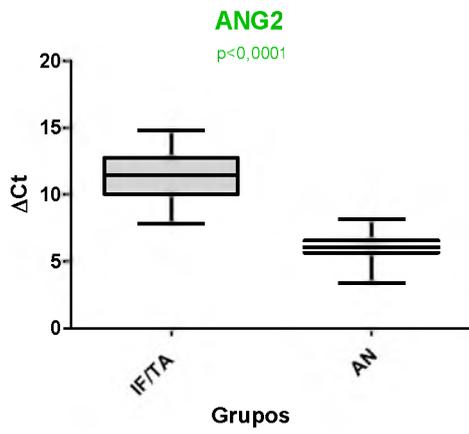
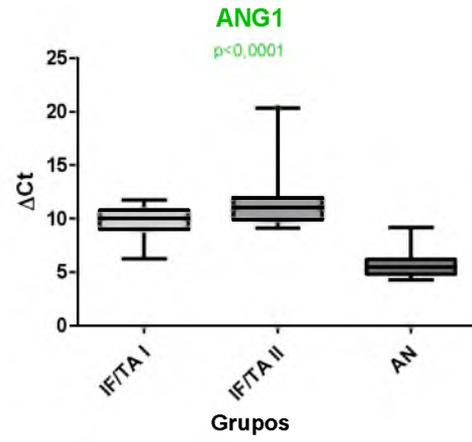
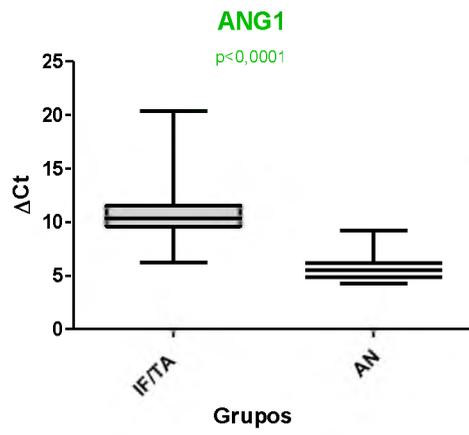
$\Delta\text{Ct FGF, PDGF: AN} > \text{IF/TA grado II} > \text{IF/TA grado I}$

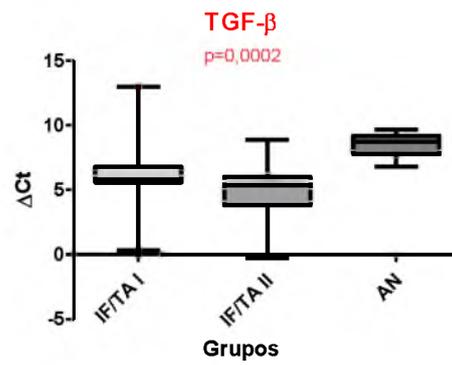
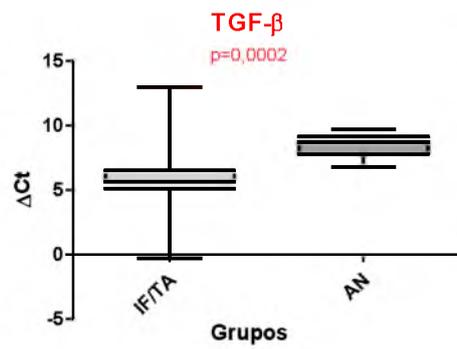
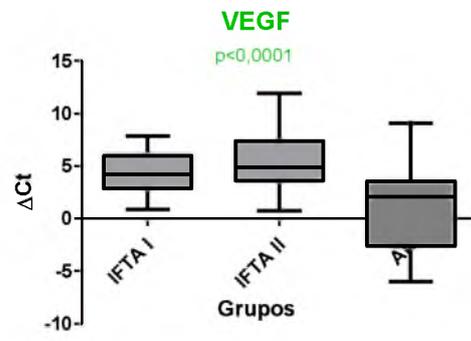
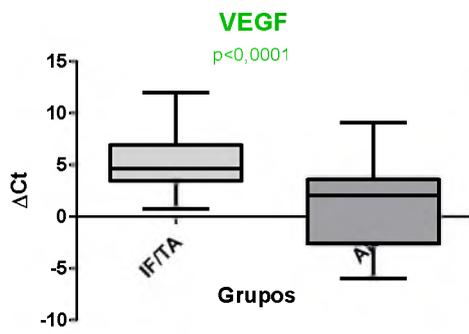
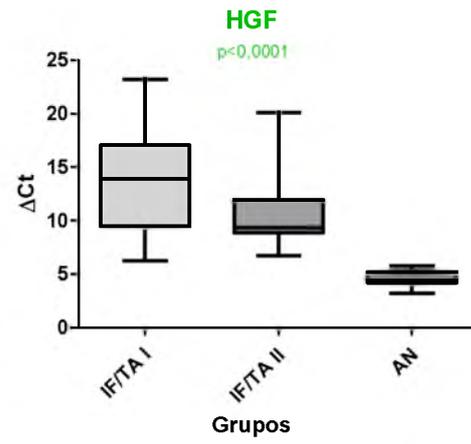
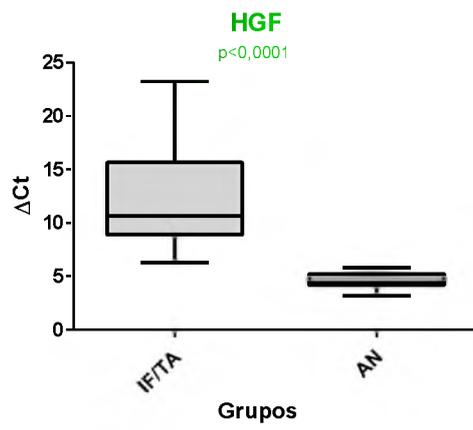
**Expresión Génica FGF, PDGF: IF/TA grado I > IF/TA grado II > AN**

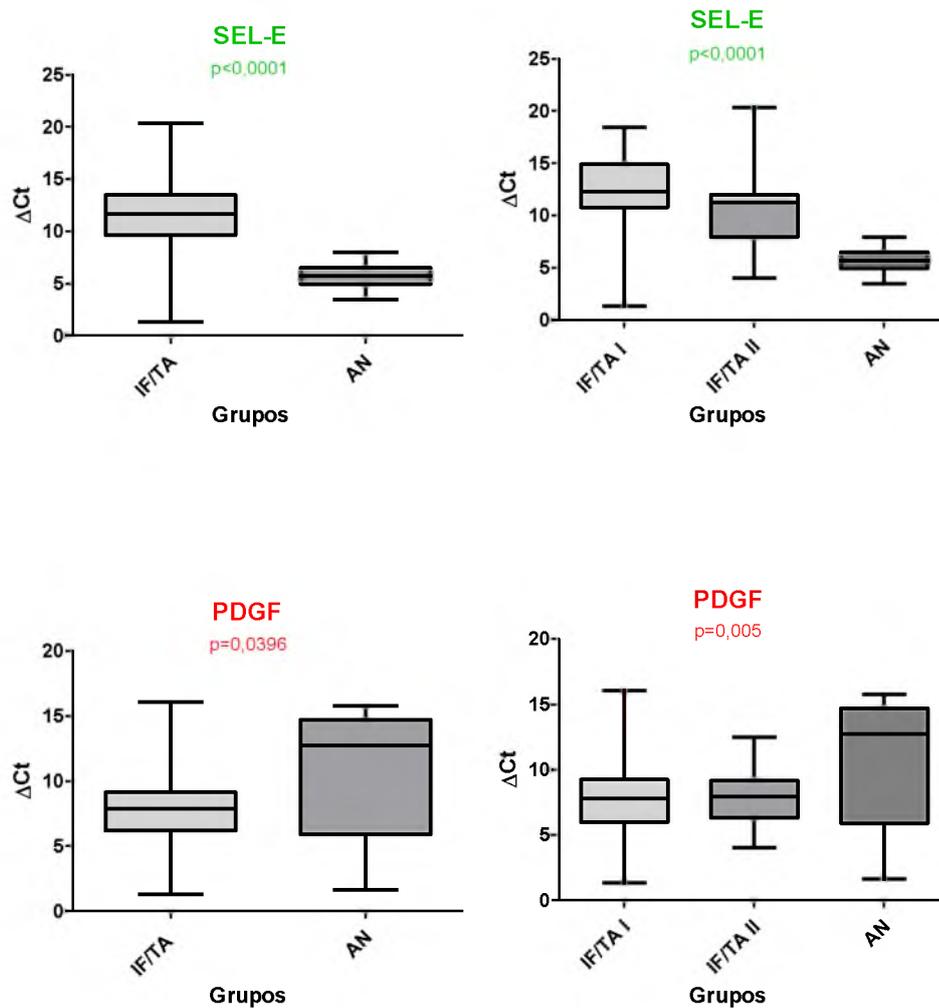
$\Delta\text{Ct TGF-}\beta\text{: AN} > \text{IF/TA grado I} > \text{IF/TA grado II}$

**Expresión Génica TGF-β: IF/TA grado II > IF/TA grado I > AN**

En la Figura 4.12 se muestran las gráficas correspondientes a los genes que fueron encontrados diferencialmente expresados en IF/TA (en verde se resaltan aquellos significativamente disminuidos y en rojo los significativamente incrementados). Por un lado, se exponen los resultados del grupo IF/TA unificado y por otro, los resultados desglosados (IF/TA grado I y II), comparados con el grupo AN.







**Figura 4.12:** Comparación de la expresión génica entre los grupos (a) IF/TA original vs AN y (b) grupos IF/TA grado I, IF/TA grado II vs AN. En verde se resaltan los genes encontrados significativamente disminuidos (ANG1, ANG2, HGF, VEGF y SEL-E) y en rojo los significativamente incrementados (FGF, TGF- $\beta$  y PDGF) en IF/TA. Los datos se muestran como media  $\pm$  desvío estándar.

### 1.9. Conclusiones.

- La angiogénesis juega un rol en el desarrollo de CAD. El estudio mediante microarrays se utilizó como prueba de principio para validar la hipótesis y justificar el desarrollo del trabajo. El empleo de esta metodología fue beneficioso para identificar genes de manera individual que participan como parte de un proceso complejo como lo es la angiogénesis. Estas vías son complejas, dinámicas, y son modificadas por reguladores que participan en las cadenas. La identificación de las señalizaciones relevantes en las biopsias diagnósticas, como por ejemplo “señalización VEGF”, “señalización ANG” representó la

base de nuestra hipótesis y justifico la evaluación de genes individuales involucrados en angiogénesis en nuestro modelo experimental: CAD.

- La comparación de la expresión génica entre los grupos histológicos NTA, RCA e IF/TA mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes END y VCAM-1.

- En la comparación de características clínicas y demográficas, el mismatch HLA no mostró diferencias entre los grupos de estudio NTA, RCA, IF/TA y AN, al igual que TIF y género del receptor. Si se hallaron diferencias para edad del receptor, donde el grupo AN mostró el valor promedio mayor; tipo de donante (el grupo AN incluyó solamente donantes cadavéricos); tiempo desde el trasplante hasta la realización de la biopsia que es concordante con la caracterización histológica de cada grupo y PRA.

- La heterogeneidad de las lesiones dentro de los compartimentos del aloinjerto con IF/TA puede promover una expresión diferencial. Esto se puso de manifiesto en la subclasificación de IF/TA en grado I y II donde se encontraron 3 genes diferencialmente expresados (ANG1, TGF- $\beta$  y SEL-E).

- La expresión de los genes ANG1, ANG2, HGF, VEGF y SEL-Ese encontró disminuida en IF/TA comparado con biopsias de aloinjerto normal. En contraparte, los genes FGF, TGF- $\beta$  y PDGF se encontraron aumentados en la misma comparación.

## **2. La orina como biomarcador del status del aloinjerto renal.**

### **2.1. Muestras apareadas.**

Para determinar si la expresión génica de factores angiogénicos en orina podía ser utilizada como reflejo de la expresión del riñón trasplantado, se realizó un ensayo de biopsias y orinas apareadas, pertenecientes al mismo receptor, ambas tomadas en el mismo momento. Un total de 13 pares de biopsias y orinas apareadas provenientes de 13 pacientes trasplantados renales fueron incluidas dentro de este segmento del estudio (Tabla 4.8). Por problemas no asociados al estudio, se perdieron 5 pares de biopsias-orinas. De los 8 pares restantes, correspondientes a 8 pacientes trasplantados renales, 6 fueron de sexo masculino y 2 de sexo femenino. Sólo uno de ellos tuvo un aloinjerto proveniente de donante vivo. De las biopsias con histología de NTA, dos biopsias fueron realizadas tempranamente (dentro

del mes de trasplante) y una a los 5 meses post-trasplante. Las biopsias con diagnóstico de IF/TA fueron realizadas luego de los 16 meses de trasplante.

**Tabla 4.8: Características demográficas y clínicas de los pacientes con biopsias y orinas apareadas.** Se utilizaron biopsias con clasificación histológica de NTA e IF/TA para la correlacionar la expresión de los genes en ambas muestras apareadas.

Nº	Sexo	Edad	Tipo Tx	Tiempo Tx-Bx*	Histología
Par 01	M	37	DC	1	NTA
Par 03	M	65	DC	1	NTA
Par 06	M	52	DC	56	IF/TA grado II
Par 07	M	21	DV	16	IF/TA grado I
Par 09	F	17	DC	19	IF/TA grado I
Par 11	F	69	DC	5	NTA
Par 12	M	66	DC	38	IF/TA grado II
Par 13	M	54	DC	24	IF/TA grado I

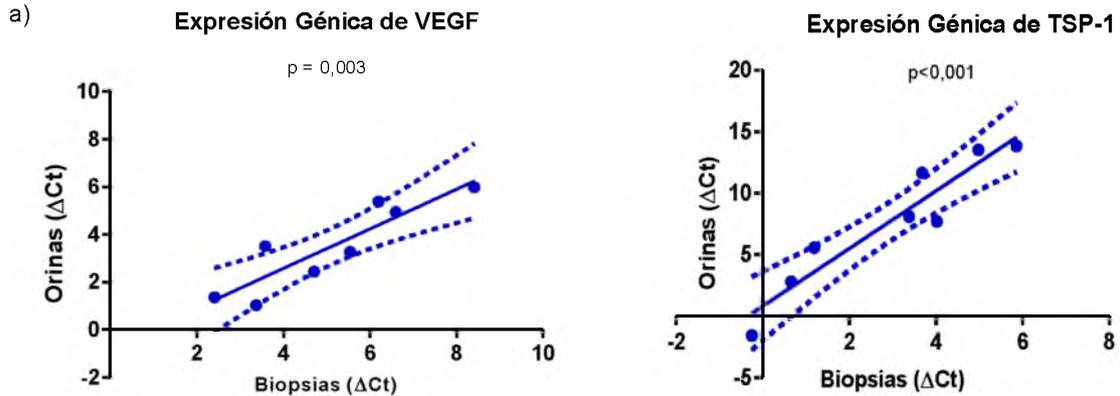
\*Tiempo desde el trasplante hasta la realización de la biopsia (meses).

### 2.1.1. Estudio de la expresión génica en las muestras apareadas.

Se estudiaron los niveles de expresión génica de las biopsias y orinas apareadas. Como era de esperar, los niveles de expresión de los genes en estudio fueron inferiores en orina con respecto a las biopsias, aunque concordantes entre cada uno de los pares. Sin embargo, hubo genes que directamente no se expresaron en las muestras de orina, y por esta razón no fueron válidos para el análisis comparativo de expresión de muestras apareadas, como por ejemplo ANG-1 y ANG-2.

### 2.1.2. Análisis de regresión lineal en muestras apareadas.

Se consideró que la relación que liga biopsias con orinas es lineal y por eso se utilizó un modelo de regresión simple. Se estableció la ecuación de la recta para cada gen, a fin de establecer el ajuste de la nube de puntos. En la Figura 4.13 se muestran los resultados obtenidos para algunos de los genes en estudio (VEGF y TSP-1), donde para VEGF, el  $R^2$  Aj=0,77 ( $p=0,003$ ) y para TSP-1, el  $R^2$  Aj=0,88 ( $p<0,001$ ). Por lo tanto, se estableció que hay regresión lineal entre las variables “biopsias” y “orinas” y que el análisis puede extrapolarse a la población para el rango de  $\Delta Ct$  estudiados.



b)

Análisis de regresión lineal					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	Ecuación de la recta	valor p
orinas VEGF	8	0,80	0,77	$y = 0,83 x - 0,76$	0,003
orinas TSP-1	8	0,90	0,88	$y = 2,345 x + 0,81$	< 0,001

**Figura 4.13: Análisis de regresión lineal para los genes VEGF y TSP-1, expresados como  $\Delta\text{Ct}$ , en muestras apareadas de biopsia y orina.** a) Representación gráfica de la regresión lineal, donde se muestran las dos bandas en torno a la recta que definen el intervalo de confianza (95%) de la mejor línea de ajuste. En el “eje x” se muestran los valores de  $\Delta\text{Ct}$  en biopsias y en el “eje y” los valores de  $\Delta\text{Ct}$  en orinas. b) Datos correspondientes al análisis de regresión lineal y ajuste de los puntos mediante la ecuación de la recta.

Para VEGF, el  $R^2$  Aj=0,77, indica que el 23% es la variabilidad no explicada por el modelo de ajuste. De la misma manera, TSP-1 posee un  $R^2$  Aj=0,88 lo que hace que la variabilidad no explicada sea de aproximadamente un 12%.

## 2.2. Conclusión.

Según muestran los resultados obtenidos, la orina es una fuente no invasiva que puede ser utilizada como reflejo de la expresión génica del riñón trasplantado para el set de genes estudiados.

### **3. Valor predictivo de la orina en la detección temprana de los cambios que conducen a IF/TA.**

“Actualmente, estamos experimentando una era de medicina predictiva. La evidencia experimental muestra la posibilidad de los marcadores moleculares en la predicción de condiciones que podrían conducir a nuevos conceptos terapéuticos. Sin embargo, hasta que se logre una posible intervención, cualquier predicción molecular parece tan inexorable como el destino. Un ejemplo corriente de destino inevitable en medicina es la falla crónica del injerto (158)”.

#### **3.1. Modelo longitudinal.**

En el modelo de estudio se propuso una evaluación prospectiva y longitudinal de orinas de pacientes trasplantados a fin de evaluar el valor predictivo de las orinas en la evolución a CAD mediante la cuantificación de los genes asociados a angiogénesis que se encontraron diferencialmente expresados en las biopsias con diagnóstico histológico de IF/TA.

#### **3.2. Características demográficas y clínicas de los pacientes.**

Treinta y cuatro pacientes fueron estudiados, 21 varones / 13 mujeres, con una edad promedio de  $55,06 \pm 11,28$  años de edad. El TIF fue de  $1211 \pm 321$ , con un rango de 607-1983 minutos. Ninguno de los receptores tuvo episodio de rechazo agudo. La inmunosupresión se basó en el triple esquema: micofenolato mofetilo, esteroides y ciclosporina / tacrolimus.

Los donantes tuvieron una edad promedio de  $45,79 \pm 17,40$  años, 20 de sexo masculino y 14 de sexo femenino (tabla 4.9).

**Tabla 4.9: Características demográficas y clínicas de los pacientes.** Variables asociadas al receptor (edad, género), al donante (edad, género) y al trasplante (tiempo en diálisis antes del tx, TIF, última creatinina del donante, episodios de rechazo agudo, DGF y eGFR), fueron registradas como factores que pueden influir en la evolución hacia CAD.

<b>Características demográficas y clínicas de los pacientes</b>	
<b>Características receptores</b>	<b>(media ± de)</b>
Edad (años)	55,06 ± 11,28
Género (M/F)	21 / 13
<b>Características donantes</b>	<b>(media ± de)</b>
Edad (años)	45,79 ± 17,40
Género (M/F)	20 / 14
<b>Trasplante</b>	<b>(media ± de)</b>
Tiempo en diálisis antes del tx (días)	1416 ± 1039
TIF (Min)	1211 ± 321
Última Cr. Donante (mg/dL)	1,08 ± 0,59
Episodio Rechazo Agudo (Si/No)	0 / 34
DGF (Si/No)	15 / 19
<b>eGFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	<b>(media ± de)</b>
eGFR a 1 semana	30,26 ± 23,94
eGFR a 1 mes	45,44 ± 19,79
eGFR a 3 meses	51,18 ± 16,13
eGFR a 6 meses	48,91 ± 13,83
eGFR a 9 meses	48,29 ± 11,98
eGFR a 12 meses	47,09 ± 18,62
eGFR a 24 meses	45,12 ± 18,78
Tx: trasplante; Cr: Creatinina.	
TIF: Tiempo de Isquemia Fría; DGF: Función Retrasada del Injerto.	

Según se describió en el Capítulo IV, se recolectaron las orinas a la semana, al mes, a los 3, 6, 9, 12 y 24 meses de trasplante y se clasificaron los pacientes a los 12 meses de trasplante según el eGFR (*NP vs P*).

### 3.2.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes, según grupos NP y P.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes, clasificados según eGFR a los 12 meses de trasplante se muestran en la tabla 4.10. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos cuando se comparó edad, género, tiempo en diálisis, tipo de donante, TIF, última creatinina del donante y episodios de rechazo agudo.

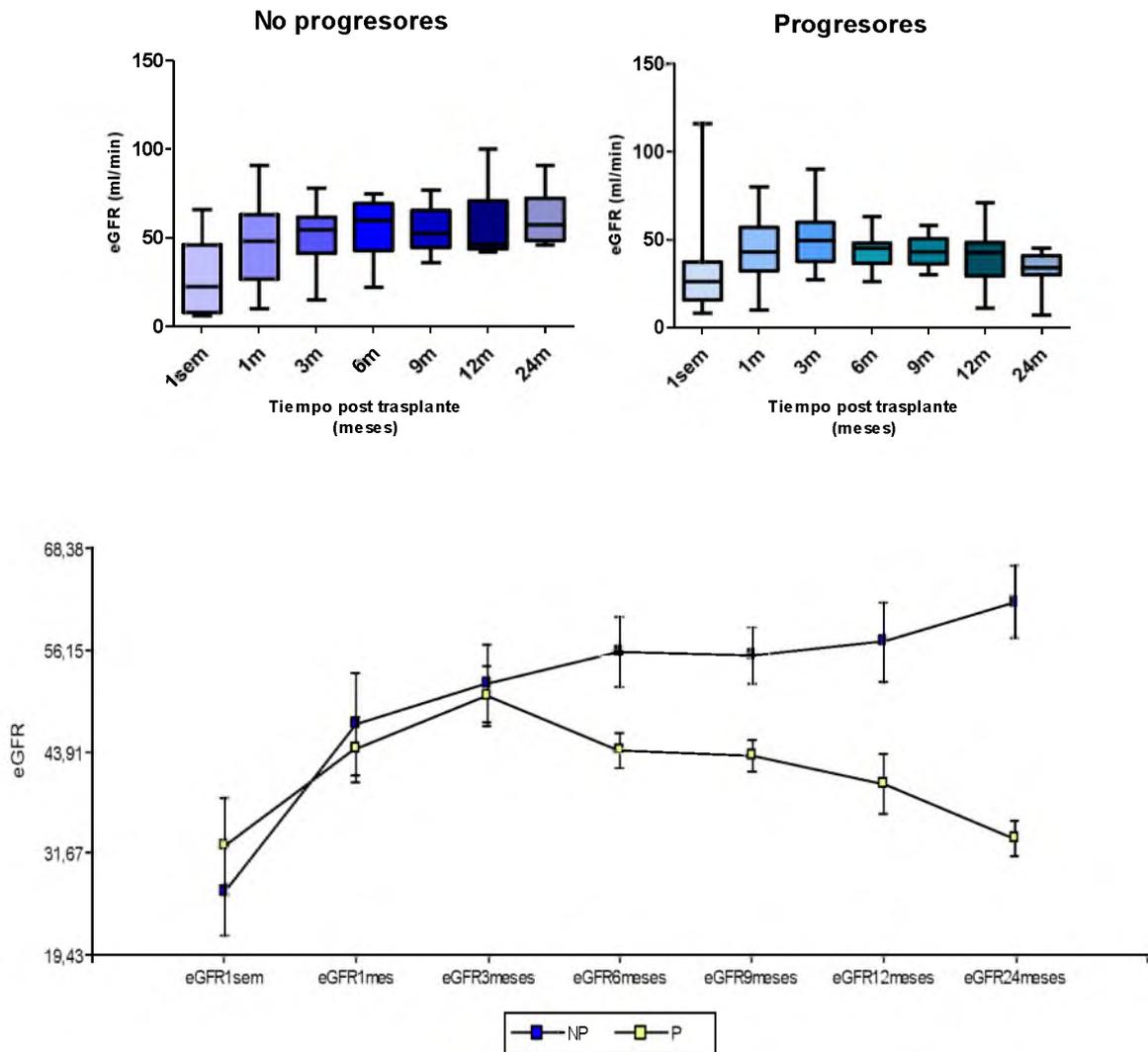
En cuanto a los eGFR, se encontraron diferencias significativas a partir de los 6 meses de trasplante. A los 3 meses de trasplante, momento en el cual se recolectaron las orinas para la cuantificación génica, los eGFR eran comparables, con valores medios en el grupo NP de  $52,00 \pm 16,95$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> y  $50,60 \pm 15,96$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> en el grupo P ( $p=0,8077$ ).

**Tabla 4.10: Características demográficas y clínicas de los pacientes clasificados según eGFR a los 12 meses de trasplante.** No se encontraron diferencias significativas en las características de los receptores, donantes y asociadas al procedimiento de trasplante. El eGFR mostró diferencias entre los grupos a partir de los 6 meses post-trasplante ( $p = 0,0101$ ).

<b>Características demográficas y clínicas de los pacientes</b>			
<b>Clasificación</b>	<b>No-Progresores</b>	<b>Progresores</b>	
<b>Pacientes (n)</b>	14	20	
<b>Características receptores</b>			
	<b>(media ± de)</b>	<b>(media ± de)</b>	
Edad (años)	54,14 ± 12,15	55,70 ± 10,91	p = 0,6984
Género (M/F)	9 / 5	12 / 8	p = 1,0000
<b>Características donantes</b>			
	<b>(media ± de)</b>	<b>(media ± de)</b>	
Edad (años)	38,93 ± 20,77	50,60 ± 13,10	p = 0,0527
Género (M/F)	9 / 5	11 / 9	p = 0,7282
<b>Trasplante</b>			
	<b>(media ± de)</b>	<b>(media ± de)</b>	
Tiempo en diálisis antes del tx (días)	1172 ± 1051	1587 ± 1022	p = 0,2584
TIF (Min)	1159,0 ± 350,2	1250,0 ± 301,5	p = 0,4278
Última Cr. Donante (mg/dL)	0,9864 ± 0,4984	1,152 ± 0,6575	p = 0,4341
Episodio Rechazo Agudo (Si/No)	0 / 14	0 / 20	
DGF (Si/No)	7 / 7	8 / 12	p = 0,7282
<b>eGFR (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>			
	<b>(media ± de)</b>	<b>(media ± de)</b>	
eGFR a 1 semana	27,07 ± 20,46	32,50 ± 26,39	p = 0,5236
eGFR a 1 mes	47,29 ± 23,13	44,15 ± 17,60	p = 0,6563
eGFR a 3 meses	52,00 ± 16,95	50,60 ± 15,96	p = 0,8077
eGFR a 6 meses	56,00 ± 16,02	43,95 ± 9,665	<b>p = 0,0101</b>
eGFR a 9 meses	55,29 ± 12,74	43,40 ± 8,780	<b>p = 0,0029</b>
eGFR a 12 meses	57,29 ± 17,79	39,95 ± 15,99	<b>p = 0,0056</b>
eGFR a 24 meses	61,79 ± 16,21	33,45 ± 9,197	<b>p &lt; 0,0001</b>

TIF: Tiempo de Isquemia Fría; DGF: Función Retrasada del Injerto

En la Figura 4.14, se muestra de manera gráfica el ascenso del eGFR en el grupo de pacientes NP y descenso en el grupo P a lo largo del tiempo.



**Figura 4.14: Evolución del promedio de eGFR a lo largo del tiempo en los grupos NP y P.** En el primer grupo, los valores de eGFR ascienden progresivamente y en el segundo grupo, los valores descienden a lo largo del tiempo. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

Con la finalidad de determinar si alguna de las variables cualitativas analizadas podía influir en la evolución de los pacientes hacia NP o P, se realizó una tabla de contingencia (Tabla 4.11) y se utilizó el test Chi-Cuadrado para contrastar la relación de dependencia/independencia entre las variables objeto de estudio. Se demostró que ninguna de las variables cualitativas analizadas (género receptor, género donante y DGF) estuvo asociada a la progresión hacia CAD ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 4.11: Tabla de contingencia para pronóstico (NP o P) y tres variables cualitativas: Género receptor ( $p=0,8002$ ), Género donante ( $p=0,5882$ ) y DGF ( $p=0,5633$ ). Ninguna de estas variables se encontró asociada a la progresión hacia CAD.**

		NP		P		Total	Est.	p
		Pacientes	%	Pacientes	%			
Género receptor	F	5	38,46	8	61,54	13	0,06	0,8002
	M	9	42,86	12	57,14	21		
Género donante	F	5	35,71	9	64,29	14	0,29	0,5882
	M	9	45	11	55	20		
Función Tardía del Injerto	no	7	36,84	12	63,16	19	0,33	0,5633
	si	7	46,67	8	53,33	15		

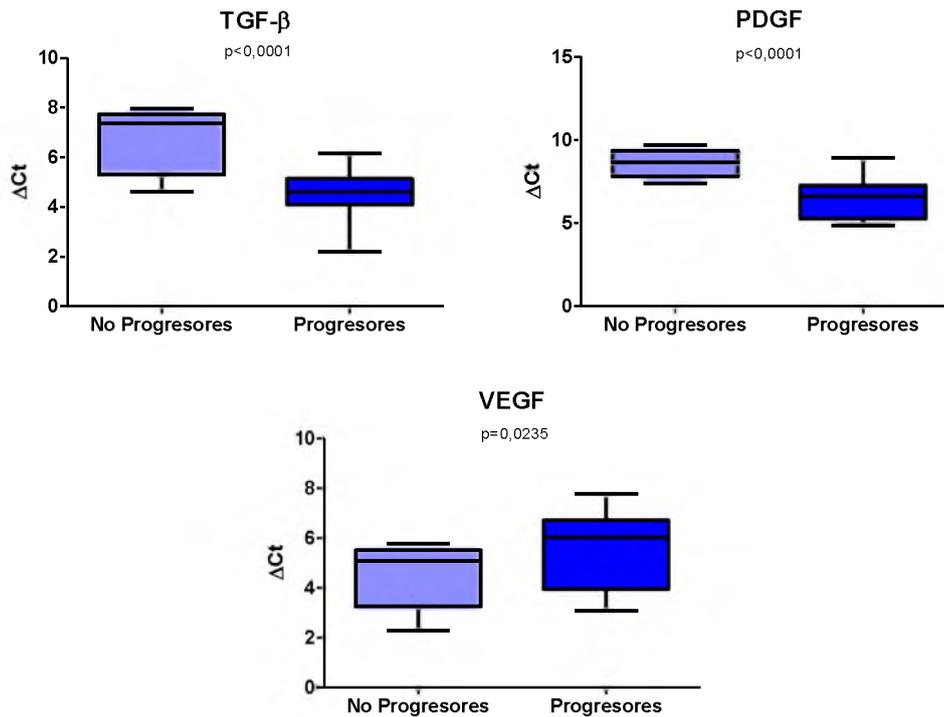
Est.: Estadístico

### 3.2.2. Análisis de la expresión génica en los grupos NP y P.

Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes encontrados diferencialmente expresados en las biopsias con diagnóstico de IF/TA (objetivo 1), que tuvieron correlación en la expresión de muestras apareadas biopsia-orina (objetivo 2), en los grupos NP y P. Estos genes fueron: HGF, VEGF, TGF- $\beta$ , SEL-E y PDGF. En la tabla 4.12 se muestran los resultados obtenidos de los genes estadísticamente significativos, donde TGF- $\beta$  y PDGF se encontraron incrementados en el grupo P ( $p < 0,0001$  en ambos casos) y VEGF disminuido ( $p = 0,0235$ ) (Figura 4.15).

**Tabla 4.12. Niveles de ARNm de los genes diferencialmente expresados.** De los genes diferencialmente expresados en IF/TA que fueron cuantificados en las orinas a  $t=3$  meses de los grupos NP y P, sólo 3 de ellos arrojaron diferencias significativas: TGF- $\beta$  ( $p < 0,0001$ ) y PDGF ( $p < 0,0001$ ) se hallaron aumentados y VEGF ( $p = 0,0235$ ) disminuido en P. Valores expresados como  $\Delta Ct$ .

Gen	NP (n=14)	P (n=20)	p
TGF- $\beta$	6,601 $\pm$ 1,294	4,546 $\pm$ 0,892	<0,0001
PDGF	8,575 $\pm$ 0,830	6,519 $\pm$ 1,186	<0,0001
VEGF	4,408 $\pm$ 1,265	5,534 $\pm$ 1,419	0,0235
Orinas recolectadas a los 3 meses post-trasplante			



**Figura 4.15:** Niveles de expresión de los genes TGF- $\beta$ , PDGF y VEGF en los grupos NP y P. Se muestra de manera gráfica la distribución de la media  $\pm$  desvío estándar de los  $\Delta$ Ct correspondientes a los tres genes encontrados diferencialmente expresados entre los grupos.

### 3.2.3. Valor predictivo de la orina en la progresión a IF/TA.

Con la finalidad de encontrar el mejor predictor en el menor tiempo post trasplante, se analizaron los datos de eGFR y expresión génica. En la tabla 4.13 se muestra que a excepción de eGFR 3 meses ( $p=0,7891$ ), todas las demás variables pudieron ser utilizadas para predecir pronóstico, es decir, la evolución hacia P.

**Tabla 4.13:** Variables evaluadas como predictivas de P. Se analizaron los eGFR a diferentes tiempos post trasplante y la expresión de los genes TGF- $\beta$ , PDGF y VEGF a los 3 meses de trasplante.

Variables	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald Chi <sup>2</sup>	valor p
eGFR3meses	-0,01	0,02	0,99	0,95	1,04	0,07	0,7891
eGFR6meses	-0,08	0,03	0,93	0,87	0,99	5,47	<b>0,0194</b>
eGFR9meses	-0,11	0,04	0,9	0,83	0,97	6,62	<b>0,0101</b>
eGFR12meses	-0,07	0,03	0,93	0,88	0,99	5,4	<b>0,0201</b>
TGF $\beta$ 3meses	-1,86	0,71	0,16	0,04	0,63	6,87	<b>0,0088</b>
PDGF3meses	-2,01	0,69	0,13	0,03	0,51	8,61	<b>0,0034</b>
VEGF3meses	0,6	0,28	1,83	1,05	3,16	4,6	<b>0,0319</b>

A los fines de predecir la evolución del aloinjerto en el menor tiempo post trasplante, se trabajó con las variables a t=3 meses. Por un lado, se evaluó si cada una de las variables tomadas por separado a los 3 meses de trasplante eran buenas predictoras de evolución a CAD. El análisis de regresión logística simple demostró que PDGF ( $p=0,0034$ ), TGF- $\beta$  ( $p=0,0088$ ) y VEGF ( $p=0,0319$ ) tienen la capacidad de predecir.

Posteriormente se realizó un modelo de regresión logística múltiple, paso a paso hacia atrás o *stepwise backward*, mediante el cual se buscó la mejor combinación de genes para predecir pronóstico. La selección de variables predictivas es un procedimiento estadístico importante porque no todas las variables tienen igual importancia. En este caso, se comenzó con el modelo completo y en cada paso se evaluó la eliminación de una variable del modelo, según si el estadístico de T, en valor absoluto, era el más pequeño entre las variables incluidas aún en el modelo, o si la variable tenía una correlación parcial (en valor absoluto) más pequeña con la variable respuesta, tomando en cuenta las variables aún presentes en el modelo. Es decir, en la eliminación hacia atrás se introducen todas las variables en la ecuación y luego se van excluyendo una tras otra. En cada etapa se elimina la variable menos influyente según el contraste individual (de la t o de la F). El “Wald Chi-Cuadrado” permite contrastar si el coeficiente es significativamente diferente de 0 y el valor p para ese contraste (159).

El modelo de regresión hacia atrás, mostró que las variables PDGF (3 meses) y TGF- $\beta$  (3 meses) son suficientes para predecir pronóstico (tabla 4.14). El análisis excluye al gen VEGF, considerando que los dos genes anteriores son suficientes para predecir pronóstico.

**Tabla 4.14: Modelo de Regresión logística múltiple hacia atrás (*Stepwise backward*).** Se introducen todas las variables en la ecuación y en cada etapa se elimina la variable menos influyente según el contraste individual (de la T o de la F). La variable VEGF (3 meses) fue excluida del modelo.

Genes	Est.	E.E	Wald Chi-Cuadrado	valor p
PDGF (3meses)	-2,54	1,21	4,39	0,0362
TGF- $\beta$ (3meses)	-3,35	2,06	2,65	0,1035

Est. Estadístico; E.E: Error Estándar.

Posteriormente, a fin de incrementar la practicidad en la predicción, se utilizó el método de análisis discriminante. Este tipo de análisis ayuda a identificar las características que diferencian a dos o más grupos y a crear una función capaz de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de uno u otro grupo (160). El análisis discriminante separó

a los dos grupos de estudio estableciendo el mejor valor de corte (expresado como  $\Delta Ct$ ) para ambos genes del modelo predictivo.

**PDGF (3meses): 7,25**

**TGF- $\beta$  (3meses): 5**

Según este análisis y para el gen PDGF, el 100% de los pacientes con valores menores a 7,25 pertenecieron al grupo P, mientras que el 73,7 % de los pacientes con PDGF mayores o iguales a 7,25 formaron parte de NP (tabla 4.15).

**Tabla 4.15: Distribución de los pacientes en NP y P según PDGF 3 meses.** Todos los pacientes NP se agruparon en  $\geq 7,25$  mientras que el grupo P estuvo subdividido en  $< 7,25$  (n= 15) y  $\geq 7,25$  (n=5).

		NP		P		Total	Est.	P
		Pacientes	%	Pacientes	%			
<b>PDGF 3 meses</b>	Menor a 7,25	0	0	15	100	15	18,79	<0,001
	Mayor o igual a 7,25	14	73,7	5	26,3	19		

Con sólo esta variable como predictiva se obtuvo:

-Sensibilidad: 75%

-VPP: 100%

-Especificidad: 100%

-VPN: 74%

(Tomado de: <http://www.samiuc.es/index.php/estadisticas-con-variablesbinarias/indicadores-en-pruebas-diagnosticas/calculador-de-indicadores-en-pruebas-diagnosticas.html>).

Combinando ambas variables (PDGF y TGF- $\beta$ ), 15 de los pacientes pertenecientes al grupo P se agruparon en PDGF  $< 7,25$  y los 5 restantes en el grupo PDGF  $\geq 7,25$  y TGF- $\beta$   $< 5$ . En el grupo NP, 13 pacientes se incluyeron en TGF- $\beta$   $\geq 5$  y sólo uno no estuvo comprendido dentro de este parámetro de inclusión de los integrantes del grupo NP (tabla 4.16). De esta manera, re-estructurando lo obtenido se puede observar que "A+B" incluyó a la totalidad de los pacientes del grupo P, mientras que C abarcó a 13 de los 14 miembros del grupo NP. La tasa de error de clasificación de los pacientes como P o NP fue  $1/34=0,0294$ , aproximadamente 3%.

**Tabla 4.16: Distribución de los pacientes en NP y P según PDGF 3 meses (valor de corte=7,25) y TGF- $\beta$  3 meses (valor de corte=5).** Sólo un paciente perteneciente al grupo NP fue erróneamente clasificado por el modelo de análisis discriminante.

		NP	P	
PDGF 3 meses	TGF- $\beta$ 3 meses	Pacientes	Pacientes	
Menor a 7,25		0	15	A
Mayor o igual a 7,25	Menor a 5	1	5	B
	Mayor o igual a 5	13	0	C

Mediante la combinación de los genes PDGF y TGF- $\beta$  se alcanzó:

-Sensibilidad: 100%

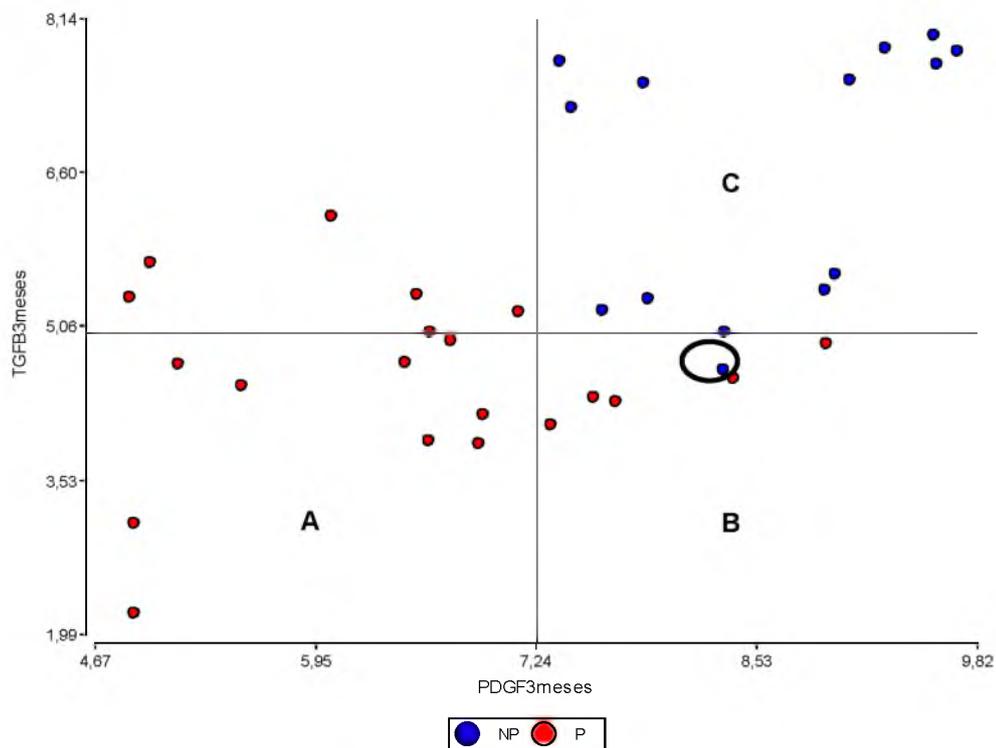
-VPP: 95%

-Especificidad: 93%

-VPN: 100%

(Tomado de: <http://www.samiuc.es/index.php/estadisticas-con-variables-binarias/indicadores-en-pruebas-diagnosticas/calculador-de-indicadores-en-pruebas-diagnosticas.html>)

En la Figura 4.16 se muestra gráficamente lo obtenido mediante el análisis discriminante:



**Figura 4.16: Gráfico de dispersión de las variables PDGF y TGF- $\beta$  discriminadas por pronóstico.** Región A + B incluye a la totalidad de los pacientes P y a un paciente erróneamente clasificado (círculo negro) del grupo NP. La región C abarca todos los pacientes restantes del grupo NP. Todos los valores se expresan como  $\Delta$ Ct.

Según muestran los resultados, para predecir tempranamente la evolución hacia CAD, se pudo emplear la variable eGFR a partir de los 6 meses de trasplante. Utilizando la variable PDGF a los 3 meses, la predicción (línea de corte en 7,25) alcanzó una sensibilidad del 75%. Con la combinación de las variables PDGF (línea de corte en 7,25) y TGF- $\beta$  (línea de corte en 5) a los 3 meses de trasplante se consiguió una sensibilidad del 100%, logrando en un menor tiempo post trasplante que el eGFR, identificar aquellos pacientes que evolucionarán hacia CAD con IF/TA.

### 3.3. Conclusiones.

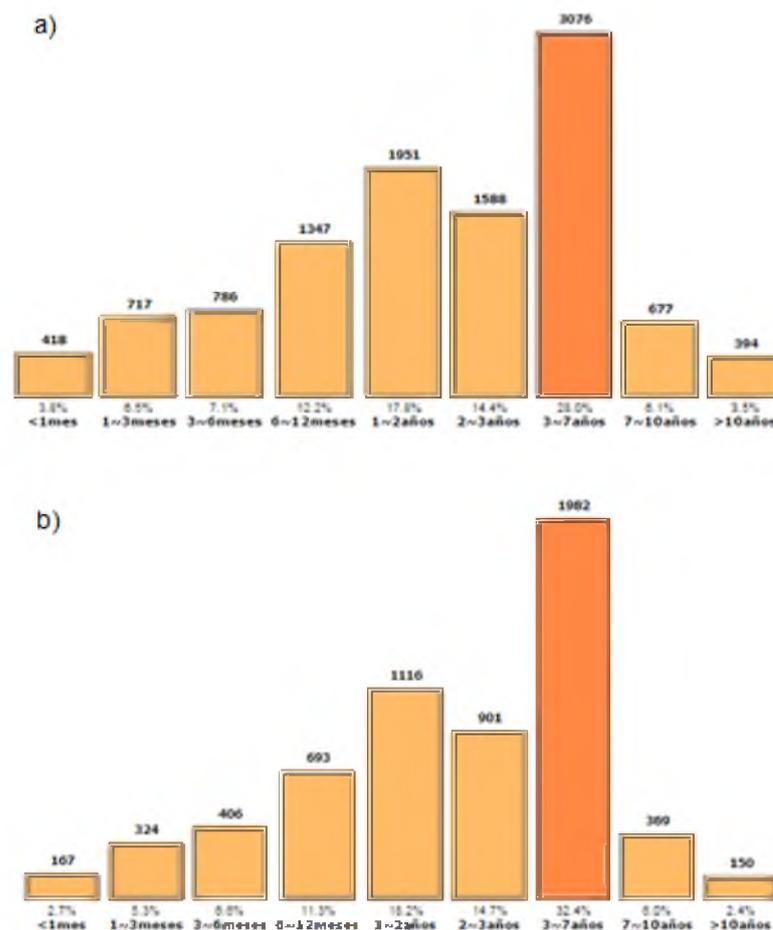
- La expresión de los genes TGF- $\beta$ , PDGF se encontró incrementada mientras que la de VEGF se halló disminuida en orinas recolectadas a 3 meses post trasplante de los pacientes que a los 12 meses se clasificaron como Progresores.
- La expresión génica de TGF- $\beta$  y PDGF en orinas recolectadas a los 3 meses de trasplante permitió identificar aloinjertos que evolucionarán hacia CAD con IF/TA.

## Discusión

**1.1. CAD con IF/TA constituye la causa principal de pérdida de riñones trasplantados a largo plazo y el mayor inconveniente en la sobrevida de los injertos.**

El número de candidatos en lista de espera continúa incrementando y cada año son más los pacientes que se inscriben que quienes son removidos de las listas. En USA el número de candidatos en lista de espera se ha duplicado desde 50000 (año 2002) hasta más de 96000 en el año 2013. En contraste con el crecimiento de las listas de espera, los índices de donación no han incrementado en los años recientes (161).

En Argentina, actualmente existen alrededor de 11000 registros de pacientes en diversas listas de espera para trasplante de órganos. En la Figura 5.1 a) se muestran los pacientes agrupados según la antigüedad en todas las listas de espera y en b) según la lista renal, donde se refleja claramente el largo período de tiempo que permanecen aguardando la llegada de órgano de donante cadavérico (fuente: <http://www.incucai.gov.ar/>).



**Figura 5.1: Pacientes agrupados por antigüedad en lista de espera.** a) Pacientes inscriptos en todas las listas de espera (n=10954). b) Pacientes inscriptos en lista de espera renal (n=6108). Datos correspondientes a agosto de 2015; fuente: <http://www.incucai.gov.ar/>.

El trasplante renal constituye el tratamiento de elección para aquellas personas con enfermedad renal crónica en estadio terminal dado que posibilita una mejor calidad de vida y sobrevida del paciente comparado con otras terapias de reemplazo como la hemodiálisis (162). Sin embargo, la mayoría de los injertos padecen un deterioro progresivo con pérdida continua de la función renal cuya contraparte histológica está representada por glomeruloesclerosis, atrofia tubular, fibrosis intersticial y arteriosclerosis (163).

CAD es una entidad con histología y fisiopatología mixta con diferentes índices de progresión. Debe ser considerada como un camino final no específico de daño en los compartimentos del aloinjerto que resultan en una variedad de injurias y respuestas del tejido (164). Aparentemente, la historia natural de este proceso no ha sido significativamente modificada por el desarrollo de estrategias inmunosupresoras más potentes y selectivas, lo que sugiere que otros factores además de los inmunológicos pueden afectar negativamente los resultados a largo plazo del injerto.

Un análisis de los datos de trasplante de USA, pertenecientes a la base de información de UNOS (*United Network for Organ Sharing*) incluyendo más de 138.000 casos, mostró que, pese a las mejoras notables en los resultados del injerto a corto plazo, la tasa de pérdida de injertos después del primer año de trasplante no ha cambiado notablemente en los últimos años (161-163). Así, la extensión de la sobrevida del injerto renal a largo plazo es la tarea más importante de la medicina moderna de trasplante.

En el presente trabajo se propuso analizar el rol de la angiogénesis en el desarrollo de CAD con IF/TA y buscar marcadores no invasivos para detectar los cambios tempranos que permitan anticiparse a la instauración del daño crónico.

## **1.2. La angiogénesis juega un rol en el desarrollo de CAD.**

El estudio mediante *microarrays* permitió identificar genes que participan como parte de un proceso complejo como lo es la angiogénesis. La identificación de las señalizaciones relevantes en las biopsias diagnósticas justificó la evaluación de genes individuales asociados a angiogénesis en CAD.

## **1.3. Los factores inmunológicos y no inmunológicos que están asociados al desarrollo de CAD con IF/TA no mostraron diferencias con respecto a los otros grupos histológicos.**

Este proceso de deterioro progresivo no tiene una causa definida. Factores inmunes y no-inmunes estarían involucrados en la patogenia. Existen datos clínicos que sostienen la teoría de la importancia de la actividad inmunológica del receptor, inicial y durante el proceso, en la etiología y evolución del proceso crónico (165). Al momento del trasplante y a nivel individual, existen un número de características bien identificables pero no modificables del receptor y donante que pueden impactar en los resultados a largo plazo (166).

Dentro de las variables antígeno-independientes analizadas se encuentra el tipo de donante. Hace más de una década, algunos experimentos de muerte cerebral en modelos de rata revelaron una fuerte influencia de esta condición sobre CAD (167). Particularmente en un modelo de isoinjerto en ratas, la muerte cerebral demostró inducir fibrosis intersticial renal (41), donde factores inductores como la sobre-regulación de TGF- $\beta$  fueron identificados como determinantes en los cambios progresivos fibróticos que se desarrollan a lo largo del tiempo en el modelo de los isoinjertos.

Aquí los resultados muestran que el grupo AN estuvo conformado en su totalidad por receptores de aloinjertos provenientes de donantes cadavéricos, a diferencia del grupo IF/TA que incluyó receptores de aloinjertos de donantes vivos. De esta manera, el donante cadavérico y por consiguiente la muerte cerebral parece no estar asociada directamente a la expresión incrementada de TGF- $\beta$  encontrada en el grupo histológico IF/TA.

El tiempo de isquemia fría es otra variable que se vincula al desarrollo de CAD. La injuria ocurre en el riñón cuando el suministro de sangre es interrumpido. Estas lesiones llevan a un daño agudo, una situación perjudicial asociada con un deterioro de la función del aloinjerto a corto plazo (función tardía del injerto) como también sobre la sobrevivencia a largo plazo a través de la aparición de CAD (168). El estudio no reveló diferencias en los tiempos de isquemia fría entre los 4 grupos, por lo cual se puede inferir que el TIF puede ser un factor no asociado a la expresión diferencial de los genes evaluados.

La edad del receptor tuvo un valor medio mayor en el grupo AN, seguido del grupo NTA. La edad del donante y el receptor ha cobrado mayor importancia en el trasplante de órganos. Algunos trabajos demostraron la relevancia y las consecuencias de ambas edades en la inmunorrespuesta y el resultado del trasplante, demostrando que el aumento de la edad del receptor se asocia con una mejoría en la sobrevivencia del trasplante, menores tasas de rechazo y resultados superiores (169). Aquí encontramos grupos homogéneos en cuanto a distribución de la edad del receptor, excepto el grupo AN que tuvo un valor promedio mayor y una mediana que alcanzó los 58 años de edad. Algunos estudios muestran que el

beneficio del trasplante y las menores tasas de rechazo se asocian a receptores de más de 65 años de edad, aunque si se comparan las medianas de ambos grupos (IF/TA: 44 años vs AN: 58 años), se podría pensar que la menor edad puede ser un factor adicional asociado a los mayores índices de rechazo que contribuyen al desarrollo de CAD.

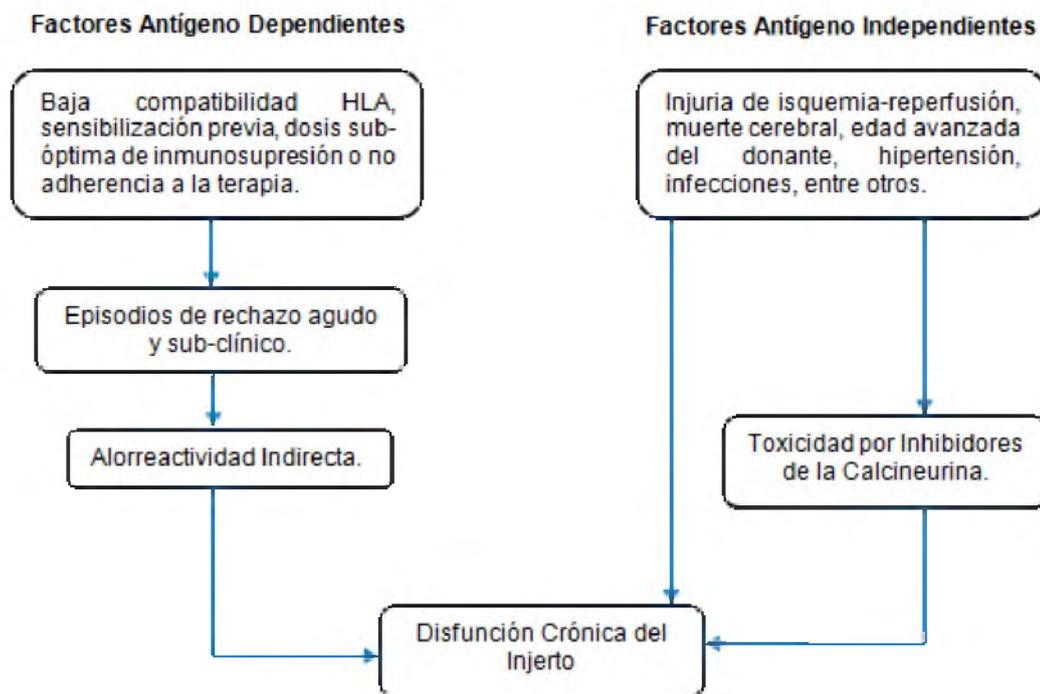
En cuanto a los factores inmunológicos intervinientes que se asocian al desarrollo de CAD se encuentra la compatibilidad HLA. La investigación sobre la influencia de la compatibilidad HLA en el resultado de los trasplantes renales se ha centrado principalmente en la tasa de sobrevida del aloinjerto. Aunque ha habido controversia acerca de la magnitud del efecto, los análisis de registros de grandes bases de datos han reportado consistentemente que la sobrevida del injerto muestra una correlación inversa significativa con el número de *missmatches* HLA en la pareja receptor-donante (170, 171). En esta era moderna de inmunosupresión, la mejor compatibilidad es asociada no sólo con mejor sobrevida del injerto sino también con la administración de bajas dosis de agentes inmunosupresores, una menor incidencia de efectos adversos de la inmunosupresión como linfomas, muerte por infecciones y un bajo grado de sensibilización si el paciente ha perdido un aloinjerto renal y debe ser inscripto nuevamente en lista de espera para un retrasplante (172). El análisis del número de incompatibilidades HLA no mostró diferencias entre los grupos, donde la media osciló alrededor de 3 *missmatches* totales en los *loci* HLA A, B y DR.

La inmunización anti-HLA también juega un rol deletéreo en los resultados a largo plazo del trasplante renal. Este efecto se ha observado desde el principio de la historia del trasplante (173): los receptores inmunizados contra antígenos HLA muestran resultados inferiores comparados con receptores no inmunizados. Los grupos RCA, IF/TA y AN mostraron valores de PRA similares de alrededor del 7%, mientras que el grupo NTA alcanzó el 13%. Sin embargo, un PRA inferior a 20% sin la identificación de la presencia /ausencia de anticuerpos específicos de donante puede estar directamente asociado al deterioro progresivo en la evolución del aloinjerto.

La introducción de los CNIs en los regímenes inmunosupresores (ciclosporina en los '80 y tacrolimus en los '90) fue un gran avance y llevó a una sobrevida excelente del paciente y del injerto a corto plazo. Sin embargo, aunque los CNIs redujeron la incidencia de rechazo agudo, no son selectivos y pueden causar comorbilidades metabólicas cardiovasculares progresivas y finalmente la disminución de la función renal (174).

CAD como el principal obstáculo en la sobrevida a largo plazo del injerto, puede ser influenciada por muchos parámetros y uno de ellos es la nefrotoxicidad por CNIs, la cual es el principal factor en el desarrollo de CAD y deterioro del aloinjerto renal (Figura 5.2). Esta entidad ocurre en el 76-94% de los receptores de trasplante renal (175). La exposición por largo tiempo puede resultar en daño irreversible a la estructura y a la función renal. Los efectos nefrotóxicos crónicos están asociados a cambios morfológicos como hialinosis arteriolar, IF/TA, fibrosis de la cápsula de Bowman y esclerosis glomerular que pueden llevar a la interrupción de la función renal (176).

Debido a que todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento inmunosupresor con CNIs, ya sea tacrolimus o ciclosporina, y dada su influencia directa sobre CAD, las biopsias con indicios de toxicidad no fueron utilizadas para el estudio.



**Figura 5.2: Mecanismos de la Disfunción Crónica del Aloinjerto.** Factores que son dependientes e independientes del antígeno contribuyen al daño crónico luego del trasplante. Además, los CNIs son nefrotóxicos y pueden contribuir directamente a la disfunción progresiva del aloinjerto.

#### 1.4. La comparación de la expresión génica entre los grupos histológicos NTA, RCA e IF/TA mostró diferencias en END y VCAM-1.

La comparación de los niveles de expresión de los genes asociados a angiogénesis entre los grupos de biopsias clasificadas como NTA, RCA e IF/TA no mostró diferencias

claras, excepto para los genes END (mayor expresión en RCA) y VCAM-1 (expresión disminuida en el grupo IF/TA).

Se ha demostrado que las moléculas de adhesión se encuentran sobreexpresadas en diferentes estructuras en riñón durante el rechazo del aloinjerto, probablemente asociado al infiltrado inflamatorio del túbulo-intersticio y vasos, como una parte de los mecanismos celulares inmunes.

Contrariamente a lo encontrado en este análisis, donde VCAM-1 está disminuido en IF/TA, otros grupos reportaron que estas proteínas inician la respuesta de células T a aloantígenos la cual es significativa para el desarrollo temprano de rechazo agudo y crónico del riñón trasplantado (177). Esto fue confirmado en estudios experimentales que evaluaron las concentraciones de VCAM-1 en ratas con injertos que padecían rechazo crónico (178).

Sin embargo, se ha reportado también que la expresión de VCAM-1 puede ser inducida por VEGF (119), el iniciador más potente de la angiogénesis y por lo tanto podría evaluarse la expresión de VCAM-1 en IF/TA en el contexto de la expresión de VEGF, gen que se encontró levemente disminuido en IF/TA (no significativo) comparado con los otros grupos histológicos.

#### **1.5. La heterogeneidad de las lesiones dentro de los compartimentos del aloinjerto con IF/TA puede promover una expresión diferencial.**

Dados los resultados obtenidos en el primer segmento del estudio, se pensó que quizás el grupo IF/TA era muy heterogéneo y por tal motivo no se hallaron diferencias con respecto a los otros grupos histológicos. Por esto se decidió reclasificar el grupo IF/TA y separar las biopsias según la severidad de los cambios glomerulares, fibrosis intersticial, atrofia tubular y cambios vasculares, en grado I y grado II.

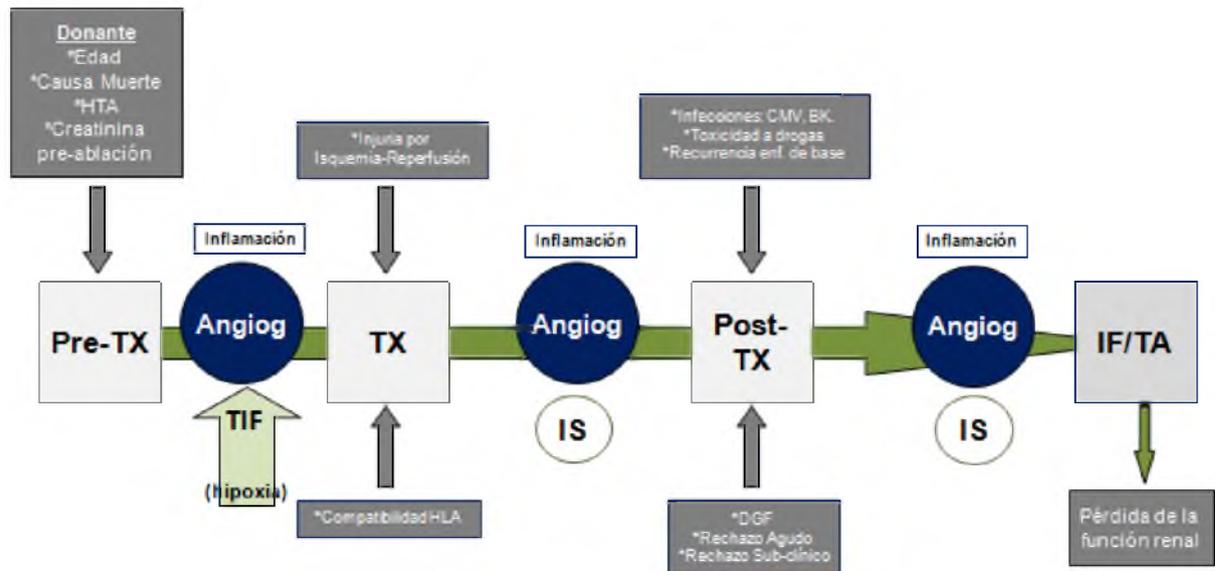
La graduación de los cambios morfológicos reveló diferencias significativas en la expresión de TGF- $\beta$ 1 entre grupos IF/TA (grado I vs grado II), posiblemente en concordancia con el grado de fibrosis intersticial. Como se ha reportado en diferentes estudios, los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  son los factores de crecimiento más extensamente estudiados que han sido relacionados a la fibrosis renal (179). Los macrófagos, las células epiteliales tubulares y los miofibroblastos son todos capaces de sintetizar TGF- $\beta$ 1 a diferentes estadios durante el desarrollo de lesiones renales fibróticas (180).

Normalmente, las acciones de TGF- $\beta$ 1 son terminadas cuando la reparación tisular es completa, o sea que la respuesta es autolimitada. La regulación del gen de TGF- $\beta$ 1 estaría sujeta a un solo episodio de injuria tisular y no a estímulos permanentes, como ha sido demostrado que ocurre en modelos animales de glomerulonefritis inducida con suero antitimocítico. Sin embargo, si los episodios de injuria y agresión tisular son múltiples y continuos, como ocurre en la respuesta inmune al aloinjerto, podría ocurrir un defecto en la regulación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 o bien, una autoinducción continua, que llevarían a un "círculo permanente de expresión" con excesiva producción del factor de crecimiento y producción de fibrosis. Esta teoría ha sido demostrada en un modelo experimental animal (181), en donde se observó que la producción de TGF- $\beta$ 1 en glomérulos era sostenida en respuesta a episodios repetidos de injuria tisular, mientras que era limitada frente a un estímulo único.

En el grupo de pacientes trasplantados renales estudiados, la injuria inmunológica es progresiva y prolongada. Sin embargo, a pesar que TGF- $\beta$ 1 es evidentemente clave en la fibrogénesis, sus múltiples funciones e interacciones con otras citoquinas hacen que el sistema sea de gran complejidad.

#### **1.6. La expresión génica de factores pro-angiogénicos se encontró disminuida en IF/TA, comparado con biopsias de aloinjerto normal.**

En el presente estudio, la premisa fue que la angiogénesis puede jugar un rol en el desarrollo de IF/TA. Posiblemente los cambios típicos asociados a la patogénesis de NTA y RCA sean factores que lleven a la expresión de ciertos genes asociados a angiogénesis. Como se muestra en la Figura 5.3, factores desencadenantes del proceso como la hipoxia asociada a la isquemia fría, la inflamación, etc., se encuentran formando parte de la línea de tiempo desde el momento del trasplante hasta la instauración de IF/TA. El resultado en cada uno de los estadios es el balance entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Es por eso que la utilización de las biopsias de aloinjerto normal, jugaron un rol importante dado que permitieron garantizar la eficacia del trabajo en la discriminación entre valores de expresión incrementados/disminuidos por la instauración de las entidades histopatológicas como la disfunción crónica del aloinjerto renal.



**Figura 5.3: La angiogénesis en la evolución del trasplante renal.** Factores asociados al donante, al procedimiento de trasplante y al receptor pueden ser estímulos para el proceso de angiogénesis. El resultado final en cada uno de los estadios es el balance entre factores pro y anti-angiogénicos. Angiog: Angiogénesis. IS: Inmunosupresión. TIF: Tiempo de Isquemia Fría. HTA: Hipertensión Arterial. DGF: Función Tardía del Injerto.

En la comparación de los niveles de expresión génica de IF/TA con respecto a AN, se hallaron aumentados significativamente TGF- $\beta$ 1, FGF y PDGF mientras que ANG1, ANG2, VEGF y SEL-E se encontraron disminuidos.

Estos resultados encontrados podrían estar asociados a un proceso angiogénico en un estadio de finalización en IF/TA, con sobreexpresión de genes como TGF- $\beta$ 1 y FGF que si bien puede mediar funciones pro-angiogénicas, en este contexto estarían actuando como reguladores positivos del proceso de fibrosis. Muchas patologías renales son caracterizadas por remodelamiento vascular, que frecuentemente se produce antes del desarrollo de la fibrosis (182).

El gen PDGF, que ha sido asociado a la estabilización de los vasos sanguíneos, fue encontrado aumentado. Para que los vasos funcionen apropiadamente deben estar recubiertos por células murales o pericitos. Muchos factores contribuyen a este proceso, como PDGF, el cual es liberado por las células endoteliales para quimioatraer a los pericitos que poseen el receptor para PDGF y de esta manera conferirle estabilidad al vaso (183).

Los genes que se asocian a los estadios iniciales del proceso de angiogénesis como VEGF, SEL-E, ANG1 y ANG2 fueron hallados disminuidos. El deterioro de la angiogénesis en IF/TA es apoyado por el estado deficiente de VEGF. El regulador positivo más potente de la angiogénesis ha demostrado ser VEGF, tanto de la angiogénesis normal como patológica

(184). VEGF es un mitógeno específico para las células endoteliales, tiene influencia positiva sobre la expresión de moléculas de adhesión sobre la célula endotelial e induce la expresión de VCAM-1 (119). En ausencia de VEGF, el endotelio cambia de nuevo al estado de reposo dando como resultado la apoptosis de las células endoteliales y la regresión vascular (185).

El sistema de señalización angiopoyetina-Tie fue identificado como una vía esencial para el desarrollo vascular. Las funciones de ANG1 son antagonizadas por ANG2, que desestabiliza el endotelio quiescente y lo prepara para responder a estímulos exógenos, y así modula las actividades de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y angiogénicas (VEGF) (186). Este sistema tiene muchos paralelismos importantes con el sistema VEGF. Por ejemplo, los receptores Tie son expresados selectivamente por las CE, similar a lo encontrado con los receptores VEGF. La señalización por los receptores Tie parece complementar la vía VEGF mediante la contribución en estadios posteriores del desarrollo vascular. Así, mientras las señales de VEGF promueven la iniciación de los eventos en angiogénesis como el brote de la célula endotelial, las señales angiopoyetinas-Tie parecen promover la supervivencia de la célula endotelial y el ensamblaje, estabilidad y maduración vascular (187).

La expresión disminuida de estos genes en IF/TA es el principal responsable que permite inferir que el proceso de la angiogénesis se encuentra en un estadio de finalización, resolución y quiescencia.

### **1.7. La expresión génica urinaria es representativa de la expresión del aloinjerto.**

Los análisis de expresión génica de biopsia de tejido mediante PCR cuantitativa y microarrays ha provisto una gran cantidad de información acerca de los cambios moleculares en el injerto que acompañan la injuria en curso (188). Un problema con este enfoque es la necesidad continua de un procedimiento invasivo, la biopsia, realizada en un punto definido de tiempo (protocolo), o luego de las alteraciones de los parámetros de laboratorio como un incremento en los niveles de creatinina sérica, momento en el cual los daños se encuentran instaurados.

Otro punto importante es la notable variabilidad inter-observador en la clasificación histológica de la patología del injerto renal (189). La interpretación subjetiva del patólogo es el principal limitante en el diagnóstico histopatológico. De hecho, un reporte de Furness P. y col. (190) mostró que la reproducibilidad de la clasificación Banff en toda Europa fue baja,

revelando que la variación internacional es aún mayor que la variación entre observadores dentro de pequeños grupos de patólogos que trabajan en la misma institución o país.

Ha habido un gran interés y esfuerzo en la identificación de biomarcadores en sangre y orina de pacientes trasplantados renales que son generados como resultado de la injuria del tejido del injerto. Idealmente estos biomarcadores deberían proporcionar una aproximación rápida y no invasiva del diagnóstico como también una posible predicción del daño que podría llevar a un tratamiento más inmediato y mejorar los resultados. Para los pacientes trasplantados renales, la orina provee potencialmente una fuente más próxima de los eventos inmunes y no inmunes que ocurren en el injerto. Mediante el perfil de ARN aislado del sedimento urinario, muchos investigadores han observado cambios en la expresión génica que se correlacionan con rechazo agudo, disfunción crónica del injerto y fibrosis intersticial de los injertos renales. Estos cambios incluyen una expresión alterada de ARNm que codifica mediadores de inflamación, reparación de tejido y fibrogénesis (92), citoquinas, quimoquinas y sus receptores (191). Estos perfiles de expresión distintos generados de estudios individuales de laboratorio indican que como se predijo, la injuria a los aloinjertos renales es reflejada mediante cambios en la orina (192).

En el presente trabajo se planteó analizar el perfil génico en muestras apareadas de biopsia y orina. Se obtuvo como resultado que no todos los genes asociados a angiogénesis que se propusieron en este estudio pueden ser encontrados de manera simultánea en ambas muestras. Es el caso de ANG-1 y ANG-2, cuyos niveles fueron muy bajos e inclusive indetectables, comparado con su respectiva biopsia. Por lo tanto, estos genes no cumplen con los requisitos para ser utilizados como biomarcadores.

En los casos de los genes que tuvieron expresión en ambas muestras apareadas, como VEGF y TSP-1, el análisis de regresión demostró que las orinas pueden ser utilizadas como reflejo de la expresión de la muestra de tejido, representativas de la totalidad del riñón trasplantado, al igual que otros reportes de Matz M. y col. 2006 (191), Muthukumar T. y col. 2005 (193), Yannaraki M. y col. 2006 (194), entre otros, que evaluaron patrones de expresión génica en orina como biomarcadores del status del aloinjerto.

#### **1.8. La expresión de los genes TGF- $\beta$ , PDGF y VEGF en orina permiten identificar aloinjertos que evolucionarán hacia CAD con IF/TA.**

El principal obstáculo en el manejo de los receptores de trasplante renal es la falta de biomarcadores específicos para el monitoreo continuo de la función del injerto luego del trasplante renal. Los marcadores como creatinina sérica, eGFR y/o proteinuria (195), son

rutinariamente usados para monitorear la función del injerto. Desafortunadamente, estos métodos disponibles actuales son ineficientes, inexactos e invasivos (196) y padecen limitaciones en la predicción de resultados (197).

Con la finalidad de identificar si los genes encontrados diferencialmente expresados en IF/TA podrían ser utilizados en la predicción de CAD, se proyectó una sección longitudinal, donde se recolectaron orinas seriadas de 34 pacientes trasplantados renales.

En los pacientes que se clasificaron a los 12 meses post-trasplante como Progresores (eGFR < 45 ml/min), la cuantificación de la expresión génica en la orina a los 3 meses post trasplante mostró que TGF- $\beta$  y PDGF estaban incrementados y VEGF disminuido, en comparación con el grupo No Progresores (eGFR > 45 ml/min). Estos resultados fueron concordantes con lo hallado en las biopsias con IF/TA (sección transversal del objetivo 1). Es decir, la expresión génica urinaria de TGF- $\beta$ , PDGF y VEGF a los 3 meses de trasplante tuvo la capacidad identificar aquellos pacientes "Progresores" hacia CAD con IF/TA.

### **1.9. La expresión génica de TGF- $\beta$ y PDGF en orinas recolectadas a los 3 meses de trasplante permitió identificar aloinjertos que evolucionarán hacia CAD con IF/TA.**

Para determinar la capacidad de predicción de estas variables, se evaluó si cada uno de los genes tomados por separado a los 3 meses de trasplante eran buenos predictores de la evolución a CAD. El análisis de regresión logística simple arrojó que PDGF, TGF- $\beta$  y VEGF tienen la capacidad de predecir. El modelo de regresión hacia atrás (*stepwise backward*), mostró que las variables PDGF y TGF- $\beta$  (3 meses) son suficientes para predecir pronóstico y la combinación de ambos genes resulta en una sensibilidad del 100%, especificidad del 93%, VPP del 95% y VPN del 100%.

La identificación de TGF- $\beta$  y PDGF en orina es de importancia debido a la relevancia funcional de estos genes en la predicción de IF/TA. Estos experimentos proveen una base importante para determinar el rol de la angiogénesis y podría permitir adoptar nuevos criterios en el manejo del paciente en la prevención de CAD. Además, la identificación de las moléculas principales que están involucradas en al menos uno de los mecanismos moleculares que caracterizan al proceso, abre la posibilidad de utilizar nuevas medidas, más efectivas, que podrían afectar directamente el mecanismo alterado.

En resumen, hemos identificado un panel de genes asociados a angiogénesis diferencialmente expresados en IF/TA en un set de muestras de tejido de aloinjerto. El uso de orina como fuente no invasiva es una alternativa atractiva debido a que puede ser recogida fácilmente en múltiples puntos de tiempo. De esta manera, evaluamos prospectivamente el panel de genes en muestras de orina, identificando tres genes como variables predictoras de IF/TA.

El beneficio clínico más inmediato de los genes mencionados en orina, es su uso como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de IF/TA. Poder individualizar factores de riesgo que permitan identificar pacientes con mayores chances de desarrollar CAD, permitiendo tomar conductas tempranas, es uno de los objetivos del trasplante actual.

## **Bibliografía**

1. Morris PJ. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* 2004; 351:2678-80.
2. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351:2761-6.
3. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2002: 1-20.
4. Matas AJ, Gillingham KJ, Sutherland DE. Half-life and risk factors for kidney transplant outcome--importance of death with function. *Transplantation* 1993; 55: 757-761.
5. Cornell LD, Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 229-34.
6. Sayegh MH. Chronic renal allograft dysfunction (CAD): new frontiers. Introduction. *Kidney Int Suppl* 2010; 119:S1.
7. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, *et al.* Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.
8. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601-2614.
9. Lamb KE. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. *Am J Transplant*. 2011; 11:450-462.
10. Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3655-7.
11. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8:753-60.
12. Joosten SA, van Kooten C, Paul LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003; 16: 137-145.
13. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81: 643-54.
14. Racusen LC, Solez K, Colvin R. Fibrosis and atrophy in the renal allograft: interim report and new directions. *Am J Transplant* 2002; 2:203-206.

15. Keith DS, Cantarovich M, Paraskevas S, *et al.* Recipient age and risk of chronic allograft nephropathy in primary deceased donor kidney transplant. *Transpl Int* 2006; 19:649-56.
16. Moreso F, Ibernón M, Gomá M, *et al.* Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6:747-52.
17. Collini A, Kalmar P, Dharmo A, *et al.* Renal transplant from very old donors: how far can we go? *Transplantation* 2009; 87: 1830-6.
18. Mas VR, Archer KJ, Scian M, *et al.* Molecular pathways involved in loss of graft function in kidney transplant recipients. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10:269-84.
19. Mandelbrot D, Sayegh MH. *Transplantation Immunobiology*. In: Danovich GM, ed. *Handbook of Kidney Transplantation*. 4th. Ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004. Lippincott Williams & Wilkins Handbook Series.
20. Klein J, Figueroa F. The evolution of class I MHC genes. *Immunol Today* 1986; 2:41-4.
21. Figueroa F, Klein J. The evolution of MHC class II genes. *Immunol Today* 1986; 3:78-81.
22. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 10:702-9.
23. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363:1451-62.
24. INCUCAI. Normativa de Trasplante Renal. Resolución 117/11.
25. McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342:605-12.
26. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 4:438-44.
27. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* 1994; 2: 103–107.
28. Kourilsky P, Chaouat G, Roubardin-Combe C, *et al.* Working principles in the immune system implied by the “peptidic self” model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 10:3400.

29. Matzinger P, Bevan MJ. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 1977; 1:1.
30. Bharat A, Mohamakumar T. Allopeptides and the Alloimmune Response. *Cell Immunology* 2007; 248: 31-43.
31. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, *et al.* A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173:4828–4837.
32. Bedford P, Garner K, Knight SC. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulates primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol* 1999; 11:1739–1744.
33. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990; 171:307-14.
34. Nasr IW, Reel M, Oberbarnscheidt MH, *et al.* Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection. *Am J Transplant* 2007; 7:1071-9.
35. Womer KL, Stone JR, Murphy B, *et al.* Indirect allorecognition of donor class I and II major histocompatibility complex peptides promotes the development of transplant vasculopathy. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2500-6.
36. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3:665-73.
37. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005; 80:1194-7.
38. Kaneku HK, Terasaki PI. Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 2006:1-27.
39. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approaches to therapy. *Semin Nephrol* 2000; 20:126-47.
40. Ferlicot S, Durrbach A, Bâ N, *et al.* The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol.* 2003 Sep; 34:924-8.
41. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, *et al.* Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2474-81.

42. Fellström B. Donor antigen-independent risk factors for chronic allograft nephropathy. *Transplant Rev* 2003; 17:61-66.
43. Tedla F, Hayashi R, McFarlane SI, *et al.* Hypertension after renal transplant. *J Clin Hypertens* 2007; 9: 538–545.
44. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, *et al.* Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. American Society of Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 15: S1–S86.
45. Schwenger V, Zeier M, Ritz E. Hypertension after renal transplantation. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3: 434–439.
46. Bear RA, Aprile M, Sweet J, *et al.* Proteinuria in renal transplant recipients: incidence, cause, prognostic importance. *Transplant Proc* 1988; 20: 1235–1236.
47. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116: 288–296.
48. Ponticelli C. Can mTOR inhibitors reduce the risk of late kidney allograft failure? *Transpl Int* 2008; 21:2-10.
49. Wali RK, Weir MR. Chronic allograft dysfunction: can we use mammalian target of rapamycin inhibitors to replace calcineurin inhibitors to preserve graft function? *Curr Opin Organ Transplant*. 13 (6), 614-621 (2008).
50. Ponticelli C, Scolari MP. Calcineurin inhibitors in renal transplantation still needed but in reduced doses: a review. *Transplant Proc* 2010; 42:2205-8.
51. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7:384-9.
52. Joosten SA, van Kooten C, Sijpkens YW, *et al.* The pathobiology of chronic allograft nephropathy: immune-mediated damage and accelerated aging. *Kidney Int* 2004; 65:1556-9.
53. Modena FM, Hostetter TH, Salahudeen AK, *et al.* Progression of kidney disease in chronic renal transplant rejection. *Transplantation* 1991; 52: 239-44.
54. Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental Biology and Medicine* 2008; 233: 109–122.

55. Blank U, Essig M, Scanduzzi L, *et al.* Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunological Reviews* 2007; 217: 79–95.
56. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 2001; 27:19–31.
57. Safinia N, Afzali B, Atalar K, *et al.* T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int* 2010; 119:S2-12.
58. Nikolic-Paterson DJ, Wang S, Lan HY. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int* 2014; 4:34-38.
59. Boor P, Floege J. Renal allograft fibrosis: biology and therapeutic targets. *Am J Transpl* 2015; 15:863-886.
60. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:574–81.
61. Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* Feb 2000; 190:300–9.
62. Marti HP. The role of matrix metalloproteinases in the activation of mesangial cells. *Transpl Immunol* 2002; 9:97–100.
63. Bollee G, Flamant M, Schordan S, *et al.* Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescent glomerulonephritis. *Nat Med* 2011; 17:1242–1250.
64. Ang AH, Tachas G, Campbell JH, *et al.* Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J* 1990; 265:461–9.
65. Thyberg J, Blomgren K, Roy J, *et al.* Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:837–46.
66. Schlondorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: No cell is an island. *J Am Soc Nephrol*; 20: 1179–1187.
67. Ning L, Kurihara H, de Vega S, *et al.* Laminin alpha1 regulates age related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF-beta pathway. *Am J Pathol* 2014; 184:1683–1694.

68. Starke C, Betz H, Hickmann L, *et al.* Renin lineage cells repopulate the glomerular mesangium after injury. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 48-54.
69. Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, *et al.* Mesangial cell turnover: effect of heparin and peptide growth factors. *Lab Invest* 1991; 64:446–56.
70. Ishimura E, Morii H, Sterzel RB, *et al.* Effect of transforming growth factor-beta on extracellular matrix production by cultured rat mesangial cells. *Nippon Jinzo Gakkai Shi Jpn J Nephrol* 1993; 35:311–20.
71. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, *et al.* Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:S126–31.
72. Pedagogos E, Hewitson TD, Walker RG, *et al.* Myofibroblast involvement in chronic transplant rejection. *Transplantation* 1997;64:1192–7.
73. Ko YJ, Sugar L, Zaltzman J, *et al.* Alpha-smooth muscle actin and collagen deposition in dysfunctional renal transplants. *Transplantation* 1997; 63:156–8.
74. Fine LG, Hammerman MR, Abboud HE. Evolving role of growth factors in the renal response to acute and chronic disease. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1163–70.
75. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2002; 61:1867–79.
76. Bakker RC, Koop K, Sijpkens YW, *et al.* Early interstitial accumulation of collagen type I discriminates chronic rejection from chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2142–9.
77. Lutz J, Yao Y, Song E, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. *Transplantation* 2005; 79:655–61.
78. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, *et al.* Banff meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). *Am J Transplant* 2007; 7: 518–526.
79. Racusen LC, Regele H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int* 2010; 119:S27-32.

80. Perkins DL, Carpenter CB. Immunobiology of transplantation. In: Brenner BM, editor. Brenner and Rector's The Kidney. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1996. pp. 2576–601.
81. Colvin RB. Pathology of chronic humoral rejection. *Contrib Nephrol*. 2009; 162:75-86.
82. Abbas AK. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier España. 7º Edición. 2012.
83. Torres IB, Moreso F, Sarró E, *et al*. *Biomed Res Int* 2014; 2014:750602.
84. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, *et al*. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-70.
85. Marqués GG, Goenaga PE, Royo FJ, *et al*. Evolution of the renal function is a better predictor of long-term survival than serum creatinine. *Transplant Proc* 2005; 37:3701-4.
86. Chapman JR. Longitudinal analysis of chronic allograft nephropathy: clinicopathologic correlations. *Kidney Int* 2005; 99:S108-12.
87. Wanichthanarak K, Fahrman JF, Grapov D. Genomic, Proteomic, and Metabolomic Data Integration Strategies. *Biomark Insights*. 2015 Sep 7; 10 (Suppl 4):1-6.
88. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39:75-85.
89. Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001; 72:948-53.
90. Stegall MD, Park W. What can be learned using microarrays? *Kidney Int* 2007; 72:783-4.
91. Halloran PF, Einecke G. Microarrays and transcriptome analysis in renal transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2:2-3.
92. Mas VR, Mas LA, Archer KJ, *et al*. Evaluation of gene panel mRNAs in urine samples of kidney transplant recipients as a non-invasive tool of graft function. *Mol Med* 2007; 13:315-24.
93. Schröppel B, Heeger PS. Gazing into a crystal ball to predict kidney transplant outcome. *J Clin Invest* 2010; 120:1803-6.

94. Ashton-Chess J, Giral M, Souillou JP, *et al.* Using biomarkers of tolerance and rejection to identify high- and low-risk patients following kidney transplantation. *Transplantation* 2009; 87:S95-9.
95. Keown PA, McMaster WR, McManus BM. Tools to identify organ rejection and immune quiescence for biological understanding and personalized medical care. *Biomark Med* 2010; 4:115-21.
96. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, *et al.* Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant* 2012; 12: 1180–1191.
97. Nakorchevsky A, Hewel JA, Kurian SM, *et al.* Molecular mechanisms of chronic kidney transplant rejection via large-scale proteogenomic analysis of tissue biopsies. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 362–373.
98. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate end points: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89–95.
99. Gillespie A, Lee IJ. Biomarkers in renal transplantation. *Biomark Med.* 2008; 2:603–612.
100. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, *et al.* Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998; 66:562-6.
101. Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, *et al.* Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation* 2006; 81:1125-32.
102. Mas V, Maluf D, Archer K, *et al.* Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation.* 2007 Feb 27; 83(4):448-57.
103. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol*1985; 42-62.
104. Folkman J. Angiogenesis: initiation and modulation. *Symp Fundam Cancer Res* 1983; 36:201-8.
105. Chung AS., Lee J., Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Canc* 2010; 10: 505-514.

106. Semenza, G. L. Oxygen homeostasis. *Rev Syst Biol Med.* 2009; 2:336–361.
107. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9: 653–660.
108. Yancopoulos GD. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–248.
109. Tang N. Loss of HIF-1 $\alpha$  in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 6: 485–495.
110. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 2003; 9:669–676.
111. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 19: 298-307.
112. Gaengel K, Genové G, Armulik A, *et al.* Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:630-8.
113. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Internat* 1999; 56: 794–814.
114. Gabilove JL. Angiogenic growth factors: autocrine and paracrine regulation of survival in hematologic malignancies. *Oncologist* 2001; 6: 4–7.
115. Kim BS, Chen J, Weinstein T, *et al.* VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2027–2036.
116. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20:158–163.
117. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Ann Rev Pathol* 2007; 2: 251–275.
118. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9: 653–660.
119. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, *et al.* During angiogenesis vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cells adhesion to tumour endothelium. *Nature Med* 1996; 2: 992-997.

120. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville P, *et al.* Basic fibroblast growth factor upregulates expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 1995; 92: 11–14.
121. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Rev Drug Discov* 2009; 8: 235–253.
122. Leali D, Dell'era P, Stabile H, *et al.* Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross talk in angiogenesis. *J Immunol* 2003; 171: 1085–1093.
123. Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, *et al.* Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 2002; 62:901-13.
124. Böttinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2600-10.
125. El-Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* 2003; 64:1553-63.
126. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7:363-74.
127. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685-93.
128. Iyoda M, Shibata T, Wada Y, *et al.* Long- and short-term treatment with imatinib attenuates the development of chronic kidney disease in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:576-84.
129. Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009; 12:125-37.
130. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, *et al.* Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10:165-77.
131. Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, *et al.* Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:4046-51.

132. Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:69–75.
133. De Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, *et al.* Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 2001; 7:401–407.
134. Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, *et al.* Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1998; 132: 519–529.
135. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, *et al.* Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 1999; 100: 1423–1431.
136. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277–285.
137. Wickstrom SA, Veikkola T, Rehn M, *et al.* Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res* 2001, 61:6511–6516.
138. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, *et al.* Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274:11721–11726.
139. Tanabe K, Maeshima Y, Ichinose K, *et al.* Endostatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents the progression of peritoneal sclerosis in a mouse experimental model. *Kidney Int* 2007; 71:227–238.
140. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17:1391-401.
141. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int* 2012; 82:516-24.
142. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6:667-78.
143. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 865-73.

144. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, *et al.* Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:928-36.
145. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17:1391-401.
146. Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia--reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol* 2001; 46:267-76.
147. Kouwenhoven EA, Ijzermans JN, de Bruin RW. Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction. *Transpl Int* 2000; 13:385-401.
148. Kelly DJ, Hepper C, Wu LL, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1286–1292.
149. Rajnoch J, Viklický O. Angiogenesis and organ transplantation. *Folia Microbiol* 2004; 49:499-505.
150. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.
151. Moss P. History and development of molecular biology. En: *Molecular Hematology*. 3ª Edición. Wiley Blackwell. 2010; 360-9.
152. Rio DC. Reverse Transcription-polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2014 (11):1207-16.
153. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, *et al.* Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001; 125:279-84.
154. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* 2013; 29:569-74.
155. Solez K, Racusen LC. The Banff classification revisited. *Kidney Int* 2013; 83:201-6.
156. van der Vliet JA, Warlé MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18:174-8.
157. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct; 6 (10):986-94.

158. Fehr T, Cohen CD. Predicting an allograft's fate. *Kidney Int*2011; 80:1254-5.
159. Harrell FE. *Regression Modeling Strategies*. Springer International Publishing. 2015. 2<sup>o</sup> Ed.
160. Anderson TW. *An introduction to multivariate Statistical Analysis*. Wiley-Interscience 2003: 752 pp.
161. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, *et al*. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant*2015; 15:1-34.
162. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, *et al*. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrologia*2014; 34:302-16.
163. Kaneku HK, Terasaki PI. Thirty-year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl*2006; 1-27.
164. Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol*2008; 2:56-67.
165. Pascual J, Pérez-Sáez MJ, Mir M, *et al*. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant Rev* 2012; 26: 280-90.
166. Remuzzi G, Perico N. Protecting single-kidney allografts from long-term functional deterioration. *J Am Soc Nephrol*1998; 9:1321-32.
167. Leber B, Stadlbauer V, Stiegler P, *et al*. Effect of oxidative stress and endotoxin on human serum albumin in brain-dead organ donors. *Transl Res* 2012;159: 487-96
168. Chatauret N, Badet L, Barrou B, *et al*. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol* 2014; 24:S4-12.
169. Knoll GA. Kidney transplantation in the older adult. *Am J Kidney Dis*2013; 61:790-7.
170. Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 2007; 84:137-43.
171. Meier-Kriesche HU, Scornik JC, Susskind B, *et al*. A lifetime versus a graft life approach redefines the importance of HLA matching in kidney transplant patients. *Transplantation* 2009; 88:23-9.

172. Opelz G, Döhler B. Ceppellini Lecture 2012: collateral damage from HLA mismatching in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 2013; 82:235-42.
173. Terasaki PI. A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation* 2012; 93:751-6.
174. Rush D. The impact of calcineurin inhibitors on graft survival. *Transplant Rev* 2013; 27:93-5.
175. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, *et al.* Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:1963-8.
176. Chapman JR, Nankivell BJ. Nephrotoxicity of ciclosporin A: short-term gain, long-term pain? *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:2060-3.
177. Jeong HJ, Lee HH, Kim YS, *et al.* Expression of ICAM-1 and VCAM-1 in renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1998; 30:2953-4.
178. Crews GM, Erickson L, Pan F, *et al.* Down-regulation of TGF-beta and VCAM-1 is associated with successful treatment of chronic rejection in rats. *Transplant Proc* 2005; 37:1926-8.
179. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, *et al.* Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013; 64:384-96.
180. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005; 12:353-65.
181. Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51:1388-96.
182. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest* 2014; 124:2299-306.
183. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res* 2010; 180:103-14.
184. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473:298-307.

185. Chang FC, Lai TS, Chiang CK, *et al.* Angiopoietin-2 is associated with albuminuria and microinflammation in chronic kidney disease. *PLoS One* 2013; 8:e54668.
186. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277:55-60.
187. Thurston G, Daly C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2:a006550.
188. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation* 2008 Jul 27; 86(2):192-9.
189. Gibson IW, Gwinner W, Bröcker V, *et al.* Peritubular capillaritis in renal allografts: prevalence, scoring system, reproducibility and clinicopathological correlates. *Am J Transplant* 2008; 8:819-25.
190. Furness PN, Taub N, Assmann KJ, *et al.* International variation in histologic grading is large, and persistent feedback does not improve reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2003 Jun; 27:805-10
191. Matz M, Beyer J, Wunsch D, *et al.* Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006; 69:1683-90.
192. Keslar KS, Lin M, Zmijewska AA, *et al.* Multicenter evaluation of a standardized protocol for noninvasive gene expression profiling. *Am J Transplant* 2013; 13:1891-7.
193. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353:2342-51.
194. Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, *et al.* Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int* 2006; 19:759-68.
195. Buron F, Hadj-Aissa A, Dubourg L, *et al.* Estimating glomerular filtration rate in kidney transplant recipients: performance over time of four creatinine-based formulas. *Transplantation* 2011; 92:1005-11.
196. Kozakowski N, Regele H. Biopsy diagnostics in renal allograft rejection: from histomorphology to biological function. *Transpl Int* 2009; 22:945-53.

197. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, *et al.* Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int* 2011; 80:806-21.