



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA IGNACIO CHAVEZ

**TITULO:
MIRNAS COMO BIOMARCADORES DE RECHAZO AGUDO MEDIADO POR
ANTICUERPOS EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL**

TESIS

**PARA OBTENER EL:
GRADO DE ESPECIALISTA**

**EN:
NEFROLOGIA**

**PRESENTA:
DR. IVAN ZEPEDA QUIROZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. CESAR FLORES GAMA**

**CO-TUTOR:
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ**



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

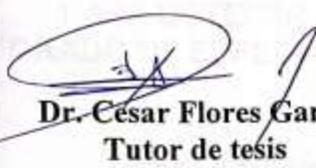
**HOJA RECOLECTORA DE FIRMAS
MIRNAS COMO BIOMARCADORES DE RECHAZO AGUDO MEDIADO POR
ANTICUERPOS EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL**


Dr. Carlos Rafael Sierra Fernández
Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez


Dra. Magdalena Madero Rovalo
Profesor titular de Nefrología

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez


Dr. César Flores Gama
Tutor de tesis

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Dirección de Enseñanza


Dr. Fausto Sánchez Muñoz
Co- Tutor de tesis

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez


Ivan Zepeda Quiroz
Residente de nefrología

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

ACTA DE COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN CON DICTAMEN APROBADO



Instituto Nacional de Cardiología Ignacia Chávez
Renacimiento de la Excelencia

CARTA DE ACEPTACIÓN

Ciudad de México, a 27 de febrero de 2023.
Número de Oficio: INCAR-DG-DI-ACEP-006-2023.

Número Institucional del Proyecto de Investigación:	23-1356
Título del estudio:	miRNAs como biomarcadores de rechazo agudo mediado por anticuerpos en pacientes con trasplante renal
Tipo de reunión:	Ordinaria
Patrocinador Externo (si aplica):
Número del estudio:
Domicilio del Centro de Investigación donde se realizará a cabo el estudio:	Instituto Nacional de Cardiología Ignacia Chávez Juan Badiuno No. 1, Colonia Sección XVI, C.P. 14080. Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México

DR. CESAR FLORES GAMA
INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA
PRESENTE.

Estimado Dr. Flores:

Me permito informar a usted, que su propuesta de proyecto de investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación en su Segunda Sesión Ordinaria del 16 de febrero de 2023.

Al realizar este proyecto, adquiere el compromiso ineludible de informar a los Comités y a la Dirección de Investigación trimestralmente, los avances de su proyecto, publicaciones y las presentaciones en congresos que genere.

Le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE,

DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN.

C.c.p.

- Subdirección de Investigación Clínica
- Trabajo Social

Elaboró: JGR.

Revisó: GVA



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	5
Abreviaturas	7
Antecedentes.....	8
Planteamiento del problema.....	17
Pregunta de Investigación.....	18
Justificación	18
Objetivos	19
Metodología	20
Diseño del Estudio.....	20
Criterios de inclusión	20
Criterios de exclusión.....	20
Tamaño de muestra	21
Procedimiento General.....	23
Material y métodos.....	28
Resultados.....	30
Discusión	37
Conclusión.....	42
Referencias bibliográficas.....	42
Anexos	50
Carta de consentimiento informado.....	51
Cronograma de actividades.....	52

RESUMEN

Título: MIRNAS COMO BIOMARCADORES DE RECHAZO AGUDO MEDIADO POR ANTICUERPOS EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL

Cesar Flores-Gama*, **Fausto Sánchez-Muñoz ****, **Ivan Zepeda-Quiroz *****

* Médico nefrólogo del Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez. ** Investigador en ciencias médicas del departamento de inmunología del Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez. ***Residente de tercer año del curso de nefrología del Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez.

Antecedentes: El rechazo sigue siendo la principal causa de pérdida del injerto renal, actualmente el estándar de oro para el diagnóstico es mediante la biopsia de aloinjerto, siendo un procedimiento invasivo y no exento de complicaciones. Actualmente se considera la variación en la expresión de miRNAs como un probable biomarcador para diagnóstico de rechazo agudo. Este estudio tuvo como objetivo analizar los microRNA involucrados en el daño Micro vascular en suero de pacientes con sospecha de rechazo agudo mediado por anticuerpos (RAMA).

Material y métodos: Un total de 27 pacientes con trasplante renal (TR) con y sin RAMA, fueron sometidos al estudio, realizándose cuantificación de miRNA en suero por PCR. Se estudió un total de 5 miRNA, así como su utilidad clínica y su correlación con las características histológicas de pacientes con RAMA.

Resultados: De los 5 miRNA en el grupo de RAMA (miR-1, miR-21, miR-126, miR-150-5p y miR-155-5p), el miR-150-5p aumentó significativamente en suero con respecto a pacientes sin rechazo ($p=0.05$), además se encontraron cambios en la expresión de miR-150-5p y hallazgos histopatológicos de inflamación micro vascular. Se determinó su utilidad clínica mediante análisis ROC con un área bajo la curva de (0.873).

Conclusión: Nuestros resultados muestran que pacientes con TR con RAMA muestra un aumento en la expresión de miR-150-5p en comparación con pacientes sin rechazo, lo cual podría tener consecuencias clínicas así como una probable utilidad en el diagnóstico de RAMA.

Palabras clave: trasplante renal, miRNA; rechazo mediado por anticuerpos; inflamación microvascular.

Datos de Alumno:	
Apellido paterno:	Zepeda
Apellido Materno:	Quiroz
Nombre:	Ivan
Teléfono:	2222599927
Correo:	ivanquiros621@gmail.com
Área de trabajo:	Servicio de Nefrología, Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez Universidad Nacional Autónoma de México
Universidad:	Medicina
Facultad:	
Número de cuenta:	517237380
Datos de Tutores	
Apellido paterno:	Flores
Apellido materno:	Gama
Nombre(s):	Cesar
Teléfono:	5541817329
Correo:	cesarfloresgama@gmail.com
Adscripción:	Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez
Área de trabajo:	Servicio de Nefrología
Datos de Tutores	
Apellido paterno:	Sánchez
Apellido materno:	Muñoz
Nombre(s):	Fausto
Teléfono:	5523328417
Correo:	fausto22@yahoo.com
Adscripción:	Instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez
Área de trabajo:	Servicio de Inmunología

ABREVIATURAS

TR	Trasplante renal
RAMA	Rechazo agudo mediado por anticuerpos
ERC	Enfermedad renal crónica
HD	Hemodiálisis
DP	Dialisis peritoneal
TRR	Terapia de reemplazo renal
CMV	Citomegalovirus
PRA	Porcentaje de reactividad contra panel
cpt	Capilaritis peri tubular
imv	Inflamación microvascular
g	glomerulitis
ADEs	Anticuerpos donador específico
USG	Ultrasonido

ANTECEDENTES

Enfermedad renal crónica como una de las principales causas de morbi-mortalidad

La enfermedad renal crónica (ERC) es considerada como un problema de salud pública a nivel mundial por sus elevadas tasas de prevalencia, incidencia y morbi-mortalidad. Se estima una prevalencia del 13,4% (11,7-15,1%), con 4,902 a 7,083 millones de personas en estadios avanzados que requieren de terapia de reemplazo renal (TRR) (Lv & Zhang, 2019). Se caracteriza por una tasa de filtración glomerular (TFG) inferior a 60 mL/min/1.73 m², una albuminuria de al menos 30 mg en 24 horas, o indicadores de daño renal (por ejemplo, hematuria o anomalías estructurales como riñones poliquísticos o displásicos) que persisten durante más de 3 meses la ERC es más prevalente en países de bajos y medianos ingresos que en países de altos ingresos (Lamb et al., 2013). A nivel mundial, la ERC se atribuye comúnmente a la diabetes y/o la hipertensión, pero otras causas como la glomerulonefritis, infecciones y exposiciones ambientales (como la contaminación del aire, remedios herbales y pesticidas) son frecuentes en Asia, África subsahariana y muchos países en desarrollo (T. K. Chen et al., 2019). La enfermedad renal crónica generalmente se identifica a través de pruebas de detección rutinaria con perfiles de química sérica y estudios de orina, o como un hallazgo incidental (Rysz et al., 2017). Una vez que el diagnóstico de enfermedad renal crónica (ERC) ha sido establecido, el siguiente paso consiste en determinar la etapa en la que se encuentra, proceso que se fundamenta en la tasa de filtración glomerular (TFG), la excreción de albúmina y la causa subyacente de la ERC (Lamb et al., 2013). La enfermedad renal crónica (ERC) se clasifica en etapas según la tasa de filtración glomerular (TFG) y se divide de la siguiente manera:

- Etapa 1 (G1): TFG ≥ 90 mL/min/1.73 m²
- Etapa 2 (G2): TFG 60-89 mL/min/1.73 m²

- Etapa 3a (G3a): TFG 45-59 mL/min/1.73 m²
- Etapa 3b (G3b): TFG 30-44 mL/min/1.73 m²
- Etapa 4 (G4): TFG 15-29 mL/min/1.73 m²
- Etapa 5 (G5): TFG <15 mL/min/1.73 m²

En las etapas tempranas de la ERC, factores como la hipertensión, la obesidad y la diabetes tipo 2 pueden desencadenar un deterioro en la función renal. Esto provoca daño glomerular/intersticial y resulta en una filtración glomerular deficiente, lo que lleva a una disminución de la TFG y un aumento en la albuminuria. En esta etapa, aunque los síntomas clínicos no estén presentes, la presencia de factores de riesgo adicionales, como la hipertensión, la hiperglucemia, el tabaquismo, la obesidad, la dislipidemia y las enfermedades cardiovasculares, pueden acelerar la progresión de la ERC y resultar en ERET (Tonelli et al., 2011). A medida que la enfermedad avanza, el riesgo de enfermedad cardiovascular aumenta notablemente, de manera tal que el 50% de los pacientes con enfermedad renal crónica en etapas avanzadas (etapas 4-5) presentan enfermedad cardiovascular. El riesgo de fibrilación auricular (FA) y síndrome coronario agudo (SCA) se duplica en pacientes con una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) inferior a 60 mL/min por 1.73 m². La FA está asociada con un riesgo tres veces mayor de progresión hacia la enfermedad renal en etapa terminal (ERET). La incidencia de insuficiencia cardíaca (IC) también es tres veces mayor en pacientes con eGFR inferior a 60 mL/min por 1.73 m² en comparación con aquellos con eGFR superior a 90 mL/min por 1.73 m², y la IC se relaciona con la progresión de la enfermedad renal crónica, hospitalización y muerte (Van Der Velde et al., 2011). En este sentido, la terapia de reemplazo renal es una opción de tratamiento para aquellos pacientes con enfermedad renal crónica en etapas avanzadas, donde la función renal ha disminuido significativamente y la calidad de vida se ve afectada.

La TRR puede ofrecer varios beneficios, incluida una mejora en la función renal, la eliminación o reducción de la necesidad de diálisis y la mejora en la calidad de vida general del paciente (Carminatti et al., 2019a). El reporte anual de la Asociación Renal Europea - Diálisis europea y Asociación de trasplantes (ERA-EDTA) para el año 2015 que 81,373 personas que iniciaron TRR por ERT, la mayoría de los pacientes fue de sexo masculino, con al menos el 50% mayores de 65 años y 25 % con DM, siendo la principal modalidad de TRR la hemodiálisis (HD) en el 85% de los pacientes, diálisis peritoneal (DP) para el 11% y trasplante renal (TR) para el 4% (Kramer et al., 2018). De acuerdo con los datos reportados por el Instituto de Métricas y Evaluación de la Salud, en México se tiene una de las mayores incidencias y prevalencias de ERC en el mundo, condicionado principalmente por DM e hipertensión arterial sistémica. Dentro de las principales causas que generan un aumento en la incidencia de ERC destacan el crecimiento en el número de personas afectadas con diabetes mellitus, hipertensión, obesidad, así como el envejecimiento de la población y el acceso a TRR (Lv & Zhang, 2019; Valdez-Ortiz et al., 2018).

Trasplante renal como tratamiento de elección en estadios avanzados

En la actualidad se considera al trasplante renal como la TRR ideal para pacientes que alcanzan estadios avanzados de la ERC, ya ha mostrado la mejor supervivencia y calidad de vida al compararla con otras modalidades, con tasas de supervivencia del paciente similares a la población sin ERC, desafortunadamente hasta un 50% de los pacientes trasplantados perderán el injerto antes de fallecer, debiendo regresar a diálisis con las altas tasas de mortalidad que esto implica (Abecassis et al., 2008). Los beneficios del trasplante renal son sustanciales y multidimensionales. Los pacientes sometidos a un trasplante renal experimentan una mejora significativa en su bienestar general. La eliminación de la necesidad de diálisis, o la reducción drástica de las sesiones de diálisis, proporciona una

independencia y libertad previamente inalcanzables. Además, la restitución de una función renal adecuada conduce a mejoras en la anemia, el metabolismo mineral y óseo, y la salud cardiovascular en general. Estos factores colectivamente mejoran la calidad de vida y la supervivencia, al tiempo que reducen la carga médica y económica asociada a la ERC avanzada (Carminatti et al., 2019). Sin embargo, es importante destacar que el éxito del trasplante renal también requiere un compromiso continuo. Los receptores de trasplante deben enfrentar la necesidad de adherirse rigurosamente a la terapia inmunosupresora a lo largo de su vida para prevenir el rechazo del órgano. Aunque los avances en la medicina han reducido los riesgos de rechazo y las complicaciones, el monitoreo constante y la gestión de los efectos secundarios siguen siendo elementos centrales en la atención post-trasplante.

El rechazo como principal causa de la pérdida del injerto

El rechazo en el contexto del trasplante renal se refiere a la respuesta inmunológica del receptor hacia el órgano trasplantado, resultando en una disminución de la función del injerto y, en casos graves, en la pérdida total de la función del riñón trasplantado. Esta complicación puede ser clasificada en varios tipos, incluyendo el rechazo hiperagudo, agudo y crónico, cada uno con mecanismos inmunológicos y manifestaciones clínicas únicas. A pesar de los avances en la inmunosupresión y el manejo clínico, el rechazo sigue siendo una preocupación significativa y una de las principales causas de la pérdida del injerto en el trasplante renal (Lai et al., 2021). Las causas para el rechazo varían según múltiples factores, como el tipo de donante (vivo o fallecido), el grado de compatibilidad entre el donante y el receptor, la terapia inmunosupresora y las características individuales del paciente. Los avances en los regímenes de inmunosupresión han reducido la incidencia de rechazo agudo en los primeros meses posteriores al trasplante. Sin embargo, el rechazo

crónico, que se desarrolla gradualmente y es más insidioso, sigue siendo un desafío considerable y contribuye significativamente a la pérdida a largo plazo de la función del injerto (Callemeyn et al., 2022). A pesar de las mejoras en las técnicas quirúrgicas, los avances en inmunología y nuevos fármacos inmunosupresores, el rechazo sigue siendo el principal factor que condiciona la pérdida del injerto renal. Se considera que el rechazo es una reacción inmunológica a los antígenos extraños presentes en injerto y reconocidos por el sistema inmunitario del receptor (Cooper, 2020).

Con la finalidad de sobrepasar esta barrera inmunológica se han establecido diversas estrategias tales como disminuir la incompatibilidad entre el donante-receptor y favorecer la tolerancia inmune, sin embargo, los rechazos aún continúan siendo un problema en el área de trasplante. Cuando la prevención ha fallado, el diagnóstico oportuno puede mejorar la supervivencia del injerto. A la fecha, el estándar de oro para establecer el diagnóstico de rechazo requiere de la evaluación histopatológica del injerto obtenida mediante biopsia además de la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en el donante. Los criterios histopatológicos para la evaluación del injerto renal y el diagnóstico de rechazo han sido estandarizados y clasificados por un grupo de expertos bajo el Informe de la Reunión Renal en Banff, siendo la actualización más reciente en 2019 (Jeong, 2020).

Limitantes de los métodos actuales para el diagnóstico de rechazo

El diagnóstico preciso y temprano del rechazo en el trasplante renal es un desafío crítico en la práctica clínica. Aunque se han logrado avances significativos en los métodos de diagnóstico, todavía existen limitaciones sustanciales que afectan la capacidad de los médicos para identificar el rechazo de manera oportuna y eficaz (Loupy et al., 2022). Una de las principales limitaciones es la sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico actuales. Tanto las biopsias renales como las pruebas de laboratorio pueden

arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos, lo que dificulta la toma de decisiones clínicas precisas. Además, la biopsia renal, uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de rechazo, es un procedimiento invasivo que conlleva riesgos potenciales, como hemorragias y daño al órgano. La necesidad de realizar biopsias repetidas puede ser incómoda y perjudicial para la salud del injerto. La variabilidad inter observador es otro desafío importante. La interpretación de los resultados de las biopsias renales puede verse afectada por las diferencias entre diferentes patólogos, lo que puede llevar a discrepancias en el diagnóstico y a la toma de decisiones clínicas inexactas (Jadoul et al., 2020). El diagnóstico temprano del rechazo agudo es crucial para un manejo eficaz, pero los métodos actuales pueden no ser lo suficientemente sensibles para detectar rechazos en sus primeras etapas. Además, el rechazo crónico, que puede ser insidioso, a menudo se diagnostica en etapas avanzadas, lo que dificulta su tratamiento. Por otra parte, el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos a través de los criterios histopatológicos ha mostrado una buena, aunque imperfecta correlación con los desenlaces del injerto; la biopsia está sujeta a error de muestreo, no permite evaluar la respuesta a tratamiento en tiempo real y el hecho de ser un procedimiento invasivo implica riesgos (Sellarés et al., 2012). Por estos motivos se han propuesto múltiples métodos diagnósticos no invasivos que puedan ayudar a establecer el diagnóstico del rechazo y monitoreo de la respuesta a tratamiento, dentro de ellos destacan la ecografía con contraste y la resonancia magnética, los perfiles de expresión génica, análisis proteómicos, de DNA y RNA en muestras de sangre y orina (Hanssen et al., 2017).

microRNAS

Los miRNAs (miRNAs o miR) son moléculas de RNA pequeñas, que no codifican para

proteínas, con un papel importante en la regulación epigenética de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Estas moléculas de RNA tienen una longitud de aproximadamente 21 a 25 nucleótidos y desempeñan un papel crucial en la modulación de procesos biológicos al unirse a secuencias complementarias en los RNA mensajeros (RNAm) y afectar su estabilidad o traducción, lo que influye en la síntesis de proteínas en la célula (Diener et al., 2022). La biogénesis de los miRNAs es un proceso intrincado que involucra varias etapas y complejas interacciones moleculares. Comprender cómo se forman los miRNAs es esencial para comprender su función en la regulación génica (Bartel, 2004). A continuación, se explicará brevemente la biogénesis de los mismos:

1. **Transcripción Inicial:** El proceso comienza en el núcleo de la célula, donde ciertos segmentos de DNA de genes que codifican miRNAs son transcritos en precursores de miRNAs llamados pri-miRNAs. Estos pri-miRNAs pueden encontrarse en regiones codificantes y no codificantes del genoma.
2. **Procesamiento por Drosha:** Los pri-miRNAs son reconocidos y procesados por una enzima llamada Drosha, que forma parte de un complejo llamado Microprocesador. Drosha corta los pri-miRNAs en precursores más cortos, llamados pre-miRNAs, que tienen aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud y tienen una estructura de tallo-bucle característica.
3. **Transporte al Citoplasma:** Los pre-miRNAs son transportados desde el núcleo al citoplasma por proteínas de transporte específicas.
4. **Procesamiento por Dicer:** En el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos y procesados por una enzima llamada Dicer, que corta los pre-miRNAs en fragmentos aún más cortos, de aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud. Estos fragmentos son los miRNA maduros.

5. Formación del Complejo RISC: Los miRNAs maduros se incorporan en un complejo multiproteico llamado Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). Uno de los miembros clave del RISC es la proteína Argonauta.
6. Unión al RNAm: Los miRNAs en el complejo RISC actúan como guías al unirse de manera complementaria a regiones específicas de los RNAm que contienen secuencias llamadas sitios de unión a miRNA. La complementariedad entre el miRNA y el RNAm provoca la regulación de la expresión génica.
7. Regulación de la Expresión Génica: Dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y el RNAm, pueden ocurrir diferentes mecanismos de regulación. Si la complementariedad es alta, puede resultar en la degradación del RNAm o en la inhibición de su traducción en proteínas. Si la complementariedad es parcial, puede influir en la eficiencia de la traducción o en la estabilidad del RNAm.

Papel de los miRNAs en la enfermedad

En el contexto de la enfermedad, los miRNAs pueden tener tanto funciones explicativas como terapéuticas (Pozniak et al., 2022).

Funciones Explicativas de los Procesos Patológicos:

1. Identificación de Biomarcadores: Los perfiles de miRNAs en enfermedades específicas pueden ser diferentes de los de tejidos sanos. Estos patrones de expresión alterados pueden utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades. La presencia o ausencia de miRNAs específicos en la sangre, la orina u otros fluidos corporales puede proporcionar información sobre la presencia y gravedad de la enfermedad (He et al., 2020).
2. Implicación en Mecanismos Patológicos: Los miRNAs pueden estar involucrados directamente en los mecanismos subyacentes de la enfermedad. Por ejemplo, ciertos

miRNAs pueden regular genes asociados con la proliferación celular, la apoptosis, la inflamación y otros procesos patológicos. Al comprender cómo los miRNAs contribuyen a estos procesos, se pueden identificar nuevas vías terapéuticas (Wojciechowska et al., 2017).

Funciones Terapéuticas de los miRNAs:

1. **Terapia de Sustitución:** Los miRNAs exógenos pueden administrarse para aumentar los niveles de un miRNA específico que esté disminuido en una enfermedad. Esta terapia puede restaurar la función normal de regulación génica y contrarrestar los efectos patológicos. Por ejemplo, se ha investigado la administración de miRNAs para suprimir la proliferación celular en ciertos tipos de cáncer (Ganju et al., 2017).
2. **Terapia de Silenciamiento:** Algunos miRNAs están asociados con la promoción de enfermedades, como en el caso de miRNAs oncogénicos. En estas situaciones, los enfoques de terapia génica pueden diseñarse para reducir la expresión de esos miRNAs específicos, inhibiendo así los efectos patológicos (Kilikevicius et al., 2022).

Papel de miRNA en el diagnóstico de patologías renales

La expresión alterada de los miRNAs se ha demostrado que está involucrada en el inicio y la progresión de numerosos procesos patológicos del riñón, como la nefropatía diabética, el cáncer renal y la lesión renal. Por ejemplo, (N. X. Chen et al., 2013) encontraron que los niveles de miR-125b, miR-145 y miR-155 eran más bajos en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) en etapas 3-5 en comparación con pacientes con función renal normal. En otro estudio, (Yu et al., 2019) identificaron y validaron funcionalmente un conjunto de miRNAs relacionados con el proceso de fibrosis en la enfermedad renal crónica. Además,

(Woroniecka et al., 2011) realizaron un análisis del transcriptoma de la enfermedad renal diabética en humanos y encontraron que varios miRNAs estaban diferencialmente expresados en comparación con los controles . Además, se sugiere que los miRNAs son biomarcadores diagnósticos y pronósticos para numerosas enfermedades. En el caso de la nefroesclerosis hipertensiva, se ha descubierto que los miRNAs son de gran importancia en la patogénesis de la enfermedad y en el posterior desarrollo de enfermedad renal en etapa terminal (Franczyk et al., 2022). Su destacada estabilidad en el plasma y orina los hacen biomarcadores atractivos y en algunos casos blancos terapéuticos. En el área de trasplante renal, los miRNAs han sido estudiados en el daño por isquemia reperusión, lesión renal aguda, rechazos mediados por células T con resultados variables. A la fecha son pocos los estudios que han evaluado el papel de los microRNAs como marcadores de rechazo mediados por anticuerpos. Algunos estudios han mostrado que miRNA´s involucrados en la inflamación, señalización de citocinas y apoptosis como miR146-5p, miR182, miR-21-3p, miR1228 y let-71 se encuentran regulados al alta en injertos con rechazos mediados por anticuerpos con una mediana capacidad de discriminación (Mukhadi et al., 2015). Los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155 se han mostrado incrementados en situaciones de daño endotelial, sin embargo, a pesar de ser este el principal blanco de los rechazos mediados por anticuerpos, solamente miR-155 ha sido estudiado en esta población (Soltaninejad et al., 2015).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen múltiples limitantes para el diagnóstico de rechazo debido a que no existe ningún biomarcador ideal lo suficientemente sensible o específico que permita el diagnóstico, guiar la respuesta el tratamiento y el pronóstico. El estándar oro para el diagnóstico del rechazo es la biopsia renal, procedimiento invasivo, costoso, no exento de

complicaciones y sujeta a errores de muestreo. Es por ello que existe la necesidad aún no satisfecha de contar con marcadores que puedan de manera rápida, precisa, económica y no invasiva identificar a pacientes con rechazo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe diferencia en la expresión de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155 en receptores de trasplante renal al comparar un grupo con y otro sin rechazo agudo mediado por anticuerpos?

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad renal crónica es una de las enfermedades con mayor impacto en la morbilidad y mortalidad de la población a nivel mundial, con un número cada vez mayor de afectados como resultado de una mayor incidencia de enfermedades crónicas degenerativas como diabetes mellitus e hipertensión.

El trasplante renal al mejorar la calidad de vida y supervivencia la población con enfermedad renal crónica, se considera el tratamiento de elección para aquellos pacientes que alcanzan estadios avanzados. Desafortunadamente, a pesar de que el trasplante renal incrementa la expectativa de la vida de manera significativa, muchos pacientes pierden el injerto y regresan a diálisis, necesitando un nuevo trasplante. En la actualidad la principal causa de pérdida del injerto renal es el rechazo mediado por anticuerpos. El diagnóstico de rechazo puede sospecharse cuando existe disfunción del injerto (elevación de creatinina o proteinuria) y requiere la confirmación mediante biopsia renal. Sin embargo, ni la creatinina ni la proteinuria son marcadores sensibles o específicos. Por otro lado, la biopsia renal es un procedimiento invasivo, costoso y sujeta a errores de muestreo.

Los miRNAs son un elemento clave como reguladores de la homeostasis y su desregulación ha sido demostrada en varias patologías, incluyendo la enfermedad renal. Debido a su estabilidad en el plasma y la orina, se han convertido en biomarcadores atractivos. Algunos miRNAs que se han asociado con el daño microvascular y siendo la micro vasculatura renal el blanco primario en los rechazos mediados por anticuerpos, es que el presente trabajo tiene como finalidad evaluar si la expresión de miRNAs varía entre los pacientes con y sin rechazo mediado por anticuerpos. En un segundo momento de confirmarse la expresión diferencial, estos biomarcadores podrían ayudar en el seguimiento para evaluar la respuesta a tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

1. Evaluar las concentraciones (expresión) de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155 en plasma de pacientes receptores de trasplante renal con y sin rechazo mediado por anticuerpos.

Objetivos secundarios

2. Evaluar si existe correlación entre el grado de inflamación en los capilares glomerulares y la expresión en plasma de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155.
3. Evaluar si existe correlación entre el grado de inflamación en los capilares peritubulares y la expresión en plasma de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155.
4. Evaluar si existe correlación entre la inflamación y fibrosis túbulo intersticial y la expresión en plasma de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155.

5. Determinar la correlación entre las MFI de anticuerpos donador específico y niveles plasmáticos de miRNAs.
6. Evaluar si existe correlación entre los niveles de creatinina séricos y proteinuria y la expresión plasmática de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155

METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional, analítico transversal, prospectivo con todos los sujetos con diagnóstico de trasplante renal y sospecha de rechazo agudo.

UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes mayores de 18 años atendidos con antecedente de trasplante renal en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Receptores de trasplante renal mayores de 18 años
- 2.- Filtrado glomerular estimado por creatina sérica ≥ 20 ml/min/1.73 m²
- 3.- Tiempo post-trasplante > 4 semanas
- 4.- Llevados a biopsia del injerto por protocolo o por indicación

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1.Falla primaria del injerto
- 2.- Neoplasia activa
- 3.- Infección activa
- 4.- Trasplantes multiorgánicos
- 5.-Pacientes que se rehúsen a participar en el protocolo

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- 1.- Pacientes con expedientes clínicos incompletos que no fueran susceptibles de análisis.
- 2.- Material insuficiente para realizar el análisis histopatológico y la medición de los miRNAs

3. - Sin determinación de anticuerpos donante específicos al momento de la biopsia.

4.-Pacientes que cuenten con expediente o información incompleta

TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizara un estudio piloto con 3 grupos de pacientes:

-Pacientes llevados a biopsia renal por protocolo y con hallazgos histopatológicos en la biopsia renal se reporten como categoría 1 de Banff (normales o con cambios no específicos).

-Rechazos mediados por anticuerpos o mixtos clínicos y subclínicos de acuerdo a los criterios diagnósticos de Banff 2019.

-Otras patologías: Se incluirán pacientes con diagnóstico de glomerulonefritis y rechazos celulares

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES GENERALES				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Peso	Fuerza con que la Tierra atrae a un cuerpo, por acción de la gravedad. Se ajusta con la talla de la persona y se relaciona con incremento del riesgo cardiovascular.	Con la persona usando la menor cantidad de ropa posible y en ayuno, se mide usando un estadímetro calibrado.	Cuantitativa continua	Kilogramos (Kg)
Talla	La distancia entre el plano de sustentación y el vértex craneal. Se usa para ajustar el peso del individuo	Con la persona estando sin calzado, se mide usando un estadímetro calibrado.	Cuantitativa continua	Metros (m)

Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Se comprobará la edad del paciente mediante la presentación de una credencial oficial	Cuantitativa discreta	Años
Sexo	El sexo es un proceso de combinación y mezcla de rasgos <u>genéticos</u> a menudo dando por resultado la especialización de <u>organismos</u> en variedades <u>femenina</u> y <u>masculina</u> (conocidas como sexos)	Se clasificará de acuerdo a las características fenotípicas del sujeto	Cualitativa dicotómica	Masculino/ Femenino
Indicación	Término que describe una razón válida para emplear una prueba diagnóstica, un procedimiento médico, un determinado medicamento, o técnica quirúrgica	Se realizan a consideración del médico tratante cuando existe disfunción del injerto o sospecha de mala adherencia terapéutica	Cualitativa dicotómica	Con indicación/ sin indicación
Biopsia renal percutánea por protocolo	Conjunto de acciones que se aplican, de modo normalizado, bien para el tratamiento de una cierta enfermedad.	Biopsia realizada de seguimiento post-trasplante en todos los pacientes considerados de alto riesgo para desarrollo de RAMA por la presencia de ADE's pre-trasplante detectados por PRA-SA, CF-XM o CDC-XM son sometidos a biopsia renal a los 3 meses post-trasplante en ausencia de disfunción del injerto.	Cualitativa dicotómica	Alto riesgo de RAMA/ bajo riesgo de RAMA
Injerto normal	Piel, hueso u otro tejido sano que se toma de una parte del cuerpo y que se usa para reemplazar tejido enfermo o lesionado extraído de otra parte del cuerpo.	Sin entidad patológica específica.	Cualitativa dicotómica	Injerto normal/ injerto anormal
El rechazo agudo (activo)	Resistencia que presenta un cuerpo a la fuerza ejercida por otro, obligándolo a retroceder en su curso o movimiento.	Se caracteriza por tubulitis, inflamación intersticial, glomerulitis, capilaritis peritubular y arteritis.	Cualitativa dicotómica	Injerto normal/ injerto anormal
Rechazo agudo asociado a anticuerpos	Deterioro agudo de la función de un riñón trasplantado, potencialmente reversible, secundario a una	Presencia de evidencia morfológica, inmunohistológica y serológica por clasificación de Banff 2019.	Cualitativa dicotómica	Injerto con RAMA/ injerto con otras alteraciones

	respuesta inmunológica			
Biomarcador	Molécula determinada por método no invasivo, estable y sensible, y debe reflejar de manera dinámica y específica la patología de la enfermedad para guiar el diagnóstico, la respuesta al tratamiento y el pronóstico.	Molécula determinada por método PCR para determinar su concentración sérica.	Cuantitativa discreta	Copias
Creatinina sérica	Concentración total de creatinina en una muestra de sangre.	Normal: < 1 mg/dl	Cuantitativa continua	mg/dl
Proteínas totales en orina en 24 horas	Concentración total de proteínas en una muestra de orina recolectada en 24 horas.	Normal: <140 mg/día	Cuantitativa continua	Mg en 24 horas
Albumina en orina en 24 horas	Concentración total de albumina en una muestra de orina recolectada en 24 horas.	Normal: <30 mg/día	Cuantitativa continua	Mg en 24 horas
Micro RNA	Concentración total del micro RNA 21 y 155 del complemento en una muestra de sangre.	Se medirá por reacción en cadena de la polimerasa	Cuantitativa continua	
Fibrosis intersticial	Nivel de inflamación en la zona tubular a nivel renal secundario a un proceso inflamatorio	Ausente Grado 1 <=20% Grado 2 20 a 50% Grado 3 >=50%	Cualitativa politómica	Ausente/ grado I/ grado II/ grado III

PROCEDIMIENTO GENERAL

1. Se trató de un estudio piloto con pacientes trasplantados de acuerdo a selección consecutiva sometidos a biopsia por indicación de su médico tratante o protocolizada de acuerdo a las prácticas habituales del servicio, sin intervención de los investigadores.
2. Se incluyeron de manera consecutiva a receptores de un trasplante renal con una tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) ≥ 20 ml/min/1.73 m² y tiempo postrasplante

> 12 semanas a quienes se les realizó biopsia renal en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez entre mayo de 2022 y marzo de 2023 y se clasificaron de acuerdo a sus hallazgos histopatológicos, que incluyo 3 grupos: biopsias normales o con hallazgos inespecíficos, rechazos mediados por anticuerpos y otras patologías (glomerulonefritis, NTA, etc).

3. Todos los pacientes fueron enviados a determinación de ADEs previo a toma de BRP.
4. El día de la BRP se citó con ayuno de 8 horas para la toma de muestra única de sangre con tubo vacutainer BD color morado con EDTA, la cual se llevó al departamento de inmunología para su almacenamiento. Se realizó determinación de miRNAs en suero simultánea a la BRP.
5. Las biopsias fueron valoradas por una sola nefropatóloga clasificándolas de acuerdo a los hallazgos de la microscopia de luz, inmunofluorescencia, tinciones especiales (C4d), microscopia electrónica.
6. Se capturo la información de estudios para clínicos
7. Los pacientes se clasificaron en 3 grupos:
 - Pacientes llevados a biopsias normales o con cambios no específicos
 - Rechazos mediados por anticuerpos o mixtos de acuerdo a los criterios diagnósticos de Banff 2019.
 - Otras patologías: Se incluirán pacientes con diagnóstico de glomerulonefritis y rechazos celulares
8. La cuantificación de los miRNA se realizó de la siguiente manera: se utilizarán 200 µL de plasma para la detección de los miRNAs: miR-1, miR-21, miR-126, miR-150-5p y miR-155-5p utilizando reactivos y protocolos para el TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit y el TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems). Las

reacciones de RT-PCR se realizaron con cebadores de bucle de tallo personalizados (Applied Biosystems) específicos para la secuencia madura correspondiente obtenida de miRBase (disponible en: <http://www.miRBase.org> [consultado el 3 de junio de 2013]) [34]. La amplificación de reacciones de cationes se realizó utilizando el sistema de PCR en tiempo real CFX96 (BIORAD). Los datos de la RT-PCR cuantitativa se analizaron utilizando el método del ciclo de umbral comparativo (Ct), con hsa-miR-16 como las referencias endógenas para plasma. La cantidad de miRNA fue dada por la fórmula aritmética $2^{-\Delta Ct}$, donde el Ct es el punto en el que la fluorescencia de la reacción del ensayo TaqMan supera el límite del umbral. ΔCt es la diferencia en los valores de Ct entre el miRNA diana y el control hsa-miR-16 y U6 para plasma, ΔCt se dio como el Ct de hsa-miR-16 menos el Ct de cada miRNA. Se tomó en cuenta que los niveles de expresión relativos (es decir, normalizados a los niveles de hsa-miR-16 en la misma muestra) son por definición valores sin unidades.

9. Codificación y elaboración de base de datos de Microsoft Excel de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, para posteriormente ingresarlos en el programa IBM SPSS (Statistical Package for the Social Science) Statistics 26 para su análisis.
10. Elaboración de resultados, con posterior discusión con base en lo reportado en la bibliografía.
11. Presentación de la investigación completa y resultados ante el comité tutorial.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de los pacientes se sintetizaron de acuerdo a su categoría, las variables cualitativas se reportaron como frecuencias simples y porcentajes, mientras que las

cuantitativas con medidas de tendencia central (mediana) y dispersión (Rango intercuartílico). El comparativo entre los grupos se realizó mediante Chi cuadrada, ANOVA o Kruskal Wallis de acuerdo al tipo de variable y su distribución. Se realizaron pruebas de correlación con coeficiente de Pearson y Spearman de acuerdo al tipo de variable y su distribución. Para evaluar el desempeño de la prueba se calculó el área bajo la curva e identifiqué el punto de corte que mejor sensibilidad y especificidad brindó. Se calcularon los valores predictivos positivos y negativos

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si el valor de p fue <0.05 , todo esto se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics 26.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente proyecto se conformó de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la 64a Asamblea General de la Asociación Médica Mundial del año 2013, además de códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación clínica.

De acuerdo con el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación en salud, título segundo “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos”, capítulo I, artículo 16 durante este estudio se protegerá la privacidad del individuo sujeto a investigación. De acuerdo con el Artículo 17, fracción I, se considera a esta investigación como “sin riesgo”, debido a que los datos de interés se obtuvieron mediante lo constatado en el expediente clínico, por lo que no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada en las variables de los sujetos.

Esta investigación y todos sus procedimientos de estudio se apegaron a las normas éticas,

al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud y se llevaron a cabo en plena conformidad con los principios de la “Declaración de Helsinki” (y sus enmiendas en Tokio, Venecia, Hong Kong y Sudáfrica) y se respetaron cabalmente los principios contenidos en el Código de Nuremberg y el Informe Belmont; donde el investigador garantiza que:

- a. Se realizó una búsqueda minuciosa de la literatura científica sobre el tema a realizar.
- b. El protocolo fue sometido a evaluación por el comité de Investigación de la Unidad Médica del instituto nacional de cardiología Ignacio Chávez.
- c. Se utilizó consentimiento informado para la obtención de muestras de sangre para cuantificación de miRNAs con número institucional del proyecto de investigación 23-1356.
- d. Este protocolo fue realizado por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un equipo competente y certificado en su especialidad.
- e. Este protocolo guardó la confidencialidad de las personas, y no se obtuvo ningún beneficio para los participantes. El mayor beneficio fue de aspecto científico.

RECURSOS HUMANOS Y FINANCIEROS

Para la realización de este estudio se necesitaron los siguientes recursos humanos:

- Investigador principal y asesor metodológico: Dr. Cesar Flores Gama
- Investigadores asociados: Dr. Fausto Sánchez Muñoz
- Investigador asociado: Dr. Ivan Zepeda Quiroz. Médico residente de 3er año de la especialidad de nefrología, encargado de la recolección, almacenamiento, análisis e interpretación de los datos.

Para la realización de este estudio se necesitaron los siguientes recursos físicos:

- Expedientes clínicos en su forma física y electrónica
- Sistema informático de captura y análisis de datos (Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 26)
- Sistema informático de escritura (Microsoft Word, Adobe Acrobat PDF)
- Computadora

Cualquier recurso financiero que fue necesitado para la realización de este estudio fue cubierto en su totalidad por los investigadores.

MATERIAL Y METODOS

1.1 Características clínicas

Realizamos un estudio transversal en todos los receptores adultos consecutivos de un trasplante renal con una tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) ≥ 20 ml/min/1.73 m² y tiempo postrasplante > 12 semanas a quienes se les realizó biopsia renal en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" entre mayo de 2022 y marzo de 2023.

Se excluyeron los receptores de trasplante combinado o trasplante renal tras otro trasplante de órgano sólido, y aquellos con una neoplasia o infección activa. Además, los pacientes fueron eliminados si faltaba la información necesaria o si el material para realizar el análisis histopatológico o la medición de miRNAs era inadecuado para la interpretación. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de nuestro centro (23-1356) y realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes dieron su consentimiento.

1.2 Detección de anticuerpos anti-HLA circulantes

Todos los pacientes incluidos tenían una prueba cruzada de citotoxicidad dependiente del complemento negativa. Los anticuerpos anti-HLA pre y pos trasplante se monitorizaron en 1 laboratorio de histocompatibilidad. Los anticuerpos contra los loci HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB345, -DQ y -DP en los sueros del receptor se determinaron para HLA-DSA al nivel de resolución de perlas de antígeno único (SAB). Un resultado positivo para HLA-DSA en

circulación se definió como una intensidad de fluorescencia media (MFI) de la perla específica del donante superior a 500 en el momento de la biopsia.

1.3 Valoración clínico patológica

Los datos clínicos se recogieron durante el seguimiento clínico habitual. Se incluyeron todos los aloinjertos renales postrasplante clínicamente indicados y las biopsias especificadas por el protocolo. Las biopsias especificadas por el protocolo se realizan a los 3 y 12 meses después del trasplante en ausencia de disfunción del aloinjerto para pacientes retrasplantados, aquellos con HLA-ADE preexistente o con un panel de anticuerpos reactivos (PRA) $\geq 30\%$.

Todas las biopsias fueron analizadas por un único nefrólogo patólogo. La gravedad de las lesiones histológicas se puntuó según los criterios de Banff 2019. Se realizó una tinción inmunohistoquímica de C4d en un tejido congelado. El diagnóstico de rechazo se estableció cuando las muestras de biopsia cumplían los tres criterios de Banff para ABMR, mediante la combinación de puntuaciones de Banff para glomerulitis, capilaritis peritubular, arteritis, microangiopatía trombótica, depósito de C4d y HLA_ADE. Las biopsias de control fueron aquellas consideradas normales o con cambios inespecíficos según la clasificación de Banff 2019. Se utilizó la clasificación de Banff 2019, considerando como categoría 1 aquellas biopsias normales o cambios inespecíficos y como categoría 2 el rechazo agudo mediado por anticuerpos por evidencia morfológica caracterizada por inflamación microvascular ($g > 0$ y/o $cpt > 0$), intimal o transmural. arteritis ($v > 0$) o MAT aguda en ausencia de otra causa, evidencia inmunohistológica por tinción lineal de C4d en cpt que puede o no estar presente, al menos inflamación microvascular moderada ($[g + cpt] \geq 2$) y serológica con la determinación de los ADEs.

RESULTADOS

De las 30 biopsias de aloinjerto renal incluidas en 30 pacientes, 3 fueron eliminadas por falta de datos y finalmente 27 pacientes fueron considerados para el análisis estadístico. Dentro de las características sociodemográficas de la población estudiada, el 51.9% fueron mujeres, con edad promedio de 42 años (32-51), en la mayoría de los paciente se desconocía la causa de la ERC (59.3%), el tiempo promedio entre el trasplante y la biopsia fue 80.5 meses, la mayoría fueron trasplante de donante vivo (51.8%) (Tabla 1).

La creatinina promedio al momento de la biopsia fue de 1.5 mg/dl, 70% de las biopsias se realizaron por disfunción del injerto y el resto fueron de manera protocolizada. Un total de 15 biopsias fueron catalogadas con RAMA y 12 como normales o con alteraciones mínimas no específicas (figura 1).

Se encontró que en el grupo de pacientes con RAMA eran más jóvenes, con mayor frecuencia se documentó mala adherencia terapéutica y sus biopsias fueron realizadas a un mayor tiempo post-trasplante en comparación con el grupo sin RAMA, sin diferencias en el tipo de donante, terapia de inducción o mantenimiento, los niveles de creatinina sérica ni el motivo de la biopsia (indicación vs protocolo) entre los grupos.

De todos los pacientes incluidos se determinó el riesgo inmunológico, 63% tenían antecedentes de alosensibilización, 40.9 % presentaba anticuerpos donador específico (ADEs) pre trasplante, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.



Figura 1. Diagrama de flujo

	Total (n=27)	Sin rechazo (n=12)	RAMA (n=15)	valor p
Mujer	14 (51.9)	8 (66.7)	6 (40)	0.16
Edad	42 (32-51)	51 (37-59)	34 (31-42)	0.03
IMC (kg/m²)	26±5	26±6	25.8±4	0.84
Etiología				0.12
Desconocida	16 (59.3)	4 (41.6)	11 (73.3)	
GMN	9 (33.3)	5 (41.7)	4 (26.7)	
Diabetes	2 (7.4)	2 (16.7)	0	
Meses post-trasplante	80.5 (16-112)	37.8 (10.2-102)	85 (37.5-112)	0.22
Donante fallecido	13 (48.2)	7 (58.3)	6 (40)	0.29
Disfunción	19 (70.4)	4 (33.3)	4 (26.7)	0.52
Creatinina (mg/dl)	1.5 (0.9-2.1)	1.1 (0.9-2.0)	1.7 (1.2-2.1)	0.33
Inducción				1
MPD		1 (8.3)	1 (6.7)	
IL2r-inh		7 (58.3)	8 (53.3)	
Timoglobulina		4 (33.3)	6 (40)	
Mala adherencia	8 (29.6)	2 (16.7)	6 (40)	0.19

Alosensibilización	17 (63)	6 (50)	11 (73.3)	0.2
PRA I	1 (0-5)	1 (0-2)	3 (0-10)	0.34
PRA II	2 (1-6)	2 (0.5-6)	2 (1-44)	0.57
ADEs pre trasplante	9(40.9)	2 (22.2)	7 (53.9)	0.15
ADE's post trasplante	20 (90.9)	6 (75)	15 (100)	0.12

Tabla 1. Características basales.

2.1 Características histopatológicas

De cada una de las biopsias se describieron los cambios glomerulares 'g' (glomerulitis), aumento de la matriz mesangial (mm), glomerulopatía por trasplante (cg), además de los cambios tubulares como tubulitis (t) y atrofia tubular (ct), mientras que para intersticio la inflamación intersticial (i) y fibrosis intersticial (ci). La inflamación tubulointersticial (ti) y la fibrosis intersticial con atrofia tubular (i-IFTA). En cuanto a los vasos se determinó arteritis de la íntima (v) y engrosamiento fibroso de la íntima arterial (cv) (tabla 3).

Aquellos pacientes con RAMA, presentaron ADEs de novo en el 100%, a diferencia del 75% que no tuvieron rechazo.

Con mayor frecuencia el grupo de pacientes con RAMA presentación inflamación glomerular (100% vs 58.3%, P=0.01), mesangial (100% vs 58.3%, P=0.01) y en los capilares peri tubulares (100% vs 8.3%, P<0.001). De manera similar, la inflamación tubular (53.3% vs 8.3 %, P=0.02) e intersticial (60% vs 0%, P=0.001) se presentaron con mayor frecuencia en el grupo con RAMA. Para las lesiones crónicas, solo la duplicación de los capilares glomerulares (40% vs 0%, P=0.02) y los cambios vasculares crónicos (53.3% vs 25%, P=0.14) fueron diferentes entre los grupos, con un mayor grado de afección en el grupo con rechazo.

	Total (n=27)	Sin rechazo (n=12)	RAMA (n=15)	valor p
Esclerosis	0 (0-25)	0 (0-21)	9 (0-31)	0.55
g>0	2 (81.5)	7 (58.3)	15 (100)	0.01
cpt>0	16 (59.3)	1 (8.3)	15 (100)	<0.001
mm>0	22 (81.5)	7 (58.3)	15 (100)	0.01
i>0	9 (33.3)	0	9 (60)	0.001
t>0	9 (33.3)	1 (8.3)	8 (53.3)	0.02
v>0	3 (11.1)	0	3 (20)	0.16
cg>0	6 (22.2)	0	6 (40)	0.02
ci>0	22 (81.5)	9 (75)	13 (86.7)	0.39
ct>0	22 (81.5)	9 (75)	13 (86.7)	0.39
cv>0	11 (40.7)	3 (25)	8 (53.3)	0.14
i-ifta>0	14 (52.9)	5 (41.7)	9 (60)	0.29
c4d>0	9 (33.3)	5 (41.7)	4 (26.7)	0.34

Tabla 3. Características histológicas por Banff 2019

3.1 Expresión diferencial de miR-150-5p en muestras de plasma en pacientes con

RAMA

Como se muestra en la Figura 2, se examinaron un total de 5 miRNAs en el plasma, observándose una expresión mayor de miR-150-5p en el grupo con RAMA, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.0012$). De igual forma, se exploró la expresión de miR 1, 21, 126 y 150, los cuales no mostraron diferencias significativas en la expresión de paciente con injerto sin rechazo y RAMA.

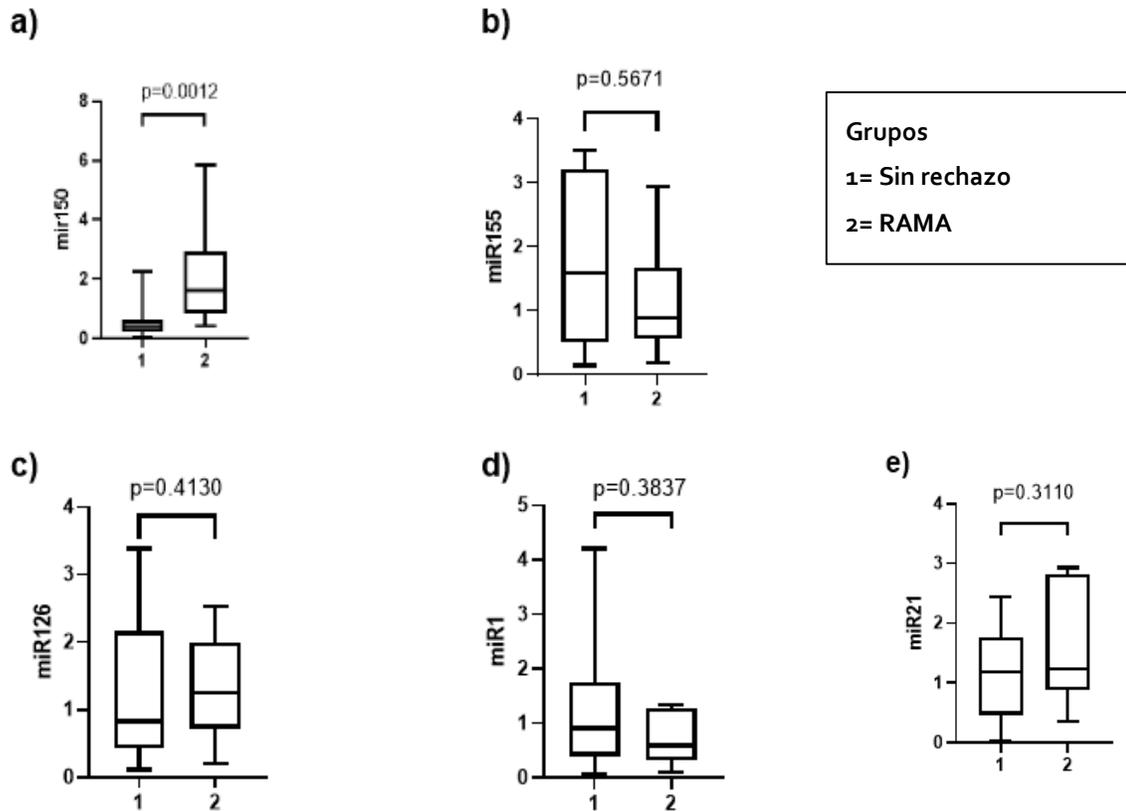


Figura 2. Niveles de expresión de miR-1, miR-21, miR-126, miR-150 y miR-155 entre pacientes con y sin rechazo de trasplante.

Al comparar la expresión en plasma de miR-150-5p con los hallazgos histológicos, observamos que en las biopsias renales con inflamación microvascular (imv), ya sea como glomerulitis (g) o como capilaritis peritubular (cpt), había una mayor expresión de miR-150-5p que el grupo sin daño microvascular (figura 3).

Por otro lado, se evaluó la expresión de miR-1, miR-21, miR-126 y miR-155 en el plasma en relación con las diversas lesiones histológicas de la biopsia. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de estos miRNAs y las lesiones histológicas.

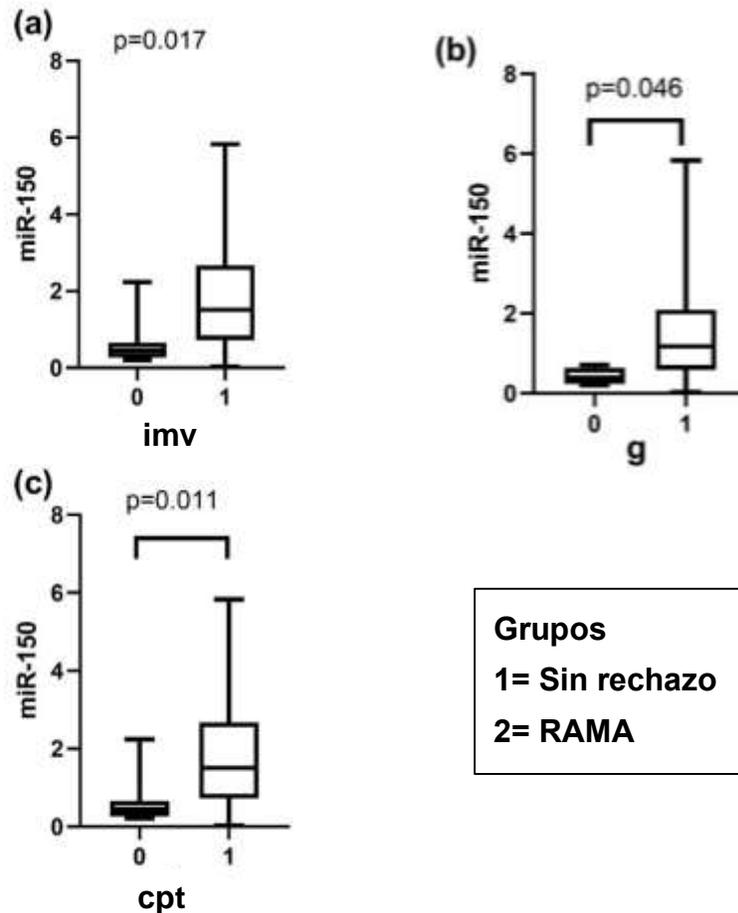


Figura 3. Niveles de expresión relativos del miR-150-5p en plasma de acuerdo a la a) presencia de inflamación microvascular (imv), b) glomerulitis (g) y c) capilaritis peritubular (cpt)

La expresión de miR-150-5p en plasma mostró una correlación moderada con el grado de inflamación tanto en los capilares glomerulares como en los peritubulares (figura 4), y no así con otras lesiones histológicas tanto agudas como crónicas.

Asimismo, se evaluaron las demás variables histológicas que se describen en la escala de Banff 2019. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de miR-150-5p en relación con estas variables.

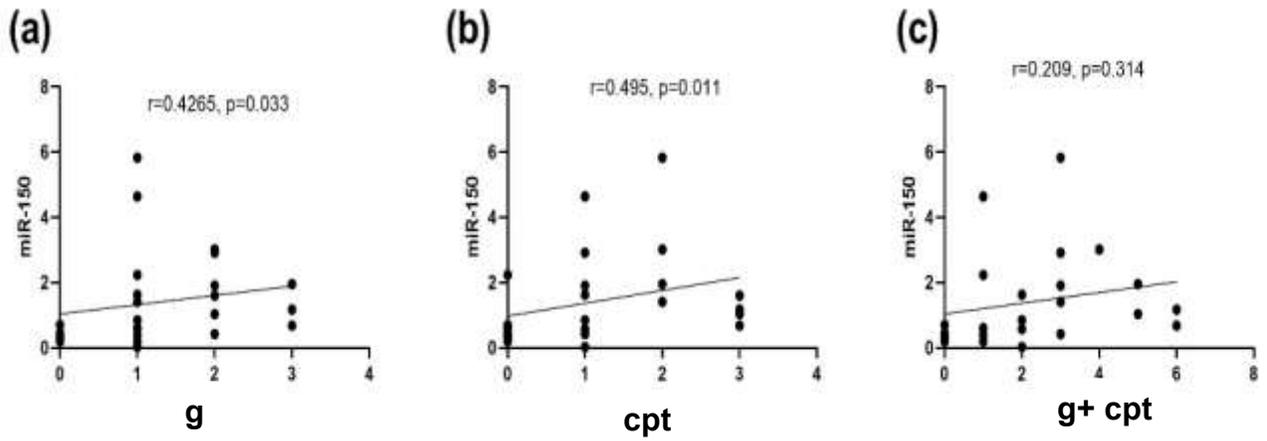


Figura 4. Análisis de correlación mediante Tau-b de Kendall entre miR-150-5p y características histológicas: a) g, b) cpt y c) g+cpt.

Se exploró la relación entre la expresión de miRNAs y los niveles de creatinina en el momento del rechazo. La expresión sérica de los miR-150-5p, miR-155 y miR-126 no mostró correlación con los niveles de creatinina, mientras los niveles de miR-21 si mostraron una correlación positiva moderada.

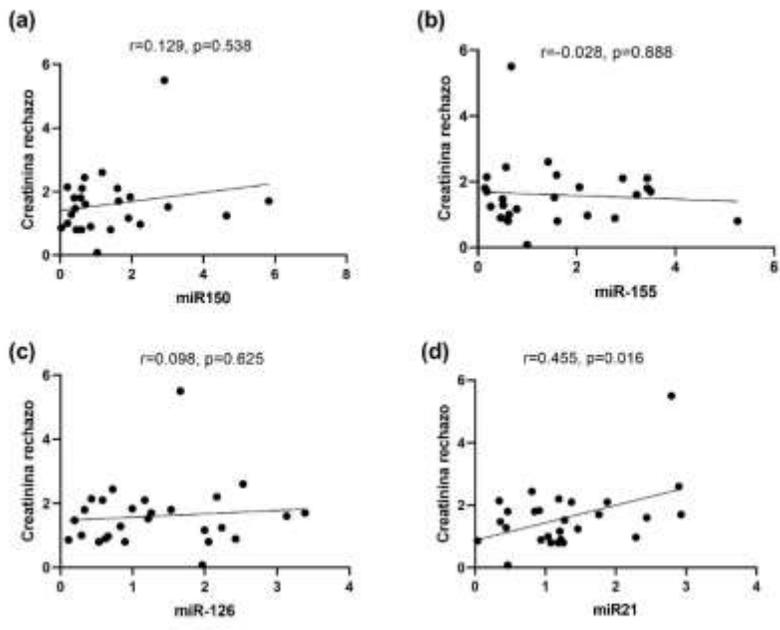
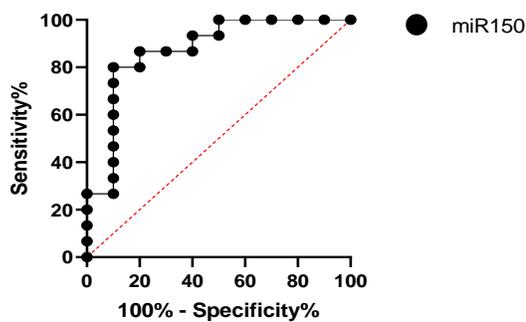


Figura 5. Correlación de Spearman entre los niveles de expresión de los diferentes miRNAs y niveles de creatinina al rechazo.

3.2 Desempeño del miR-150-5p circulante en el diagnóstico de RAMA

Con el propósito de evaluar la capacidad predictiva del miR-150-5p validado para el riesgo de RAMA, se construyó una curva ROC comparando los casos de RAMA con pacientes que no experimentaron rechazo. Esto se realizó utilizando los datos obtenidos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa de validación. Los resultados revelaron que miR-150-5p demostró una capacidad de discriminación efectiva, con un área bajo la curva (AUC) de 0.87 (IC 95%). El umbral óptimo de expresión para predecir RAMA se estableció en >0.96 , lo que proporcionó una sensibilidad del 63.16% y una especificidad del 89.47%.

a)



miRNA	Area Under the Curve ROC	P value
miR150	0.8733 (0.7195 to 1.000)	0.0019

Figura 4. a) Análisis ROC del área bajo la curva miR-150-5p para discriminar entre dos grupos de interés.

DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó las concentraciones (expresión) de los miRNAs 1, 21, 126, 150 y 155 en suero de pacientes receptores de trasplante renal con y sin rechazo mediado

por anticuerpos en biopsias renales por indicación y protocolizadas. Solo miR150-5p tuvo una expresión diferente entre los grupos, con un mayor nivel en los pacientes con RAMA. Encontramos que mayores niveles de inflamación microvascular, tanto como glomerulitis como capilaritis peritubular se asociaron con un nivel más alto de miR150-5p en suero, y no hacía para las lesiones agudas o crónicas en otros compartimentos renales. Solo los niveles de miR21 una relación con los niveles de creatinina sérica, probablemente por su eliminación renal como ha sido reportado en estudios previos.

El miR-150-5p se encuentra asociado a funciones reguladoras inmunitarias, proliferación, la activación y la apoptosis de los linfocitos B y T, y se expresa selectivamente en los ganglios linfáticos, el bazo y las células T y B maduras. Además, se ha observado que el miR-150-5p podría ser un supresor de la generación angiopoetina 2 con un papel clave en la resolución de la lesión vascular y la reducción de la mortalidad resultante de la sepsis [(Mukhadi et al., 2015) así como su sobre expresión en ratones con nefritis lúpica y su papel pronostico en pacientes con nefropatía por IgA (Pawluczyk et al., 2021). Esta expresión en los linfocitos T y B , así como su papel en la reparación vascular, principales células y blanco inmunológico en el RAMA, que miR-150-5p puede jugar un papel importante como biomarcador.

El miR-150-5p ha sido estudiado en pacientes con rechazo agudo, mostrado una mayor expresión en pacientes con rechazo celular agudo en comparación con pacientes sin rechazo (Soltaninejad et al., 2015) donde la determinación del miRNA fue realizado a través de la extracción de RNA en bloques de parafina; en nuestro caso no fue posible explorar su papel en el rechazo mediado por células T, ya que debido al riesgo inmunológico basal de nuestra población y la terapia inmunosupresora actual, solo se registró un caso con rechazo celular. Por otra parte, Alfaro et al observo una disminución

en la expresión de miR-150-5p en pacientes con rechazo agudo independientemente del tipo de rechazo, donde se obtuvieron mediante el aislamiento de leucocitos de sangre periférico, observándose que las células CD4+, disminuyen los niveles de miR-150 intracelulares en pacientes con rechazo agudo. El estudio de Candia et al. 2013 demostró que después de activar las células CD4+, se produce una disminución de miR-150 a nivel intracelular correlacionado con el aumento del suero. Esta premisa podría explicar las diferencias entre nuestro estudio y lo reportado previamente, donde los pacientes con RAMA aumentan los niveles séricos de miR-150-5p pero disminuyen los intracelulares como resultado de la activación de las células CD4+. Nuestro hallazgo es compatible con lo reportado en los modelos de trasplante pancreático murino, donde se ha documentado elevación del miR-150-5p en plasma, el cual se asoció con el rechazo del injerto y la destrucción de las células β (Roat et al., 2019).

En cuanto a los estudios que han explorado sobre la utilidad de los niveles de miR-150-5p como biomarcador en los pacientes con trasplante renal, aún hay resultados de carácter controversial. Un estudio publicado en 2017 mostró que el aumento de miR-150-5p en plasma puede ser biomarcador en trasplante renal (Zununi et al., 2017). Mientras que en 2022 se describió que solo en mujeres miR-150-5p disminuía en caso de disfunción pos trasplante (Ko SY et al., 2022).

Dentro de nuestros hallazgos se reportó el aumento en la expresión de miR-150-5p en las biopsias de injerto que mostraban inflamación micro vascular caracterizada por capilaritis peritubular (cpt) y glomerulitis (g), donde se observó un incremento de miR-150-5p conforme se incrementaba el porcentaje de cpt, las modificaciones en la expresión de miR-150-5p en lesión vascular han sido documentada en pacientes con sepsis, considerándose un nuevo supresor de la generación angiopoyetina 2 (Ang2), con un

papel clave en la resolución de lesiones vasculares y la reducción de la mortalidad en estos pacientes (Rajput et al., 2016). Es notable que la diferencia en la expresión sea menos marcada en los casos de cpt y g grado 3. A pesar de esto, es importante destacar que esta expresión sigue siendo consistentemente superior en comparación con los pacientes sin RAMA, donde podría estar asociado a que el daño vascular es demasiado importante que condicione un consumo del miR-150-5p sérico en busca de la resolución del daño endotelial. De igual forma el miR-150-5p se ha propuesto como un posible mediador funcional de la fibrosis renal que en pacientes con nefropatía por IgA, podría predecir el riesgo de progresión (Pawluczyk et al., 2021) en este contexto, la presencia de miR-150-5p en pacientes con RAMA podría estar condicionando la regulación de fibrosis. Como se demostró en un estudio experimental de ratones (Luan et al., 2020) donde la inhibición de miR-150 tuvo potencial para prevenir la fibrosis tubulointersticial, mediante la supresión de la vía SOCS1/JAK/STAT, evidenciando de igual forma que el aumento en la expresión de miR-150 en tejido renal condiciona mayor fibrosis. Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro estudio, es el primero en realizar una relación entre los niveles de expresión de miR-150-5p y hallazgos histopatológicos, evidenciando que la elevación sérica es mayor en aquellos que presentan inflamación micro vascular, explorándose tanto el grado de fibrosis así como la inflamación aguda sobre crónica, sin encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-150-5p, aunque si una tendencia a la disminución con un mayor grado de fibrosis.

Varios estudios han sugerido que los niveles de expresión de miRNAs pueden verse afectados por la tasa de filtración glomerular (TFG), lo que lleva a una acumulación de estas moléculas en suero debido a una menor eliminación (Peters et al., 2020). Sin embargo, en nuestro estudio, no se observó una correlación entre los niveles de miR-150-

5p y los niveles de creatinina, lo que sugiere que esta molécula no está influenciada por la función renal y su determinación no se ve alterada por ella. Solo miR21 mostró una correlación positiva con la creatina sérica.

El aumento en la expresión de miR-150-5p en pacientes con RAMA podría estar asociados a un conjunto de genes diana como el gen MBD6, que traduce la proteína MBD6, la que se une al ADN metilado y participa en procesos de envejecimiento, proliferación y supervivencia celular (Jung et al., 2013). Considerando que la modificación de sus niveles séricos podría ser una respuesta importante para atenuar un evento de rechazo renal, sin embargo, es importante destacar que los diferentes estudios que han intentado validar al miR-150-5p no han sido homogenizados en cuanto al tipo de rechazo así como el sitio de extracción del miRNA, teniendo en cuenta que nuestro estudio tiene la intención de proponer al miR-150-5p como un biomarcador, es importante destacar que la extracción de dicho miRNA fue sérico, donde se evidencia su elevación a diferencia del estudio de Alfaro et al., 2021. . Dicha variación es compatible con la activación de CD4+. Reconocemos que el presente estudio tiene limitantes. El tamaño de muestra es pequeño, siendo necesarios estudios a futuro con mayor número de pacientes, no obstante, es importante señalar que la mayoría de los estudios que han investigado la expresión de miRNAs cuentan con muestras de tamaño reducido, e incluso algunos de ellos tienen tamaños muestrales inferiores a los de nuestra población. Otra parte importante, es considerar que este miRNA, únicamente fue explorado en pacientes con RAMA, descartando los rechazos celulares, ya que actualmente, este tipo de rechazo es mucho menos frecuente gracias a las nuevas terapias de inducción.

Cabe mencionar que se requiere continuar con la búsqueda no satisfecha de biomarcadores que permitan el diagnóstico más temprano, no invasivo y seguimiento

dinámico del rechazo, se han descrito múltiples variaciones en los niveles de miRNA en pacientes con patologías renales, donde se han descrito de igual forma modificaciones en los niveles de miRNAs en pacientes con trasplante renal y rechazo.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que pacientes con TR que presentan RAMA tienen un incremento sérico en la expresión de miR-150-5p a diferencia de los trasplantes sin rechazo, con estos hallazgos, consideramos que el miR-150-5p podría tener un potencial para diagnosticar RAMA. Es necesario realizar estudios futuros para corroborar estos resultados y aplicarse en la práctica clínica que pudieran servir como un suplente de la biopsia renal o como una prueba pre test que no condicione la realización de un procedimiento invasivo de manera innecesaria.

FUTURAS PERSPECTIVAS

La investigación sobre microRNAs en trasplantes renales promete avances emocionantes. Estas pequeñas moléculas de RNA podrían servir como biomarcadores para detectar rechazo y disfunción del injerto de manera no invasiva, así como para personalizar tratamientos adaptados a cada paciente. Además, la modulación de microRNAs específicos podría abrir la puerta a terapias innovadoras que regulen la respuesta inmunológica y promuevan la tolerancia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecassis, M., Bartlett, S. T., Collins, A. J., Davis, C. L., Delmonico, F. L., Friedewald, J. J., Hays, R., Howard, A., Jones, E., Leichtman, A. B., Merion, R. M., Metzger, R. A., Pradel, F., Schweitzer, E. J., Velez, R. L., & Gaston, R. S. (2008). Kidney Transplantation as Primary Therapy for End-Stage

- Renal Disease: A National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/KDOQI™) Conference. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3(2), 471. <https://doi.org/10.2215/CJN.05021107>
- Alfaro, R., Legaz, I., Jimenez-Coll, V., El Kaaoui El Band, J., Martínez-Banaclocha, H., Galián, J. A., Parrado, A., Mrowiec, A., Botella, C., Moya-Quiles, M. R., Boix, F., de la Peña-Moral, J., Minguela, A., Llorente, S., & Muro, M. (2021). MicroRNA expression changes in kidney transplant: Diagnostic efficacy of mir-150-5p as potential rejection biomarker, pilot study. *Journal of Clinical Medicine*, 10(13). <https://doi.org/10.3390/jcm10132748>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Callemeyn, J., Lamarthée, B., Koenig, A., Koshy, P., Thauinat, O., & Naesens, M. (2022). Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney International*, 101(4), 692–710. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2021.11.029/ATTACHMENT/470EF944-3ADE-4AD6-BF11-4C97FEC80C46/MMC1.DOCX>
- Carminatti, M., Tedesco-Silva, H., Silva Fernandes, N. M., & Sanders-Pinheiro, H. (2019a). Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: A focus on traditional risk factors. In *Nephrology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 141–147). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/nep.13483>
- Carminatti, M., Tedesco-Silva, H., Silva Fernandes, N. M., & Sanders-Pinheiro, H. (2019b). Chronic kidney disease progression in kidney transplant recipients: A focus on traditional risk factors. In *Nephrology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 141–147). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/nep.13483>
- Chen, N. X., Kiattisunthorn, K., O'Neill, K. D., Chen, X., Moorthi, R. N., Gattone, V. H., Allen, M. R., & Moe, S. M. (2013). Decreased MicroRNA Is Involved in the Vascular Remodeling Abnormalities in Chronic Kidney Disease (CKD). *PLoS ONE*, 8(5), 64558. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064558>

- Chen, T. K., Knicely, D. H., & Grams, M. E. (2019). Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 322, Issue 13, pp. 1294–1304). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.14745>
- Cooper, J. E. (2020). Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3), 430–438. <https://doi.org/10.2215/CJN.11991019>
- de Candia, P., Torri, A., Gorletta, T., Fedeli, M., Bulgheroni, E., Cheroni, C., Marabita, F., Crosti, M., Moro, M., Pariani, E., Romanò, L., Esposito, S., Mosca, F., Rossetti, G., Rossi, R. L., Geginat, J., Casorati, G., Dellabona, P., Pagani, M., & Abrignani, S. (2013). Intracellular Modulation, Extracellular Disposal and Serum Increase of MiR-150 Mark Lymphocyte Activation. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075348>
- Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends in Genetics*, 38(6), 613–626. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2022.02.006>
- Franczyk, B., Gluba-Brzózka, A., Olszewski, R., Parolczyk, M., Rysz-Górczyńska, M., & Rysz, J. (2022). miRNA biomarkers in renal disease. In *International Urology and Nephrology* (Vol. 54, Issue 3, pp. 575–588). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11255-021-02922-7>
- Ganju, A., Khan, S., Hafeez, B. B., Behrman, S. W., Yallapu, M. M., Chauhan, S. C., & Jaggi, M. (2017). miRNA nanotherapeutics for cancer. In *Drug Discovery Today* (Vol. 22, Issue 2, pp. 424–432). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.014>
- Hanssen, O., Erpicum, P., Lovinfosse, P., Meunier, P., Weekers, L., Tshibanda, L., Krzesinski, J. M., Hustinx, R., & Jouret, F. (2017). Non-invasive approaches in the diagnosis of acute rejection in kidney transplant recipients. Part I. in vivo imaging methods. In *Clinical Kidney Journal* (Vol. 10, Issue 1, pp. 97–105). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfw062>

- He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2628. <https://doi.org/10.7150/IJBS.47203>
- Jadoul, A., Lovinfosse, P., Bouquegneau, A., Weekers, L., Pottel, H., Hustinx, R., & Jouret, F. (2020). Observer variability in the assessment of renal 18F-FDG uptake in kidney transplant recipients. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61032-z>
- Jeong, H. J. (2020). Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. *Kidney Research and Clinical Practice*, 39(1), 17. <https://doi.org/10.23876/J.KRCP.20.003>
- Jung, J. S., Jee, M. K., Cho, H. T., Choi, J. I., Im, Y. Bin, Kwon, O. H., & Kang, S. K. (2013). MBD6 is a direct target of Oct4 and controls the stemness and differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(4), 711–728. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1157-4/METRICS>
- Kilikevicius, A., Meister, G., & Corey, D. R. (2022). Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 50, Issue 2, pp. 617–634). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1256>
- Kramer, A., Pippias, M., Noordzij, M., Stel, V. S., Afentakis, N., Ambühl, P. M., Andrusev, A. M., Fuster, E. A., Arribas Monzón, F. E., Asberg, A., Barbullushi, M., Bonthuis, M., Caskey, F. J., De la Nuez, P. C., Cernevskis, H., Des Grottes, J. M., Garneata, L., Golan, E., Hemmeler, M. H., ... Jager, K. J. (2018). The European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: A summary. *Clinical Kidney Journal*, 11(1), 108–122. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx149>
- Lai, X., Zheng, X., Mathew, J. M., Gallon, L., Leventhal, J. R., & Zhang, Z. J. (2021). Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.661643>

- Lamb, E. J., Levey, A. S., & Stevens, P. E. (2013). The kidney disease improving global outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: Evolution not revolution. In *Clinical Chemistry* (Vol. 59, Issue 3, pp. 462–465). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184259>
- Loupy, A., Mengel, M., & Haas, M. (2022). Thirty years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: the past, present, and future of kidney transplant diagnostics. In *Kidney International* (Vol. 101, Issue 4, pp. 678–691). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.11.028>
- Luan, J., Fu, J., Chen, C., Jiao, C., Kong, W., Zhang, Y., Chang, Q., Wang, Y., Li, D., Illei, G. G., Kopp, J. B., Pi, J., & Zhou, H. (2019). LNA-anti-miR-150 ameliorated kidney injury of lupus nephritis by inhibiting renal fibrosis and macrophage infiltration. *Arthritis Research and Therapy*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13075-019-2044-2/FIGURES/8>
- Luan, J., Fu, J., Wang, D., Jiao, C., Cui, X., Chen, C., Liu, D., Zhang, Y., Wang, Y., Yuen, P. S. T., Kopp, J. B., Pi, J., & Zhou, H. (2020). miR-150-Based RNA Interference Attenuates Tubulointerstitial Fibrosis through the SOCS1/JAK/STAT Pathway In Vivo and In Vitro. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 22, 871–884. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.10.008>
- Lv, J. C., & Zhang, L. X. (2019). Prevalence and Disease Burden of Chronic Kidney Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1165, 3–15. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_1/COVER
- Mukhadi, S., Hull, R., Mbita, Z., & Dlamini, Z. (2015). The role of MicroRNAs in kidney disease. In *Non-coding RNA* (Vol. 1, Issue 3, pp. 192–221). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ncrna1030192>
- Pawluczyk, I. Z. A., Didangelos, A., Barbour, S. J., Er, L., Becker, J. U., Martin, R., Taylor, S., Bhachu, J. S., Lyons, E. G., Jenkins, R. H., Fraser, D., Molyneux, K., Perales-Patón, J., Saez-Rodriguez, J., & Barratt, J. (2021). Differential expression of microRNA miR-150-5p in IgA nephropathy as a potential mediator and marker of disease progression. *Kidney International*, 99(5), 1127–1139. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.12.028>

- Peters L J F, Floege J, Biessen E A L, Jankowski J, van der Vorst E P C. MicroRNAs in Chronic Kidney Disease: Four Candidates for Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(18):6547. <https://doi.org/10.3390/ijms21186547>
- Pozniak, T., Shcharbin, D., & Bryszewska, M. (2022). Circulating microRNAs in Medicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073996>
- Rajput, C., Tauseef, M., Farazuddin, M., Yazbeck, P., Amin, M. R., Avin Br, V., Sharma, T., & Mehta, D. (2016). MicroRNA-150 Suppression of Angiopoetin-2 Generation and Signaling Is Crucial for Resolving Vascular Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(2), 380–388. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306997>
- Roat, R., Hossain, M. M., Christopherson, J., Free, C., Guay, C., Regazzi, R., & Guo, Z. (2019). Circulating miRNA-150-5p is associated with immune-mediated early β -cell loss in a humanized mouse model. *Xenotransplantation*, 26(2), e12474. <https://doi.org/10.1111/XEN.12474>
- Rysz, J., Gluba-Brzózka, A., Franczyk, B., Jablonowski, Z., & Cialkowska-Rysz, A. (2017). Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS18081702>
- Sellarés, J., De Freitas, D. G., Mengel, M., Reeve, J., Einecke, G., Sis, B., Hidalgo, L. G., Famulski, K., Matas, A., & Halloran, P. F. (2012). Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *American Journal of Transplantation*, 12(2), 388–399. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x>
- Soltaninejad, E., Nicknam, M. H., Nafar, M., Ahmadpoor, P., Pourrezaghali, F., Sharbafi, M. H., Hosseinzadeh, M., Ferooghi, F., Yekaninejad, M. S., Bahrami, T., Sharif-Paghaleh, E., & Amirzargar, A. (2015). Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute T-cell mediated rejection. *Transplant Immunology*, 33(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.TRIM.2015.05.002>

- Tonelli, M., Muntner, P., Lloyd, A., Manns, B. J., James, M. T., Klarenbach, S., Quinn, R. R., Wiebe, N., & Hemmelgarn, B. R. (2011). Using proteinuria and estimated glomerular filtration rate to classify risk in patients with chronic kidney disease: A cohort study. *Annals of Internal Medicine*, *154*(1), 12–21. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-1-201101040-00003>
- Valdez-Ortiz, R., Navarro-Reynoso, F., Olvera-Soto, M. G., Martín-Alemañy, G., Rodríguez-Matías, A., Hernández-Arciniega, C. R., Cortes-Pérez, M., Chávez-López, E., García-Villalobos, G., Hinojosa-Heredia, H., Camacho-Aguirre, A. Y., Valdez-Ortiz, Á., Cantú-Quintanilla, G., Gómez-Guerrero, I., Reding, A., Pérez-Navarro, M., Obrador, G., & Correa-Rotter, R. (2018). Mortality in Patients With Chronic Renal Disease Without Health Insurance in Mexico: Opportunities for a National Renal Health Policy. *Kidney International Reports*, *3*(5), 1171. <https://doi.org/10.1016/J.EKIR.2018.06.004>
- Van Der Velde, M., Matsushita, K., Coresh, J., Astor, B. C., Woodward, M., Levey, A., De Jong, P., Gansevoort, R. T., El-Nahas, M., Eckardt, K. U., Kasiske, B. L., Ninomiya, T., Chalmers, J., MacMahon, S., Tonelli, M., Hemmelgarn, B., Sacks, F., Curhan, G., Collins, A. J., ... Manley, T. (2011). Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney International*, *79*(12), 1341–1352. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.536>
- Wojciechowska, A., Braniewska, A., & Kozar-Kamińska, K. (2017). MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *26*(5), 865–874. <https://doi.org/10.17219/ACEM/62915>
- Wroniecka, K. I., Park, A. S. D., Mohtat, D., Thomas, D. B., Pullman, J. M., & Susztak, K. (2011). Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes*, *60*(9), 2354–2369. <https://doi.org/10.2337/db10-1181>

- Yu, J., Yu, C., Feng, B., Zhan, X., Luo, N., Yu, X., & Zhou, Q. (2019). Intrarenal microRNA signature related to the fibrosis process in chronic kidney disease: Identification and functional validation of key miRNAs. *BMC Nephrology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1512-x>
- Ko SY, Tsai SF, Hsu CT, Huang ST, Chuang YW, Yu TM, Wu MJ, Chen CH. Gender Differences in microRNA Expressions as Related to Long-Term Graft Function in Kidney Transplant Patients. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 24;23(21):12832. doi: 10.3390/ijms232112832. PMID: 36361623; PMCID: PMC9656388.
- Zununi Vahed S, Poursadegh Zonouzi A, Mahmoodpoor F, Samadi N, Ardalan M, Omidi Y. Circulating miR-150, miR-192, miR-200b, and miR-423-3p as Non-invasive Biomarkers of Chronic Allograft Dysfunction. *Arch Med Res*. 2017 Jan;48(1):96-104. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.03.004. PMID: 28577875.

ANEXOS: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Renacimiento de la Excelencia
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"
SERVICIO DE NEFROLOGÍA
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo 23-1356

Aprobado

Unánimemente

Mayoría

Fecha 23-Feb-2023

TÍTULO DEL ESTUDIO: "miRNAs como biomarcadores de rechazo agudo mediado por anticuerpos en pacientes con trasplante renal. .".

1.- Propósito del estudio: El presente documento tiene como objetivo invitarle a participar en un estudio de investigación dirigido por el Dr. Cesar Flores Gama, médico adscrito del departamento de nefrología del Instituto Nacional de Cardiología, el cual incluye a la población de pacientes con trasplante renal adscritos del mismo hospital. El estudio tiene como propósito conocer si ciertos marcadores en la sangre y orina pueden ayudar a establecer el diagnóstico de rechazo del injerto renal. La información obtenida en su expediente clínico nos permite considerarle como un buen candidato para participar en este estudio.

Le recordamos que su participación en este estudio es totalmente voluntaria y que no condiciona de ninguna manera el tratamiento que recibe actualmente ni a futuro. Así mismo, si en cualquier momento de la investigación decide retirar su consentimiento, puede hacerlo libremente.

El riesgo de participar en este protocolo es mínimo: únicamente es necesario extraer datos de su expediente clínico y electrónico y una toma de muestra sanguínea

2.- Procedimientos

Si acepta colaborar en este estudio, se realizarán los siguientes pasos.

Recolección de datos: Se tomarán datos de laboratorios y procedimientos previos de su expediente clínico.

Muestra de sangre: Posteriormente se obtendrá una muestra de aproximadamente 10mL de sangre para su análisis dentro del laboratorio de este hospital. Se determinará la concentración de algunos elementos de la sangre que se alteran en los pacientes con trasplante renal. Para obtener esta muestra es necesario que se presente con un periodo de ayuno de al menos 8 horas. Dicha muestra será centrifugada, obteniendo el suero y plasma, con la finalidad de almacenarlo en tubos eppendorf a menos 80°C y posteriormente realizar el análisis de expresión genético.

Análisis de datos: Una vez reunida la información, se procesarán los datos obtenidos en programas estadísticos para establecer la relación que existe entre ellos.

3.- Posibles riesgos y molestias: Al momento de realizar la flebotomía, es decir, la punción en la vena para obtener la muestra de sangre, la mayoría siente un ligero dolor o picadura al momento de introducir la aguja. También se puede experimentar algo de sensación pulsátil en el sitio después de extraer la sangre. Es realmente inusual que se presenten eventos adversos o daño tras una toma de muestra, sin embargo, algunos de los riesgos son: hematomas (moretones), hemorragia (sangrado) leve, desmayo o lipotimia e infección del sitio puncionado.

4.- Posibles beneficios que recibirá al participar: El análisis de los resultados permitirá establecer si la expresión de estas moléculas es diferente en los pacientes con trasplante renal puede ayudar a establecer el diagnóstico de rechazo del injerto renal, con el beneficio resultante para otros pacientes en el futuro y el avance en el conocimiento médico.

5.- Participación o retiro: Se reitera que su participación es completamente voluntaria y no condiciona de ninguna forma la atención que recibe ni la calidad de la atención que recibe en el Instituto Nacional de Cardiología. Si decide participar deberá firmar el consentimiento informado de forma correspondiente. Si en algún momento durante el estudio decide dejar de participar lo puede hacer con total libertad, sin que esto afecte la atención que recibe ni la calidad.

6.- Privacidad y confidencialidad: La información que se recupere de su expediente y se recabe en las consultas será tratada confidencialmente, al igual que los resultados del análisis de sus pruebas. En caso de publicar los resultados de este estudio (en conferencias o en revistas de índole médico), no se usará información que revele su identidad. Esta se mantendrá oculta en todo momento. Al ingresar al estudio se le asignará un número de participante que será utilizado en nuestra base de datos para identificarle y así resguardar su identidad.

7.- Personal de contacto para dudas, aclaraciones o comentarios sobre el estudio: Si tiene preguntas o comentarios sobre el estudio, puede comunicarse, de 9:00 a 14:00h de lunes a



viernes, con el Dr. Iván Zepeda Quiroz o el Dr. Cesar Flores Gama, investigadores responsables de este proyecto, al teléfono 56-27-69-00 ext. 24410 o directamente en el servicio de Nefrología de este hospital.

Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, a los Tel. 56276900 ext. 24410, de 9:00 a 16:00h.

Dr. Patricio Heriberto Ortiz Fernández
Presidente del comité de ética en investigación

Declaración de consentimiento informado:

El personal que participa en el desarrollo de este estudio me ha explicado con claridad en que consiste este. He tenido oportunidad de manifestar mis dudas y han sido resueltas de forma satisfactoria. He leído o alguien me ha leído el contenido de este documento. Se me ha dado una copia de este formato. Al firmar este documento, estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe y que los datos obtenidos se han usados en futuras investigaciones.

Nombre del Participante _____ Teléfono _____ #de participante _____

Firma del Participante _____ Fecha _____

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado _____ Teléfono _____

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado _____ Fecha _____

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre y firma del testigo 1 _____ Fecha _____ Teléfono _____

Nombre y firma del testigo 2 _____ Fecha _____ Teléfono _____

APROBADO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

Protocolo 23-1356

Unanimidad Aprobado

Mayoría

Fecha 23-feb-2023

ANEXO 2: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agos	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X			
Elaboración del protocolo	X	X									
Obtención de la información			X	X	X						
Procesamiento y análisis de los datos					X	X					
Elaboración del informe técnico final						X	X				
Divulgación de los resultados											X

Realizado 

Pendiente 