



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN  
CIENCIAS MÉDICAS

**“MEDICIÓN DE SICAM, SVCAM Y COMPLEJO SOLUBLE C5BC9 EN  
PACIENTES CON RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS”**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

**RICARDO IVÁN VELÁZQUEZ SILVA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO**  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., MAYO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



Universidad Nacional Autónoma de México  
División de estudios de Postgrado. Facultad de Medicina  
Tesis para obtener el grado académico de Maestría en Ciencias Médicas



## RESUMEN

**INTRODUCCION:** En receptores de trasplante renal (RTR) la principal causa de pérdida del injerto es el rechazo agudo (RA), y de estos el principal es el rechazo mediado por anticuerpos (RMA), que oscila alrededor de un 30-50%. La biopsia renal (BR) es el estándar de oro para su diagnóstico; sin embargo, es un procedimiento invasivo y tardío. Biomarcadores urinarios como las moléculas de adhesión celular (sICAM, sVCAM) y complejo sC5b-C9 podrían ser adecuadas herramientas diagnósticas en pacientes con rechazo agudo.

El objetivo principal de este estudio es determinar la presencia de estos biomarcadores en orina en RTR y evaluar su rendimiento como prueba diagnóstica de RA y RMA.

**HIPÓTESIS:** Los niveles de moléculas de adhesión celular (sVCAM, sICAM) y complejo sC5b-C9 en orina se encuentran más elevados en receptores de trasplante renal con RA y RMA documentado por medio de BR comparado con receptores de trasplante renal sin diagnóstico de RA y RMA.

**OBJETIVOS. FASE 1. Prueba de Concepto:** Identificar si hay diferencias entre el grupo con y sin rechazo agudo de diferentes biomarcadores como son moléculas de adhesión (sVCAM, sICAM) y el complejo sC5bC9. **FASE 2. Estudio de prueba diagnóstica.** Evaluar el rendimiento diagnóstico de los niveles de las moléculas de adhesión (sVCAM, sICAM) y el complejo sC5bC9 en pacientes con rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos.

**METODOLOGÍA:** Tipo de investigación: observacional y transversal, de 2 fases, la primera de prueba de concepto y la segunda de prueba diagnóstica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de junio a diciembre del 2019.

**RESULTADOS:** Se analizaron 122 de 145 pacientes con BR, la prevalencia de rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos fue de 40.1% y 29.5%, respectivamente. Los niveles urinarios de sICAM y sVCAM fueron mayores en el grupo de rechazo agudo y de rechazo mediado por anticuerpos comparados con el grupo de pacientes sin rechazo en la biopsia (ambos con  $p < 0.001$ ). Para el



diagnóstico de rechazo agudo y utilizando puntos de corte de 1419  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para sICAM y 2.97  $\text{ng}/\text{mg}$  para sVCAM, el área bajo la curva (AUC) fue de 0.67 y 0.73, con sensibilidad de 69.4% y 77.5%, especificidad de 58.2% y 60.2%, valor predictivo positivo (VPP) de 47.2% y 50.7% y valor predictivo negativo (VPN) de 77.9% y 83.6%, respectivamente. Para el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos y utilizando puntos de corte de 1599  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para sICAM y 3.66  $\text{ng}/\text{mg}$  para sVCAM, el AUC fue de 0.70 y sensibilidad de 72.2% para ambas moléculas, especificidad de 60.6% y 59.4%, VPP 38.8 y 37.1%, VPN 86.3% y 86.1%, respectivamente. No se encontró adecuado rendimiento diagnóstico con la molécula sC5bC9 en ningún grupo.

**CONCLUSIÓN:** Los niveles urinarios de sICAM y sVCAM se encuentran mas elevados en pacientes con rechazo del injerto (incluyendo rechazo mediado por anticuerpos); sin embargo, ambas moléculas tienen un rendimiento diagnóstico de bajo a moderado. En el presente estudio no se encontró utilidad de molécula sC5bC9 en orina para diagnóstico de rechazo en los pacientes con trasplante renal.



Universidad Nacional Autónoma de México  
División de estudios de Postgrado. Facultad de Medicina  
Tesis para obtener el Título de Maestría en Ciencias Médicas

## **DEDICATORIAS**

A mi familia, en particular a mi madre Blanca por todo su amor incondicional.  
A mi padre Ricardo por ser mi modelo siempre a seguir,  
A mis hermanas, Lisset y Estefanía,  
Y en especial a mi “viejilla” Norma, el amor de mi vida,  
que con su apoyo incondicional y decidido fueron bases para mi realización en la  
profesión médica.



Universidad Nacional Autónoma de México  
División de estudios de Postgrado. Facultad de Medicina  
Tesis para obtener el Título de Maestría en Ciencias Médicas

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor de tesis, al Dr. Luis Eduardo Morales Buenrostro por su apoyo, conocimientos y paciencia para la realización de este trabajo de investigación; a la Dra. Lluvia Marino por su gran ayuda en la logística para realizar se este trabajo; a la Dra. Norma A. Bobadilla por sus invaluable asesorías en los coloquios para enriquecer el desarrollo de este proyecto y al Q.F.B. Cristino Cruz Rivera por su apoyo en laboratorio para realización de todos los ensayos ELISA.



## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- ADES:** Anticuerpos donador específico
- AL:** Alteraciones limítrofes
- BRP:** Biopsia renal percutánea
- ERC:** Enfermedad renal crónica
- GNM:** Glomerulonefritis
- INCMNSZ:** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
- IQR:** Rango intercuartílico
- IC:** Intervalo de confianza
- LES:** Lupus eritematoso sistémico
- NDM:** Nefropatía diabética
- NLES:** Nefritis lúpica
- RTR:** Receptor de trasplante renal
- RA:** Rechazo activo
- RMA:** Rechazo mediado por anticuerpos
- RMCT:** Rechazo mediado por células T
- RCMA:** Rechazo crónico mediado por anticuerpos
- RM:** Rechazo mixto
- ROC:** Característica Operativa del Receptor
- RT:** Rechazo total
- RVP:** Razón de verosimilitud positiva
- RVN:** Razón de verosimilitud negativa
- PRA:** Panel reactivo de anticuerpos
- sVCAM:** Soluble vascular cell adhesion molecule 1
- sICAM:** Soluble intracellular adhesion molecule 1
- TR:** Trasplante renal





## ÍNDICE

RESUMEN.....	II
DEDICATORIAS.....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VI
ANTECEDENTES .....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
METODOLOGÍA .....	20
ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS .....	24
ÉTICA.....	25
RESULTADOS .....	26
DISCUSIÓN.....	49
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN .....	56
CONCLUSIONES.....	57
ANEXO .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59



## **ANTECEDENTES**

### **EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y SU IMPACTO**

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial. Los pacientes que se encuentran en estadio KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) 5 han aumentado de manera dramática de 10,000 pacientes en 1973 a 703,243 pacientes para el 2015, esto solo en los Estados Unidos. Por lo que los gastos en salud destinados para la ERC son enormes e insuficientes, sobre todo en los estadios mas avanzados de la enfermedad donde se necesitan terapias de soporte de la función. Además, los pacientes con enfermedad renal son de los pacientes con las mayores tasas de mortalidad (1,2). El panorama en México es muy desalentador, es uno de los países con mayor tasa de incidencia de ERC en el mundo, y solo se encuentra por detrás de Taiwán y los Estados Unidos (3–5). Actualmente la incidencia de ERC reportada en México es de 340 casos por millón de habitantes y la prevalencia es de 337 casos por millón de habitantes (6).

Entre las terapias para el soporte la función renal en enfermedad crónica avanzada se encuentran la hemodiálisis (HD), la diálisis peritoneal (DP) y el trasplante de riñón (TR). México es uno de los países con mayor cantidad de pacientes en terapia de soporte en el mundo, estimándose entre 1000-1999 pacientes por millón de habitantes (4). En 2010 Méndez-Duran y cols reportaron un estimado total de 52,000 pacientes que se encontraban con alguna modalidad de terapia de soporte renal en el país (7).

El trasplante renal (TR) es por mucho la mejor terapia de soporte de la función renal para los enfermos renales crónicos. Comparado con hemodiálisis y diálisis peritoneal el TR tiene los mejores resultados en sobrevida y calidad de vida del paciente (8). Un estudio reciente en el Hospital General de la Ciudad de México por el grupo de Valdez y colaboradores demostró que los pacientes con ERC sin seguridad social, en las diferentes modalidades de reemplazo renal (HD, DP), tienen una sobrevida mucho menor comparado con los



pacientes que tuvieron la oportunidad de trasplante renal, 61.9 y 72.5% vs 100%, en un seguimiento a 3 años (9).

En los Estados Unidos, los pacientes que recibieron injertos entre 2005 y 2009 tuvieron una incidencia de rechazo agudo, en los cinco años posteriores al trasplante, de aproximadamente del 17% para los riñones de donantes vivos y el 20% para los riñones de donantes fallecidos. En comparación, en la década de los 1980 donde se presentaba al menos un episodio de rechazo agudo en el 50 a 60% de los receptores de injertos renales. La incidencia de rechazo agudo durante el primer año después del trasplante disminuyó del 10% en 2009 a 2010 al 8% en 2013 a 2014, según lo informado por Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) (10).

Los factores de riesgo asociados para el desarrollo del rechazo agudo incluyen los siguientes (11):

1. Sensibilización previa (es decir, la presencia de anticuerpos donador específico [ADES] o un panel reactivo de anticuerpos alto [PRA])
2. Disparidad de antígeno leucocitario humano (HLA)
3. Receptor pediátrico
4. Etnia afroamericana
5. Incompatibilidad de grupo sanguíneo
6. Tiempo prolongado de isquemia fría
7. Función retardada del injerto (DGF)

La falla tardía de los trasplantes de riñón se ha convertido en un problema clínico importante (12,13). En los Estados Unidos, 5469 trasplantados de riñón desarrollaron enfermedad renal crónica en etapa terminal en 2008 (datos proporcionados por Jon Snyder de USRDS), lo que la convirtió en la cuarta causa de enfermedad renal crónica en etapa terminal (14).

## **RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS**

El rechazo mediado por anticuerpos (RMA) es la principal causa de pérdida de la función del injerto posterior al trasplante de riñón, representa hasta el 50% de las pérdidas, y es la principal causa de disfunción del injerto posterior a un



año del trasplante (14–17). A pesar del gran avance en el tratamiento para RMA no se ha logrado disminuir la tasa de pérdida de injertos por esta causa (18). El impacto perjudicial sobre la vida media del injerto de todas las formas de RMA puede ser profundo (19). Orandi y colaboradores encontraron un riesgo mayor de pérdida del injerto en pacientes con RMA (HR=4.73, IC 95% 1.57-14.26;  $p=0.006$ ). En el caso de trasplantes de donante fallecidos en los que hay un nivel bajo de ADES, encontraron un efecto de RMA algo atenuado en la pérdida del injerto (HR=2.39; IC del 95%, 1.10-5.19;  $p=0.028$ ), mientras que en los trasplantes de donante vivo incompatibles con HLA, el impacto de RMA fue aún más fuerte (HR=6.29; IC del 95%, 3.81-10.39;  $p<0.001$ ), probablemente debido a una mayor fuerza del anticuerpo preformado (20).

### **FISIOPATOLOGÍA DEL RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS**

Los mecanismos fisiopatogénicos del RMA aún sigue en investigación activa. Sin embargo, la evidencia sugiere que la activación de las células B y las células plasmáticas da como resultado la generación de anticuerpos donador específico (ADES), que se unen al antígeno leucocitario humano (HLA) o moléculas no HLA expresadas en células endoteliales dentro del aloinjerto renal (21,22). En el rechazo activo (agudo) mediado por anticuerpos (RAMA), los anticuerpos se unen al endotelio de injerto y activan los mecanismos dependientes e independientes del complemento que reclutan células asesinas naturales (NK), neutrófilos polimorfonucleares, plaquetas y macrófagos, que contribuyen a la capilaritis peritubular, glomerulitis, necrosis celular, microangiopatía trombótica, que llevan a disminución relativamente rápida en la función del aloinjerto (23).

### **Migración de leucocitos en el rechazo agudo**

La adhesión de los leucocitos circulantes a las células endoteliales vasculares durante el evento de rechazo agudo está mediada por dos clases de moléculas, denominadas selectinas e integrinas, y sus ligandos. La expresión de estas moléculas varía entre los diferentes tipos de leucocitos y en los vasos sanguíneos en diferentes lugares (24,25).



Las selectinas son moléculas de adhesión que se unen a los carbohidratos de la membrana plasmática que median en una etapa inicial la adhesión de baja afinidad de los leucocitos circulantes a las células endoteliales que recubren las vénulas postcapilares. Las selectinas y sus ligandos se expresan en leucocitos y células endoteliales. Las células endoteliales expresan tres tipos de selectinas, denominadas P-selectina (CD62P), E-selectina (CD62E) y una tercera llamada L-selectina (CD62L) (26,27).

Las integrinas son proteínas de la superficie celular que median la adhesión de las células a otras células o a la matriz extracelular, a través de interacciones de unión específicas con diversos ligandos. Hay más de 30 integrinas diferentes, todas las cuales son heterodímeros que contienen uno de más de 15 tipos de cadenas  $\alpha$  y uno de los siete tipos de cadenas  $\beta$ . Las cabezas globulares extracelulares de ambas cadenas contribuyen a la unión del ligando. Las dos integrinas importantes que se expresan en leucocitos son el antígeno asociado 1 (LFA-1), más precisamente llamado  $\alpha$ L $\beta$ 2 o CD11aCD18, y antígeno muy tardío 4 (VLA-4) o  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 o CD49dCD29.

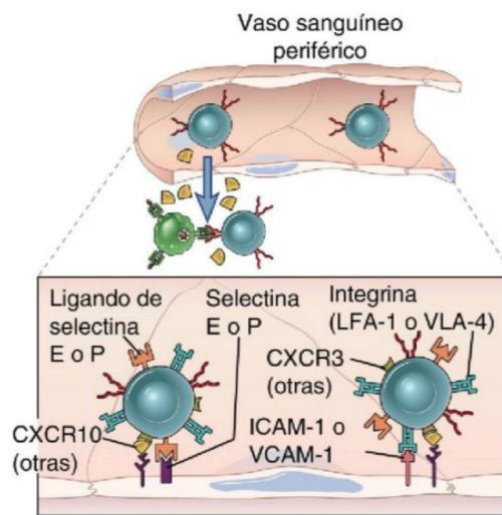
LFA-1 tiene como ligando a la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, CD54), una glicoproteína de membrana expresada en células endoteliales activadas por citoquinas y en una variedad de otros tipos de células, incluidos linfocitos, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos y la mayoría de las células epiteliales. La porción extracelular de ICAM-1 está compuesta de dominios globulares, llamados dominios de inmunoglobulina (Ig), que comparten homología de secuencia y características estructurales con dominios encontrados en moléculas de Ig. La unión de LFA-1 a ICAM-1 es importante para las interacciones leucocito-endotelio y para las interacciones de células T con células presentadoras de antígeno. Otros dos ligandos de la superfamilia de inmunoglobulina para LFA-1 son ICAM-2, que se expresa en las células endoteliales, e ICAM-3, que se expresa en los linfocitos.

VLA-4 se une a su ligando que es la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, CD106), una proteína de la superfamilia de inmunoglobulina expresada en células endoteliales activadas por citocinas en algunos tejidos.

Otro tipo de integrina es Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2, CD11bCD18), se expresa en monocitos circulantes y se une a ICAM-1 y media la adhesión al endotelio. Mac-1 también



funciona como un receptor de complemento, partículas de unión opsonizadas con un producto de activación de complemento llamado fragmento C3b inactivado (iC3b). Las integrinas aumentan rápidamente su afinidad por sus ligandos en respuesta a señales intracelulares, que se inducen en todos los leucocitos por la unión de quimioquinas a los receptores de quimiocinas y en las células T por la unión de antígenos a receptores de antígenos (28,29). Ver **figura 1**.



**Figura 1.** Tipos de integrinas (LFA-1 y VLA-4) en leucocitos y sus ligandos en el endotelio (sICAM y sVCAM). Adaptado de Abbas AK. *Inmunología celular y molecular*. 8va edición. Barcelona: Elsevier;2015.

Las quimiocinas también inducen la agrupación de integrinas en las superficies de leucocitos. Esto da como resultado una mayor concentración local de integrinas en los sitios de interacción con las células endoteliales, donde se muestran las quimiocinas, lo que lleva a un aumento de la fuerza general (o avidéz) de la unión de leucocitos mediada por integrinas al endotelio.

Las quimiocinas son una gran familia de citoquinas estructuralmente homólogas que estimulan el movimiento de los leucocitos y regulan la migración de los leucocitos de la sangre a los tejidos. Los receptores de quimiocinas pertenecen a la superfamilia del receptor acoplado a la proteína (G) ligadora de trifosfato de guanósina (GTP) de siete dominios transmembrana (GPCR). Diferentes combinaciones de receptores de quimioquinas se expresan en diferentes tipos de leucocitos, que median distintos patrones de migración de los leucocitos (30). En las reacciones inflamatorias, las quimiocinas sirven



para reclutar leucocitos circulantes de los vasos sanguíneos hacia sitios extravasculares, donde sus dos principales acciones son dos (27,30–37):

A) Aumento de la adherencia de los leucocitos al endotelio y B) migración de leucocitos a través de los vasos sanguíneos y hacia el sitio de daño tisular.

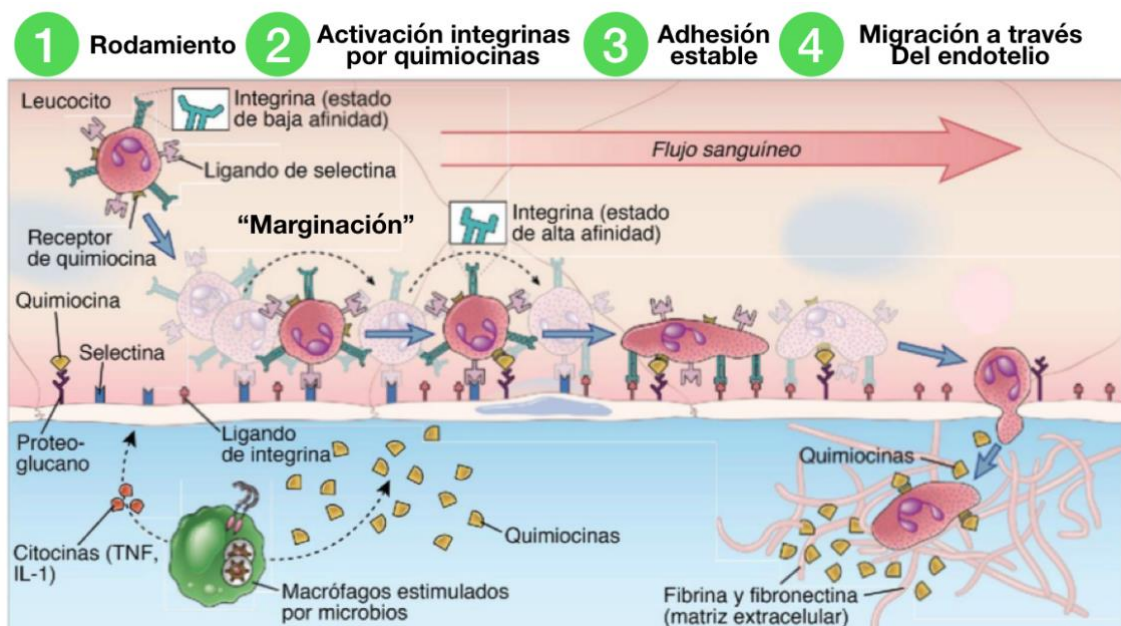
El reclutamiento de leucocitos de la sangre a los tejidos requiere la adhesión de los leucocitos al revestimiento endotelial de las vénulas postcapilares y luego el movimiento a través del endotelio y la pared vascular hacia el tejido extravascular. Este es un proceso de varios pasos en el que cada paso está orquestado por diferentes tipos de moléculas de adhesión y quimiocinas, donde los pasos son:

- 1) Primero hay rodamiento mediado por selectina de los leucocitos en el endotelio, las células dendríticas que son activadas en el rechazo agudo, comienzan a secretar citocinas, entre ellas TNF e IL-1. Estas citocinas estimulan las células endoteliales que recubren las vénulas postcapilares para expresar E-selectina. Las células endoteliales también expresan P-selectina en respuesta a la trombina producida durante la coagulación sanguínea, que ocurre comúnmente en las reacciones inflamatorias. Los vasos sanguíneos se dilatan y el flujo sanguíneo disminuye, como resultado, los leucocitos, que son más grandes que los glóbulos rojos, tienden a alejarse del flujo axial central y acercarse al revestimiento del vaso, un proceso conocido como marginación. Esto permite que los ligandos de las selectinas E y P expresadas en la superficie de los leucocitos se unan a las selectinas que se han inducido en las células endoteliales.
- 2) Aumento de la afinidad de las integrinas mediado por quimiocinas. Las quimioquinas expuestas en las células endoteliales de las vénulas postcapilares en el sitio de daño se unen a sus receptores en los leucocitos rodantes.
- 3) Detención estable de los leucocitos mediada por integrinas en endotelio. En paralelo con la activación de las integrinas, la expresión de sus ligandos en las células endoteliales está regulada al alza por citoquinas inflamatorias. Estos ligandos incluyen VCAM-1, que se une a la integrina VLA-4, e ICAM-1, que se une a las integrinas LFA-1 y Mac-1. Por lo tanto, los leucocitos se



unen firmemente al endotelio, su citoesqueleto se reorganiza y se diseminan en la superficie endotelial.

- 4) Transmigración de leucocitos a través del endotelio. Los leucocitos generalmente transmigran entre los bordes de las células endoteliales, un proceso llamado transmigración paracelular o diapédesis, para alcanzar tejidos extravasculares. La transmigración paracelular depende de las interacciones de las integrinas en los leucocitos y sus ligandos en las células endoteliales, así como en la contribución de otras proteínas, en particular CD31, que se expresa en leucocitos y células endoteliales. Este proceso requiere una interrupción transitoria y reversible de las proteínas de la unión adherentes, principalmente el complejo VE-caderina, que mantiene unidas las células endoteliales. El mecanismo responsable de la interrupción del complejo VE-caderina implica la activación de cinasas cuando las integrinas de leucocitos se unen a ICAM-1 o VCAM-1. Las quinasas fosforilan la cola citoplásmica de la VE-caderina, lo que conduce a una alteración reversible del complejo adherente. Con menos frecuencia, se ha observado que los leucocitos se mueven a través de las células endoteliales en lugar de entre ellas, por un proceso poco conocido llamado migración transcelular. El proceso completo se ilustra en la **figura 2**.



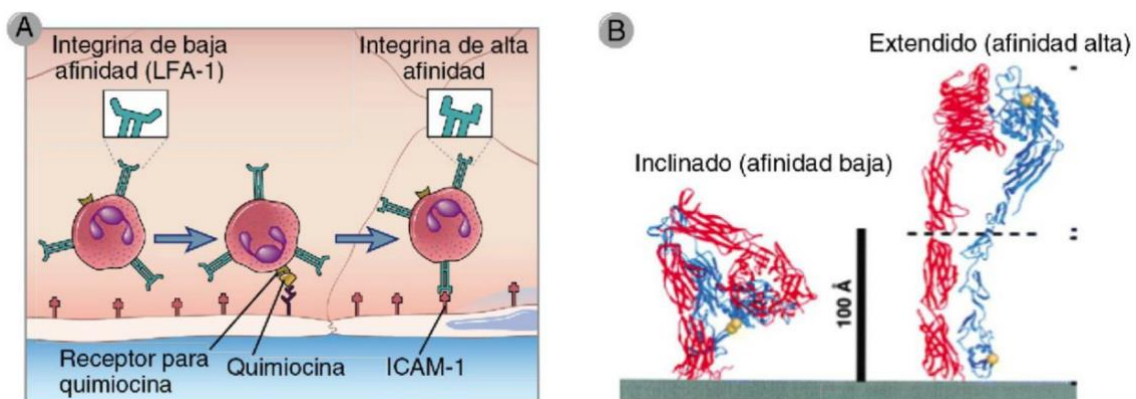
**Figura 2.** Proceso de migración celular a través de las moléculas de adhesión celular sICAM y sVCAM y sus ligandos integrinas en endotelio vascular. Adaptado de Abbas AK. *Inmunología celular y molecular*. 8va edición. Barcelona: Elsevier;2015.





El movimiento de las células T efectoras hacia vasos del injerto se produce por la activación inducida por antígeno, las células T vírgenes salen de los ganglios linfáticos y regresan a los vasos sanguíneos renales. Las células T también dejan de expresar L-selectina y comienzan a expresar ligandos para E-y P-selectinas. Las células T efectoras circulantes se alojan en la microcirculación del injerto, debido a los cambios en la molécula de adhesión y la expresión del receptor de quimiocinas. El proceso de fusión de linfocitos efectoras en la microcirculación del injerto se produce en las vénulas post-capilares y está mediado por el mismo proceso dependiente de la selectina, la integrina y la quimiocina de varias etapas descrito para otros leucocitos. Al igual que con los neutrófilos y los monocitos, las células T efectoras en la circulación, pero no las células T vírgenes, expresan ligandos de selectina, integrinas y receptores de quimiocinas que se unen a los tipos de selectinas, ligandos de integrina y quimiocinas, respectivamente, que se expresan en endotelio activado (38).

El RAMA es un estímulo potente para la migración celular en la vasculatura renal. En el rechazo agudo se ha demostrado un aumento de la expresión de las moléculas integrinas sICAM y sVCAM a nivel tubular y de la vasculatura renal, ver **figura 3**.



**Figura 3.** Aumento de la expresión y afinidad celular de sICAM, sVCAM y sus ligandos LFA-1 y VLA-4. A) Las integrinas de los leucocitos están normalmente en un estado de baja afinidad. Si un leucocito se acerca a las células endoteliales, ruedan apoyándose en las selectinas, esto produce señales de activación de quimiocinas, que activan a las integrinas del leucocito y aumentan su afinidad por sus ligandos en las células endoteliales. B) Diagramas de cintas de las conformaciones inclinada y extendida de una integrina. Adaptado de Abbas AK. *Inmunología celular y molecular*. 8va edición. Barcelona: Elsevier;2015.

En estudios previos se han encontrado elevación en plasma y orina de las moléculas de adhesión celular en eventos de rechazo agudo (39–41).



## **El complemento en el rechazo agudo mediado por células**

Ha habido una creciente conciencia del importante papel del complemento en la fisiopatología del RAMA (42–46). El vínculo entre el complemento y el RAMA se confirmó cuando se demostró el producto dividido del complemento C4d en las biopsias de injertos (47). El principal mecanismo involucrado en la lesión renal mediada por anticuerpos es la activación de la vía clásica del complemento mediante la unión de DSA al HLA y la subsiguiente unión del complejo C1, lo que finalmente conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-C9) y se produce lesión directa en el injerto renal (48). El grado de activación del complemento por los complejos inmunes está influenciado por una variedad de factores locales y sistémicos, incluida la fuerza del anticuerpo (49,50), Isotipo del anticuerpo, densidad del epítipo y concentración local de proteínas reguladoras del complemento (51). Los DSA de inmunoglobulina G, IgG3 e IgG1 tienen una gran capacidad para unirse a C1q y activar la vía clásica, mientras que los DSA de IgG2 e IgG4 tienen propiedades de fijación de C1 más débiles (52).

Los antígenos blancos en el RAMA están localizados principalmente en el endotelio vascular, lo que resulta en hallazgos histológicos de lesión microvascular aguda (glomerulitis y capilaritis peritubular) y lesión vascular crónica (glomerulopatía del trasplante). El daño endotelial también conduce a la activación de las plaquetas y la formación de microtrombos (53). C4d, un producto de degradación de C4, se une al sitio de activación del complemento y permanece unido covalentemente y detectable por inmunohistoquímica durante varias semanas (48). Los subproductos de la activación del complemento (C3a y C5a) actúan como anafilatoxinas, lo que conduce a la quimiotaxis y la amplificación de la inflamación a través de respuestas inmunes innatas. La inflamación prolongada resulta en la proliferación celular, la duplicación de la membrana basal y la interposición mesangial que se manifiesta como la división de la membrana basal glomerular y la multilaminación de la membrana basal capilar peritubular (ptc) en microscopía de luz y electrónica, respectivamente (53).



## **Diagnostico de rechazo agudo mediado por anticuerpos**

El estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo es la biopsia de injerto renal, que se utiliza para evaluar con precisión la gravedad del rechazo, diferenciar entre rechazo mediado por células T(TCMR) y el RAMA, y determinar el grado de daño renal irreversible (fibrosis intersticial / atrofia tubular [IF/TA]). La biopsia del aloinjerto renal también puede revelar otras causas de inflamación y lesiones renales, como la enfermedad por citomegalovirus (CMV), nefropatía por BK (poliomavirus), nefritis intersticial, pielonefritis, enfermedad glomerular recurrente, neoplásica y enfermedad linfoproliferativa postrasplante (PTLD).

Se han realizado varios intentos para estandarizar los criterios histológicos para el rechazo agudo con el fin de permitir comparaciones de la eficacia de diferentes terapias y para ayudar a guiar el tratamiento (54). Los sistemas de clasificación que se han introducido incluyen el sistema de clasificación de Banff, publicado en 1993 (55), y los ensayos clínicos cooperativos en trasplantes (56); ambos se incorporaron a la clasificación de Banff de 1997 (57). La mayor gravedad histológica basada en la clasificación de Banff de 1997 se correlacionó con la falta de respuesta al tratamiento y la disminución de la supervivencia del aloinjerto (58). Las categorías de diagnóstico de Banff 97 se han revisado modestamente desde entonces (59–61). La conferencia Banff de 2011 sobre patología de aloinjertos reconoció la existencia de RAMA C4d negativo en los injertos renales, pero no llegó a agregar una categoría de diagnóstico de RAMA C4d negativo. Los criterios de diagnóstico para C4d negativo ABMR se incorporaron en la actualización de Banff 2013 (62).

El informe de Banff Kidney Meeting Report de 2017 modificó los criterios de diagnóstico para RAMA al afirmar que tanto la tinción C4d como los ensayos moleculares validados podrían servir como alternativas potenciales a los ADES en el diagnóstico de RAMA (63,64).

Puede ser difícil distinguir entre RMA agudo y RMCT agudo grave, y los dos procesos también pueden coexistir (rechazo mixto). Además, en hasta el 25% de los casos de disfunción de aloinjerto atribuidos, al menos en parte, a RAMA, los hallazgos histológicos sugieren solo RMCT o lesión tubular aguda (65).



Es importante identificar el RAMA, ya que a menudo es refractario a las modalidades de tratamiento dirigidas a la RMCT agudo y, a menos que se trate adecuadamente, puede resultar en la pérdida de aloinjerto renal.

El diagnóstico de RAMA requiere de 3 componentes:

1. Evidencia histológica de lesión tisular aguda
2. Evidencia de interacción de anticuerpos con el endotelio vascular (tinción C4d en capilares peritubulares [PTC])
3. Evidencia serológica de ADES circulantes.

Los pacientes con los dos primeros criterios, pero sin evidencia de DSA (evidencia de lesión tisular y tinción positiva con C4d sin un DSA detectable) se consideraron previamente "sospechosos" y por lo general se trataron como pacientes con RAMA. En la actualización de Banff de 2017 (63) la presencia de tinción C4d peritubular y/o la expresión de paneles de genes validados fuertemente asociados con RAMA puede sustituir a los DSA en el diagnóstico de RAMA. Algunos pacientes tienen evidencia morfológica de RAMA y un ADE positivo con poca o ninguna tinción C4d. El RAMA C4d negativo se ve a menudo en pacientes con ADE e inflamación persistente de la microcirculación (es decir, capilaritis y/o glomerulitis), lo que resulta en remodelación microvascular crónica (61). El momento, el tipo de trasplante y la técnica utilizada para detectar C4d pueden afectar la detección e interpretación de C4d o su ausencia. El RAMA C4d negativo también puede representar una lesión mediada por anticuerpos que no activa la cascada del complemento (citotoxicidad dependiente de anticuerpos, mediada por células).

### **Biomarcadores en rechazo agudo mediado por anticuerpos**

Se han propuesto biopsias de "protocolo", también llamadas biopsias de detección o de vigilancia en receptores de trasplante renal para identificar cambios patológicos tempranos que pueden ser evidentes antes de la disfunción del injerto. Sin embargo, varias limitaciones reducen la utilidad de las biopsias de detección en la práctica clínica:

- 1) Son invasivas y pueden ocurrir complicaciones
- 2) Errores de muestreo pueden poner en peligro su utilidad diagnóstica



- 3) Procedimientos costosos y laboriosos
- 4) Variabilidad inter-observador (Nefropatólogo)
- 5) Sin disponibilidad universal
- 6) Situaciones clínicas donde no es posible realizar biopsia
  - a. Diátesis hemorrágica
  - b. Paciente imposibilitado para cooperar (niños o pacientes críticamente enfermos con sedación)

Se han desarrollado biomarcadores innovadores no invasivos para monitorear la función del aloinjerto. Aunque se han encontrado que varios marcadores de este tipo proporcionan una buena utilidad diagnóstica y/o pronóstica, pocos, si los hay, se utilizan en la práctica clínica, y no hay pruebas suficientes de que su uso conduzca a mejoras significativas en el pronóstico del injerto (66).

Las limitaciones de los marcadores existentes de disfunción de aloinjerto renal resaltan la necesidad de métodos innovadores, robustos e, idealmente, no invasivos para predecir y diagnosticar la lesión aguda y crónica del injerto. El desarrollo de métodos "ómicos" (p. Ej., Genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica) en el campo del trasplante han allanado el camino para el desarrollo de varios biomarcadores candidatos (67–72).

Los biomarcadores se pueden clasificar en (73,74):

1. No invasivos
  - a. Monitoreo inmune basado en células funcionales
  - b. Biomarcadores moleculares en sangre
  - c. Biomarcadores en orina
  - d. Métodos de imagen
2. Invasivos
  - a. Microscopio molecular (microarreglos) (24).

Entre los marcadores mas sencillos, menos invasivos y menos costos se encuentran los urinarios, entre los que destacan los siguientes:

1. Basados en RNAs mensajero (75–77)
2. Los que utilizan microRNAs (78–80)
3. Medición de proteínas urinarias (81–83)



a. CXCL9 y CXCL10

4. Proteómica/peptidómica (84,85)

**Moléculas de adhesión celular sICAM, sVCAM y complejo soluble C5bC9 como potenciales Biomarcadores**

La medición de estas moléculas en la orina tiene potencial utilidad para el diagnóstico temprano de rechazo agudo mediado por anticuerpos. Como ya se comentó previamente, las moléculas de adhesión celular y el complemento, tienen un papel fundamental en la fisiopatología del rechazo agudo.

En un estudio de Betchel y colaboradores (86) midieron la excreción de estas moléculas por la orina en pacientes con rechazo agudo resistente a esteroide, rechazo agudo sensible a esteroide y rechazo crónico comparado contra controles, se determinaron las porciones solubles de ICAM y de VCAM, así como la C4d y C5bC9 por medio de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En los resultados se observó que comparado con los valores del grupo control ( $2.4 \pm 0.3$  ng/dL), hubo mayores niveles de excreción de sICAM en el grupo de rechazo agudo resistente a esteroide ( $7.1 \pm 0.72$  ng/dL,  $p=0.01$ ), en el grupo de rechazo sensible a esteroide ( $3.1 \pm 0.77$  ng/dL,  $p=0.05$ ), y en el grupo de rechazo crónico ( $5.18 \pm 0.59$  ng/dL,  $p=0.05$ ). Respecto a la excreción de sVCAM, comparado contra los niveles del grupo control ( $26.9 \pm 4.5$  ng/dL), se encontraron niveles más elevados en el grupo de rechazo agudo resistente a esteroide ( $302 \pm 39$  ng/dL,  $p < 0.01$ ), en el grupo de rechazo agudo sensible a esteroide ( $92 \pm 19$  ng/dL,  $p < 0.01$ ), y en el rechazo crónico ( $124 \pm 0.59$  ng/dL,  $p < 0.01$ ). En la medición de sC4d solo fue mayor en el grupo con rechazo agudo resistente a esteroide comparado con el grupo control ( $97 \pm 21$  ng/mL vs  $0.8 \pm 0.1$  ng/mL,  $p < 0.01$ ). No se encontró diferencias en la medición de sC5bC9 entre los grupos.

La medición en la orina de la porción soluble de la fase terminal de la vía del complemento (C5bC9) es afectada por el grado de proteinuria, además de que en el epitelio tubular no existe proteínas reguladoras del complemento, por lo tanto, hay una activación constante del mismo. Sin embargo, con adecuado procesamiento de la muestra se ha demostrado evitar estos inconvenientes (87).





En otro estudio de Reinhold y colaboradores, se midieron varias moléculas en orina en pacientes con trasplante renal y rechazo agudo mediado por células T (RAMCT), entre ellas se midió sVCAM por medio de ELISA. La población se dividió en tres grupos, grupo A, pacientes con RAMCT en biopsia de protocolo a los 14 días, grupo B, pacientes sin RAMCT en la biopsia de protocolo a los 14 días, pero con RAMCT en la biopsia de control a los 2-3 meses post trasplante renal y grupo C, pacientes controles, sin RAMCT en biopsia de protocolo a los 14 días del trasplante ni a los 2-3 meses. Los niveles urinarios de sVCAM fueron significativamente más altos en el grupo de rechazo agudo (grupo A) versus el grupo control (Grupo C) en la biopsia renal de los 14 días, con  $p < 0.001$ . Así también los niveles en orina de sVCAM medidos a los 14 días, fueron más elevados en el grupo B comparado contra el grupo control (Grupo C), con  $p = 0.002$ , y fue predictor de rechazo agudo a los 2-3 meses. En el análisis con curvas ROC mostró que los niveles elevados de sVCAM en orina son un buen predictor de rechazo agudo tanto en el grupo A ( $p = 0.001$ ) como en el grupo B ( $p = 0.009$ ). El valor de corte calculado con área bajo la curva de 0.88 fue de 0.32 ng/ml en los primeros 14 días post trasplante renal, con sensibilidad del 88% y especificidad del 94%. El corte calculado para el grupo B medido a los 14 días y como predictor de rechazo agudo a los 2-3 meses fue de 0.08 ng/ml, con área bajo la curva de 0.81, sensibilidad de 78%, especificidad de 83% y valor predictivo positivo de 70% (88).

Lamentablemente en los estudios previamente comentados, los grupos de comparación son controles sin rechazo activo, sin incluir pacientes con enfermedades inflamatorias, lo que no permite retar a las moléculas de manera adecuada para medir de manera apropiada su rendimiento y precisión diagnóstica en el mundo real. Por lo tanto, existe la necesidad de estudios con biomarcadores medibles en orina que puedan diferenciar entre una lesión endotelial mediada por anticuerpos de otras entidades que tienen daño endotelial por otros motivos; así como otras lesiones inflamatorias del tejido del injerto renal.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad renal crónica es un problema de salud pública a nivel mundial y en México. El trasplante de riñón es la modalidad de tratamiento con mejor índice de sobrevida y de calidad de vida en los pacientes con enfermedad renal crónica en estadio terminal. La principal causa de pérdida de injerto renal (~50%) posterior a un año del trasplante renal es el rechazo activo mediado por anticuerpos (RAMA). La falla del injerto renal ya representa la cuarta causa de enfermedad renal crónica. La espera en una lista de trasplante renal incrementa de manera considerable la mortalidad del paciente y los costos en servicio de salud. Actualmente el estándar de oro para el diagnóstico de rechazo agudo y/o RAMA es la biopsia del injerto renal; sin embargo, es un estudio invasivo, que conlleva a riesgos potenciales como sangrado masivo y hematomas, además esta contraindicada en escenarios clínicos como diátesis hemorrágica en pacientes con anticoagulación y antiagregantes plaquetarios, así como en pacientes que no cooperan para la realización de esta. Los cambios morfológicos observados en la histopatología de la biopsia del injerto se presentan una vez que el daño está hecho, por lo que es una herramienta diagnóstica de manera ya tardía. Existe una necesidad manifiesta de métodos diagnósticos no invasivos y tempranos que se puedan aplicar en el monitoreo continuo de pacientes con trasplante renal.





## JUSTIFICACIÓN

El rechazo activo mediado por anticuerpos ocasiona alrededor del 50% de las pérdidas de injerto; sin embargo, es una entidad potencialmente tratable; mientras mas temprano se identifica y se trata, mejor es el pronóstico del injerto renal. El estándar de oro para su diagnóstico es la biopsia del injerto renal y una estrategia para la detección temprana del RAMA han sido las biopsias de protocolo o vigilancia; sin embargo, es un procedimiento invasivo con potenciales complicaciones y es costosa. Por lo tanto, es de suma importancia contar con herramientas diagnósticas (biomarcadores) no invasivos, siendo ideal los que se detectan en orina, que puedan seleccionar a los pacientes con alta probabilidad de tener un RAMA y solo a ellos someterlos a biopsia, con lo que se incrementarían los beneficios y reduciendo los riesgos.

Este estudio es factible dado que en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán se realizan 350 BRP al año en pacientes con trasplante renal, el diagnóstico más frecuente es el rechazo activo mediado por anticuerpos (habitualmente subclínico) en alrededor del 30%.



## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los niveles de concentración de sVCAM, sICAM y sC5bC9 en orina son mayores en los pacientes con rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos comparado contra los que no tienen rechazo agudo y rechazo activo mediado por anticuerpos?

¿Cuál será el rendimiento diagnóstico para rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos de los niveles de sICAM, sVCAM y sC5bC9 urinarios?



## HIPÓTESIS

- 1) Los niveles de moléculas de adhesión celular (sVCAM, sICAM) y complejo soluble de sC5b-C9 en orina se encontrarán al menos 100% mas elevados en pacientes con diagnostico de rechazo agudo y mediado por anticuerpos vs aquellos sin rechazo.
- 2) Las moléculas con significancia en la fase 1 tendrán adecuado rendimiento diagnóstico para identificar a pacientes con rechazo agudo, con una sensibilidad de al menos del 80% y especificidad de 70%.



## **OBJETIVOS**

### **FASE 1. Prueba de Concepto**

Identificar si hay diferencias entre el grupo con y sin rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos de diferentes biomarcadores urinarios como son moléculas de adhesión (sVCAM, sICAM) y el complejo sC5bC9.

### **FASE 2. Estudio de prueba diagnóstica**

Evaluar el rendimiento diagnóstico de los niveles urinarios de las moléculas de adhesión (sVCAM, sICAM) y el complejo sC5bC en pacientes con rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos.



## **METODOLOGÍA**

### **Diseño de Estudio**

Se trata de un estudio observacional, transversal, de 2 fases:

La primera fase (prueba de concepto) está enfocada a estudiar la viabilidad del uso como biomarcador de las moléculas de adhesión sVCAM, sICAM y del complejo sC5bC9 en orina en pacientes con rechazo agudo y rechazo mediado por anticuerpos sin otras alteraciones que modifiquen potencialmente los biomarcadores comparado con un grupo control conformado por biopsias de injerto renal por protocolo sin alteraciones histológicas relevantes y biopsias de donantes renales sanos.

La fase dos (estudio de prueba diagnóstica) se realizó para aquellos biomarcadores que muestren utilidad en la fase uno, con la finalidad de obtener sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo en una población con todos los espectros de daño que pudieran modificar los biomarcadores, incluyendo pacientes con rechazo mediado por anticuerpos, rechazo mediado por células T, infección por virus BK, toxicidad por BK, daño crónico no inmunológico y glomerulonefritis.

### **Lugar y duración**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán de junio a diciembre del 2019.

### **Población de Estudio (Universo de Trabajo)**

Todo receptor de trasplante renal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán sometido a biopsia renal del injerto por indicación de su médico tratante.

### **Criterios de Inclusión de la fase uno**

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Pacientes trasplantados renales del INCMNSZ
3. Aceptación de participación en el estudio con firma de consentimiento informando



4. Pacientes sometidos a biopsia renal del injerto por indicación de su médico tratante o por protocolo de seguimiento

### **Criterios de Exclusión de la fase uno**

1. Muestra de patología con diagnóstico no concluyente de rechazo agudo o rechazo mediado por anticuerpos.
2. Antecedente del paciente de otra patología que explique cambios en la medición de sICAM, sVCAM y sC5bC9 en orina (microangiopatía trombótica, lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada a ANCA, glomerulopatía por C3, síndrome urémico hemolítico atípico, enfermedad por depósitos densos)
3. Muestra de orina inadecuadamente procesada
4. Muestra de orina insuficiente para el procesamiento
5. Muestra de patología insuficiente
6. Diagnósticos por biopsia de nefropatía asociada a virus BK, citomegalovirus (CMV) y adenovirus.

### **Criterios de eliminación de la fase uno**

Por tratarse de un estudio transversal no aplica

### **Tamaño de la muestra de la fase uno**

En el instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición y Salvador Zubirán se realizan 350 BRP al año en pacientes con trasplante renal, de los cuales aproximadamente el 30-50% de los casos se encuentra con datos de rechazo activo mediado por anticuerpos y un 10-15% adicional con rechazo celular y un 1-2% con nefritis por virus BK.

Para la fase 1 se calcularon los siguientes tamaños de muestras por molécula: Se utilizó la fórmula para comparación de medias con contraste de hipótesis (89), tomando en cuenta los valores de las moléculas de adhesión sICAM y sVCAM del estudio de Betchel y colaboradores (86), con la siguiente fórmula,  $n_1 = (\sigma^2_1 + \sigma^2_2 / k)(z_\alpha + z_\beta)^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2$  y  $n_2 = (\sigma^2_1 / k + \sigma^2_2)(z_\alpha + z_\beta)^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2$ , donde se encontró para la molécula sICAM en el grupo de rechazo resistente a esteroides una media de 7.1ng/dL (error estándar de la media de 0.3 y



desviación estándar de 2.16) y en el grupo control con media de 2.4ng/dL (error estándar de la media de 0.72 y desviación estándar de 1.61), así la diferencia de medias de esperada de 4.7 ng/dL, con una razón de muestras (B/A) de 1:1, nivel de confianza del 95% y potencia de 80%, se calculó una muestra necesaria de 3 individuos. Para la molécula sVCAM se encontró una media en el grupo de rechazo resistente a esteroide de 302 ng/dL (error estándar de la media de 39 y desviación estándar de 117) y en el grupo control se encontró una media de 26.9 ng/dL (error estándar de 4.5 y desviación estándar de 24.21), con una diferencia de medias de 275.1ng/dL, con razón de muestras (B/A) de 1:1, nivel de confianza del 95% y potencia 80%, se calculó un tamaño de muestra necesario de 2 pacientes.

En cuanto a los niveles de sC5bC9 no se encontró estudios en la literatura de medición en orina en pacientes con rechazo agudo mediado con anticuerpos, en su lugar se encontró un estudio publicado por Gou y colaboradores (90), en donde se cuantificó sC5bC9 en orina en pacientes con vasculitis asociada a ANCA activa, remisión y en grupos controles, donde la mediana en cada grupo fue 52.73 ng/mg Cr (IQR, 3.46-142), 0.20 ng/mg Cr (IQR, 0-2.89) y 0.56 ng/mg Cr (IQR, 0.1-1.14). Se sugiere una misma vía común de daño asociada a activación del complemento también en el paciente con RAMA, por lo que se espera una amplia diferencia de medias entre grupos del estudio, ya que hay una clara diferencia de las medianas en el estudio con pacientes con vasculitis asociada a ANCA.

Se decidió un tamaño de muestra de al menos de 20 pacientes por grupo, debido a que se trata de un estudio de prueba de concepto.

### **Criterios de Inclusión de la fase dos**

1. Pacientes mayores de 18 años
2. Pacientes trasplantados renales del INCMNSZ
3. Aceptación de participación en el estudio con firma de consentimiento informando
4. Pacientes sometidos a biopsia renal del injerto por indicación de su médico tratante o por protocolo de seguimiento



### **Criterios de Exclusión de la fase dos**

1. Muestra de patología con diagnóstico no concluyente de rechazo agudo o rechazo mediado por anticuerpos.
2. Muestra de orina inadecuadamente procesada
3. Muestra de orina insuficiente para el procesamiento
4. Muestra de patología insuficiente

Para la fase 2 del estudio se tomaron en cuenta las moléculas que fueron significativas en la fase 1 para análisis de prueba diagnóstica. Para el cálculo de la muestra para cada una de las moléculas, se uso formula de prueba diagnóstica de software EPI data 3.1, estimando un valor esperado de al menos de sensibilidad del 80% y de especificidad de al menos del 70% comparado con el estándar de oro (biopsia renal), con una prevalencia de la enfermedad (rechazo mediado por anticuerpos) del 40%, nivel de confianza del 95%, potencia del 80% se calculó una n de al menos 101 pacientes y de 126 pacientes con corrección de Yates.

### **Muestras de orina de pacientes y prueba de ELISA**

Se recolectó muestra de orina (10 mL) de los pacientes previo a la realización de la biopsia renal. La muestra fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recolectó en alícuotas y se almaceno a -70°C hasta su procesamiento para ELISA. Las muestras utilizadas para sC5bC9 se recolectaron en tubos con EDTA para evitar sobreactivación de la cascada del complemento.

Para medir sICAM y sVCAM se utilizaron Kits de ELISA comerciales de la empresa ABCAM para soluble ICAM-1 CD54 HUMAN SIMPLESTEP con numero de lote: 41116015 y HUMAN soluble VCAM1 ELISA KIT (AB223591) con numero de lote: 41116133, respectivamente. Para medir sC5bC9 se utilizo Kit ELISA MicroVue SC5b-9 Plus EIA de Quidel Corporation (Nasdaq: QDEL) San Diego, California, con numero de lote: 142418.





## **ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS**

### **VARIABLES DEL ESTUDIO**

Las variables del estudio, así como su naturaleza, esquema de codificación y unidades de medida se reportan en el anexo 1.

### **RECOLECCIÓN DE DATOS**

Se diseñó formato de captura por cada paciente la cual se vació en una base de datos del software SPSS versión 25.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Programa estadístico SPSS versión 25 y las gráficas se diseñaron en Grahpad Prism 9.

### **ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA**

1. Variables categóricas se expresaron en frecuencias y porcentajes
2. Variables continuas con distribución normal (prueba de Kolmogórov-Smirnov) se expresaron en medias y desviación estándar, de lo contrario se expresaron en medianas y rango intercuartílicos (IQR).

### **ANÁLISIS BIVARIABLE**

1. Variables categóricas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher.
2. Variables continuas con distribución normal se utilizó la prueba de t student y para las variables continuas con distribución anormal se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney o prueba de Wilcoxon.

### **ANÁLISIS DE PRUEBA DIAGNÓSTICA**

Se utilizó curvas ROC para calcular sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), RVP y RVN.

Diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.05$ .



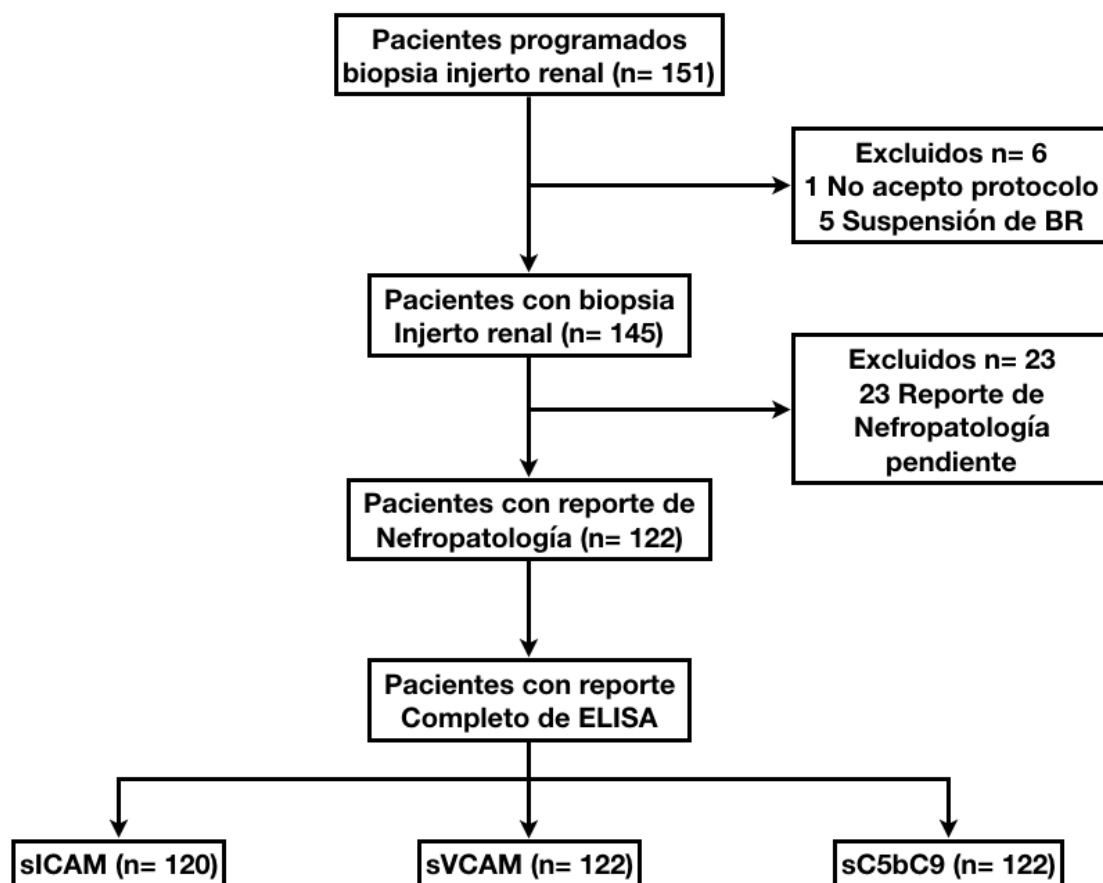
## ÉTICA

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se registró con el número de referencia: 2969. Este estudio se realizó acorde a las disposiciones que en materia de investigación se ha publicado en la ley general de salud y en la NOM (Norma Oficial Mexicana) 012-SSA3-2012. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado.



## RESULTADOS

Un total de 151 biopsias de injerto renal fueron realizadas en el periodo correspondiente del 18 julio al 13 diciembre del 2019 en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se excluyeron 23 pacientes cuyo reporte de patología aún estaba pendiente al momento del corte del estudio. Finalmente se incluyeron 122 pacientes, en quienes se obtuvo el reporte de nefropatología y se realizó la medición en orina de las moléculas de adhesión celular (sICAM, sVCAM) y el complejo sC5bC9 del complemento. Se excluyeron 2 pacientes en el grupo de sICAM por no contar con reporte final ELISA. Ver Flujograma de pacientes en la **Figura 4**.



*Figura 4. Flujograma de selección de pacientes*



### Características de la población:

La mediana de la edad de la población fue de 40 años (IQR, 31.0-52.7), el 57.4% de la población fueron hombres. La etiología de la enfermedad renal crónica fue no determinada en 48.4%, nefropatía diabética (NDM) en el 14.8% y nefritis lúpica (NLES) en 11.5%, el resto de las etiologías se muestran en la **tabla 1**. La comorbilidad más frecuente fue hipertensión arterial sistémica (HAS) en el 31.1%, seguida de diabetes mellitus (DM) en el 21.3% y lupus eritematoso sistémico (LES) en 11.5%. Los pacientes tuvieron antecedente de infección por virus BK en el 9.0%.

El 40.2% de los pacientes tuvieron antecedente de un episodio de rechazo, de los cuales la variedad más frecuente fue el rechazo mediado por anticuerpos (RMA) en el 30.3%, seguido del rechazo mediado por células T (RMCT), el resto información se muestra en la **tabla 1**.

Características de la población (n=122)	n (%) *
Edad del receptor, años, mediana, (IQR)	40 (31.0-52.8)
Hombres	70 (57.4)
Primer trasplante renal	109 (89.3)
Causa de la enfermedad renal crónica	
Desconocida	59 (48.4)
Glomerulopatías Primarias	
Glomerulonefritis	8 (6.6)
Glomérulo esclerosis focal y segmentaria	2 (1.6)
Glomerulopatías Secundarias	
Nefropatía diabética	18 (14.8)
Nefritis lúpica	14 (11.5)
Nefroangioesclerosis	2 (1.6)
Enfermedad poliquística del adulto	7 (5.7)
Urológicas	5 (4.1)
Otras	4 (3.3)
Rechazo crónico en 1er Trasplante	3 (2.5)
Comorbilidades	
Hipertensión arterial	38 (31.1)
Diabetes mellitus	26 (21.3)
Lupus eritematoso sistémico	14 (11.5)
Antecedente de Infección por Virus BK	11 (9.0)
Antecedente de rechazo	49 (40.2)
Tipo de rechazo previo	
Rechazo mediado por anticuerpos	37 (30.3)
Rechazo mediado por células T	10 (8.2)



Rechazo Mixto	2 (1.6)
*Los valores proporcionados se expresan como n (%), a menos que se especifique lo contrario. IQR, Rango intercuartílico.	

**Tabla 1.** Características de la población.

**Características del trasplante:**

En 109 pacientes (89.3%) se trató de su primer trasplante renal y en 13 pacientes (10.7%) fue el segundo. El 55.7% recibió trasplante de donador vivo, de estos el principal donador fue un hermano en el 22.1%, seguido de alguno de los padres en el 14% y una persona viva sin relación familiar en el 8.2%. En el 67.2% no se compartían ningún haplotipo, en el 27% se compartía 1 haplotipo y en el 4.9% se compartía 2 haplotipos.

Se encontró presencia de anticuerpos donador específico (ADES) previos al trasplante en el 11.5% y de formación de *novo* postrasplante en el 59%. En el panel reactivo de anticuerpos (PRA) previo al trasplante, los anticuerpos contra los antígenos de la clase I se presentaron con una mediana de 2% (IQR, 0-5%) y contra los antígenos de clase II en el 1.5% (IQR, 0-4.2%).

La terapia de inducción más utilizada fue Timoglobulina en el 50.8% y en segundo lugar fueron los inhibidores del receptor de interleucina 2 (Basiliximab y Daclizumab) en 43.5%. No se usó inducción en el 4.0% (pacientes con 2 haplotipos). La terapia de mantenimiento con tacrolimus (FK) se utilizó en el 92.6%, mofetil micofenolato (MMF) en el 85.2%, prednisona (PDN) en 98.4%, el resto de los medicamentos inmunosupresores se muestran en la **tabla 2**.

La mediana de la creatinina sérica basal de la población fue de 1.1 (IQR, 0.9-1.4) mg/dL. La mediana de creatinina sérica y tasa de filtrado estimada por CKD EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) al momento de la biopsia renal fue de 1.3 mg/dL (IQR, 1.0-1.6) y 61.7 ml/min/1.72m<sup>2</sup> (IQR, 44.0-85.0), respectivamente Ver **tabla 2**.

Características del trasplante (n=122)	n (%)
Antecedente de un primer trasplante	109 (89.3)
Donador vivo	68 (55.7)
Relación con el donador	
Hermano (a)	27 (22.1)
Vivo sin relación	10 (8.2)
Padre	7 (5.7)



Madre	7 (5.7)
Hijo (a)	6 (4.9)
Cónyuge	5 (4.1)
Tío (a)	3 (2.5)
Primo (a)	1 (0.8)
Novio (a)	1 (0.8)
Familiar político	1 (0.8)
<b>Haplotipos compartidos</b>	
Cero	82 (67.2)
Uno	33 (27.0)
Dos	6 (4.9)
<b>ADES pretrasplante</b>	14 (11.5)
<b>Panel reactivo de anticuerpos (PRA) pretrasplante, IQR, %</b>	
Clase I	2.0 (0.0-5.0)
Clase II	1.5 (0.0-4.2)
<b>ADES Novo</b>	72 (59.0)
<b>Tratamiento de Inducción</b>	
Inhibidor del receptor de interleucina 2	53 (43.4)
Timoglobulina	62 (50.8)
Sin inducción	5 (4.1)
Sin información	2 (1.6)
<b>Tratamiento de mantenimiento</b>	
Tacrolimus	113 (92.6)
Mofetil micofenolato	104 (85.2)
Prednisona	120 (98.4)
Otros	19 (15.6)
<b>Creatinina basal, mediana, mg/dL, IQR</b>	1.1 (0.9-1.4)
<b>Creatinina al momento de la BR mediana, mg/dL, IQR</b>	1.3 (1.0-1.6)
<b>TFGe CKD EPI (ml/min/1.72m<sup>2</sup>), al momento de la BR, mediana (IQR)</b>	61.7 (44.0-85.0)

Los valores proporcionados se expresan como n (%), a menos que se especifique lo contrario. **IQR**, Rango intercuartílico. BR, Biopsia renal, **CKD EPI**, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration formula, **TFGe**, Tasa de filtrado glomerular estimada

**Tabla 2.** Características del trasplante.

### Características de la biopsia renal:

La principal indicación de la biopsia renal fue identificación de ADES de Novo en el 32%, seguida de biopsia de protocolo (tercer mes y anual) en el 29.8%, control posterior al termino de tratamiento de un evento de rechazo en el 17.2% y biopsia por tratarse de un paciente nuevo en el servicio del instituto en el 2.5%. El resto de las indicaciones se muestran en la **tabla 3**.



Entre los diagnósticos histopatológicos en las biopsias del injerto renal, el más frecuente fue el rechazo del injerto en 49 pacientes (40.1%), donde el rechazo mediado por anticuerpos se presentó en 36/122 pacientes (29.5%), de estos 20/36 pacientes (55.5%) resultaron positivos para la inmunotinción de C4d, seguidos de rechazo mixto (mediado por anticuerpos y mediados por células T) en 6/122 pacientes (4.9%), rechazo mediado por células T aislado en 4/122 pacientes (3.2%) y rechazo crónico mediado por anticuerpos en 3/122 pacientes (3.5%). Ver **Figura 5 y 6, Tabla 3.**

Características de la biopsia renal (n=122)	n (%)
<b>Indicación de la biopsia</b>	
Anticuerpo donador específico de <i>novo</i>	39 (32.0)
Protocolo de 3er mes	23 (18.9)
Control post tratamiento de rechazo	21 (17.2)
Disfunción del injerto	17 (13.9)
Protocolo de 12 meses	14 (11.5)
Proteinuria en estudio	4 (3.3)
Nuevo ingreso	3 (2.5)
Biopsia cero	1 (0.8)
<b>Diagnósticos en la biopsia renal</b>	
<b>Biopsia injerto de trasplante renal normal</b>	<b>24 (19.7)</b>
<b>Rechazo Total</b>	<b>49 (40.2)</b>
Rechazo mediado por anticuerpos	36 (29.5)
C4d (+)	20/36 (55.6)
Rechazo Mixto	6 (4.9)
Rechazo mediado por células T	4 (3.3)
RMA crónico	3 (2.5)
<b>Glomerulopatías</b>	<b>21 (17.2)</b>
<b>Alteraciones limítrofes puro</b>	<b>18 (14.8)</b>
<b>Glomerulitis G1 (cambios inmunológicos)</b>	<b>10 (8.2)</b>
<b>Otros diagnósticos sin rechazo en la biopsia de injerto</b>	21/122 (17.2)
Nefropatía diabética	5/21 (23.8)
Nefritis túbulo intersticial	3/21 (14.3)
Nefritis lúpica	2/21 (9.5)
Amiloidosis	2/21 (9.5)
Nefropatía por IgA	2/21 (9.5)
Expansión mesangial	2/21 (9.5)
Nefritis por Virus BK	1/21 (4.8)
Necrosis tubular aguda	1/21 (4.8)
Depósito mesangial de C3	1/21 (4.8)
Nefropatía Membranosa	1/21 (4.8)
Cristales de Oxalato de Ca	1/21 (4.8)

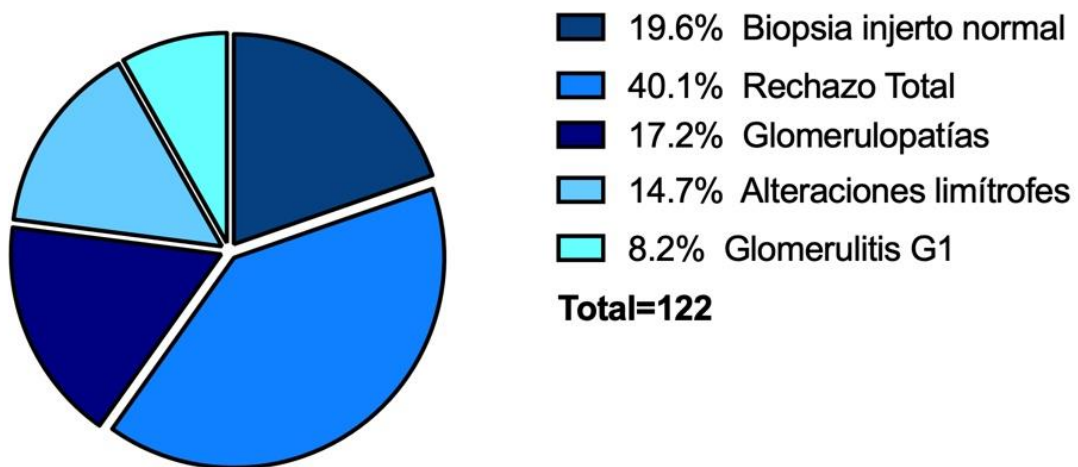
\*Los valores proporcionados se expresan como n (%), a menos que se especifique lo contrario. IQR, Rango intercuartílico. RMA, rechazo mediado por anticuerpos.

**Tabla 3.** Características de los resultados de la biopsia renal.



En 24/122 pacientes (19.7%) se reportó la biopsia de injerto sin alteraciones morfológicas (biopsia normal en paciente con trasplante), los cuales fueron tomados como controles. En 21/122 pacientes (17.2%) se encontró algún tipo de glomerulopatía, donde las glomerulopatías primarias más frecuentes fueron amiloidosis en 2/21 pacientes (9.5%), Nefropatía por IgA en 2/21 pacientes (9.5%), Nefropatía membranosa (NM) en 1/21 pacientes (4.7%) y las glomerulopatías secundarias más frecuentes fueron la nefropatía diabética (NDM) en 5/21 pacientes (17.2%), seguida de nefritis lúpica (NLES) en 2/21 pacientes (9.5%), expansión mesangial por complejos inmunes 2/21 pacientes (9.5%), nefritis por virus BK en 1/21 pacientes (4.7%). Otros diagnósticos menos encontrados en las biopsias de injerto fueron: nefritis túbulo intersticial en 2/21 pacientes (14.2%), necrosis tubular aguda en 1/21 pacientes (4.7%), depósito mesangial de C3 en 1/21 pacientes (4.7%), depósitos de oxalato de calcio en 1/21 pacientes (4.7%). Ver **Figura 7 y Tabla 3**.

### Diagnóstico Biopsia Injerto



**Figura 5.** Resultados en biopsias renales en pacientes trasplantados. N= 122





## Tipos de Rechazo

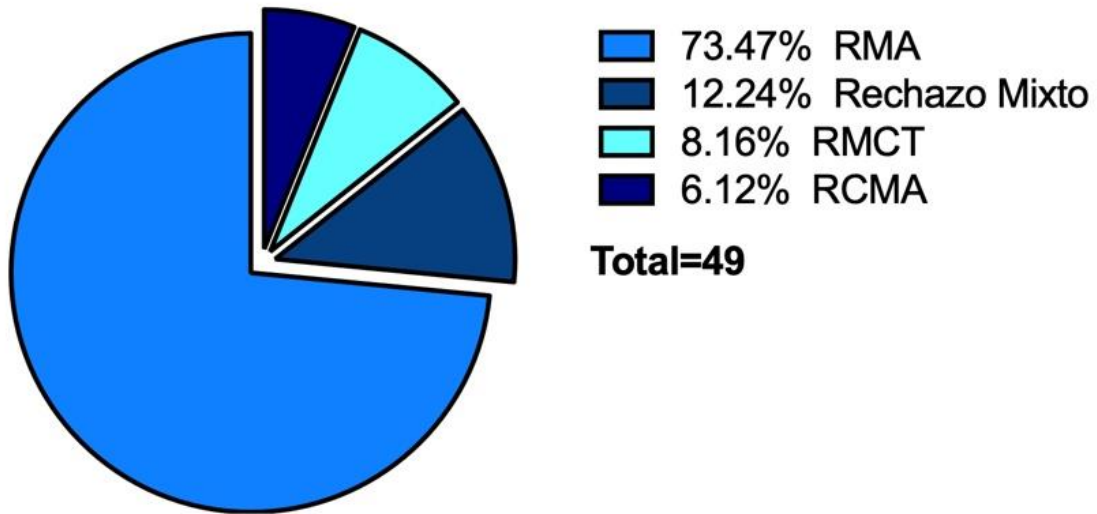


Figura 6. Número y tipo de rechazos en las biopsias renales de 122 pacientes.

## Otras Glomerulopatías

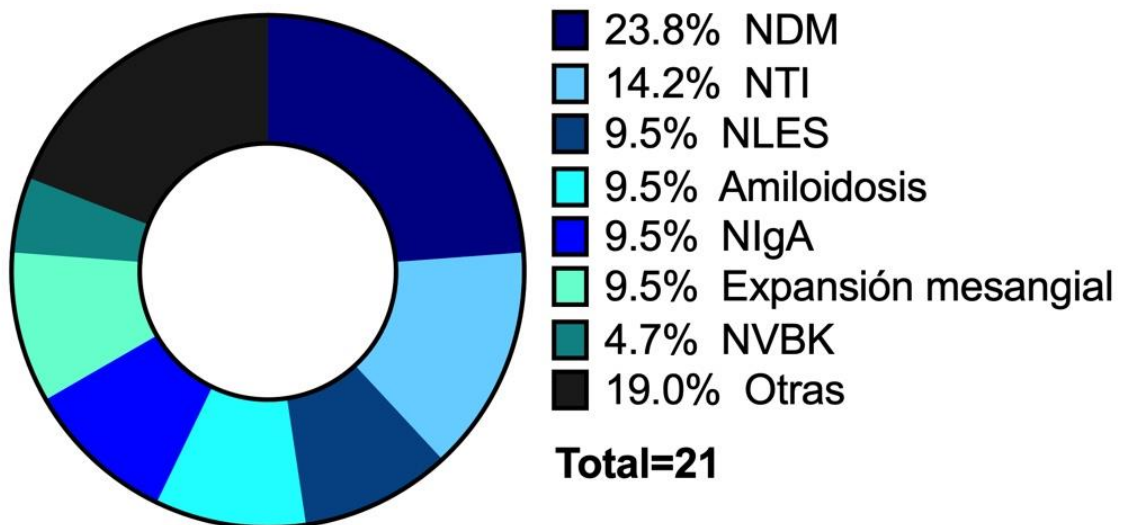


Figura 7. Número y tipo de glomerulopatías en las biopsias renales de 122 pacientes.

## Índice de actividad en las biopsias renales

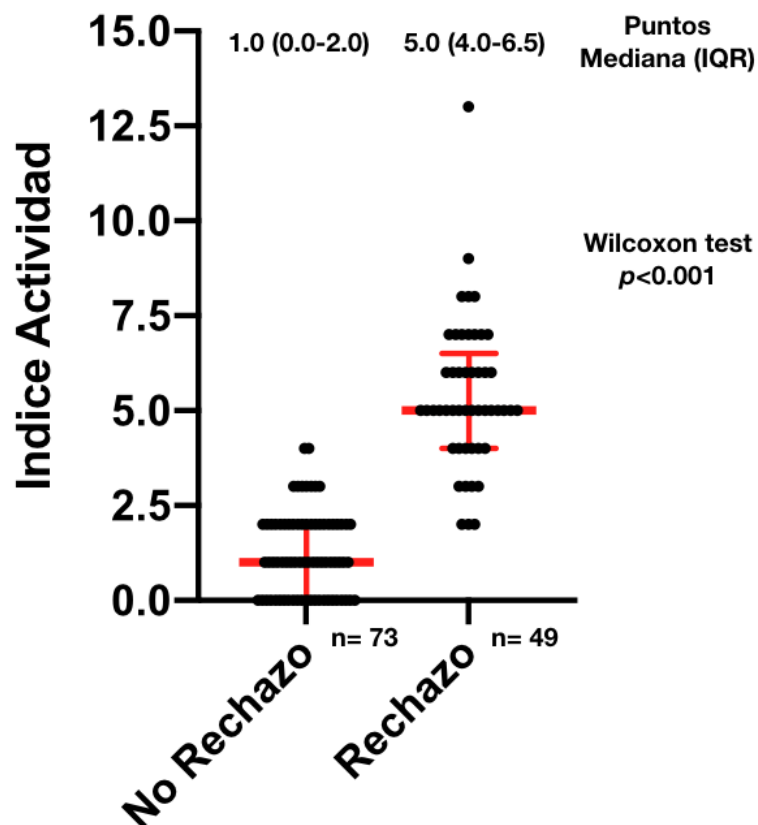
Se realizó para cada uno de los diagnósticos de la biopsia del injerto un índice de actividad calculado con cada uno de los puntajes de los ítems de inflamación de acuerdo con la clasificación de Banff 2017 que va de cero a tres puntos (63), integrado por la suma de glomerulitis (g), capilaritis peritubular



(ptc), tubulitis (t) e inflamación intersticial (i), con un valor total mínimo de cero y un máximo de doce puntos por paciente.

Se encontró mayor índice de actividad en el grupo de pacientes con rechazo comparado con el grupo sin rechazo, 5.0 (IQR, 4.0-6.5) puntos versus 1.0 (IQR, 0.0-2.0) puntos, con valor de  $p < 0.001$ , ver **figura 8**.

En el análisis de medición del índice actividad por grupos se encontró diferencia estadísticamente significativa por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con  $p < 0.001$ . El grupo con mayor índice de actividad fue el de rechazos mixtos con 8.0 (IQR, 8.0-9.0) puntos, seguido de rechazo mediado por anticuerpos con 5.0 (IQR, 5.0-6.0) puntos, resto de grupos se muestran en la **tabla 4** y **figura 9**.



**Figura 8.** Índice de actividad comparado entre el grupo de pacientes con Rechazo versus grupo de pacientes sin Rechazo.

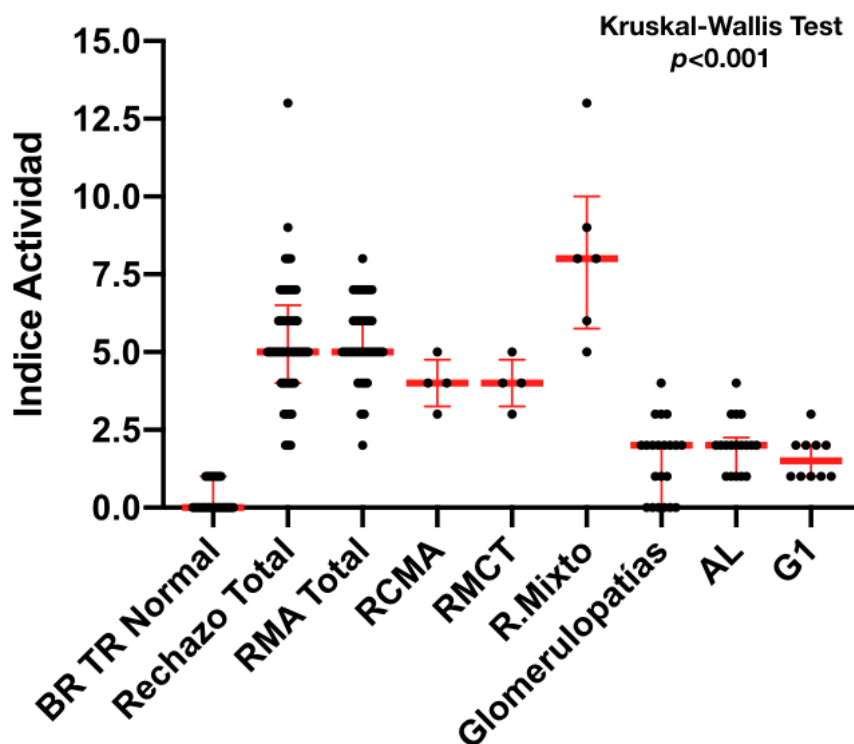
Diagnóstico biopsia renal (n=122)	Índice actividad*	Índice cronicidad*
Biopsia injerto normal	0.0 (0.0-1.0)	3.0 (2.0-4.0)



Rechazo Total	5.0 (4.0-6.0)	5.0 (3.0-6.0)
Rechazo mediado por anticuerpos	5.0 (5.0-6.0)	4.0 (3.0-6.5)
Glomerulopatías	2.0 (0.0-2.0)	4.0 (3.0-6.0)
Alteraciones limítrofes puras	2.0 (1.0-2.0)	3.0 (2.0-5.0)
Glomerulitis G1	1.5 (1.0-2.0)	3.0 (2.0-5.0)
Rechazo Mixto	8.0 (6.0-9.0)	5.5 (5.0-6.0)
Rechazo mediado por células T	4.0 (3.5-4.5)	3.0 (2.5-4.0)
Rechazo mediado por anticuerpos crónico	2.0 (2.0-2.5)	5.0 (4.5-7.0)

\*Los valores proporcionados se expresan como puntos y sus rangos intercuartílicos (IQR).

**Tabla 4.** Índices de actividad y de cronicidad en los diferentes grupos de las biopsias de injerto.



	BR TR normal n=24	RMA n=36	RCMA n=3	RMCT n=4	R.Mixtos n=6	Glomerulopatías n= 21	AL puros n= 18	G1 n=10
Índice actividad	0.0 (0.0-1.0)	5.0 (5.0-6.0)	2.0 (2.0-2.5)	4.0 (3.5-4.5)	8.0 (6.0-9.0)	2.0 (0.0-2.0)	2.0 (1.0-2.0)	1.5 (1.0-2.0)

**Figura 9.** Índice de actividad entre los diferentes grupos de diagnósticos en las biopsias de injerto.

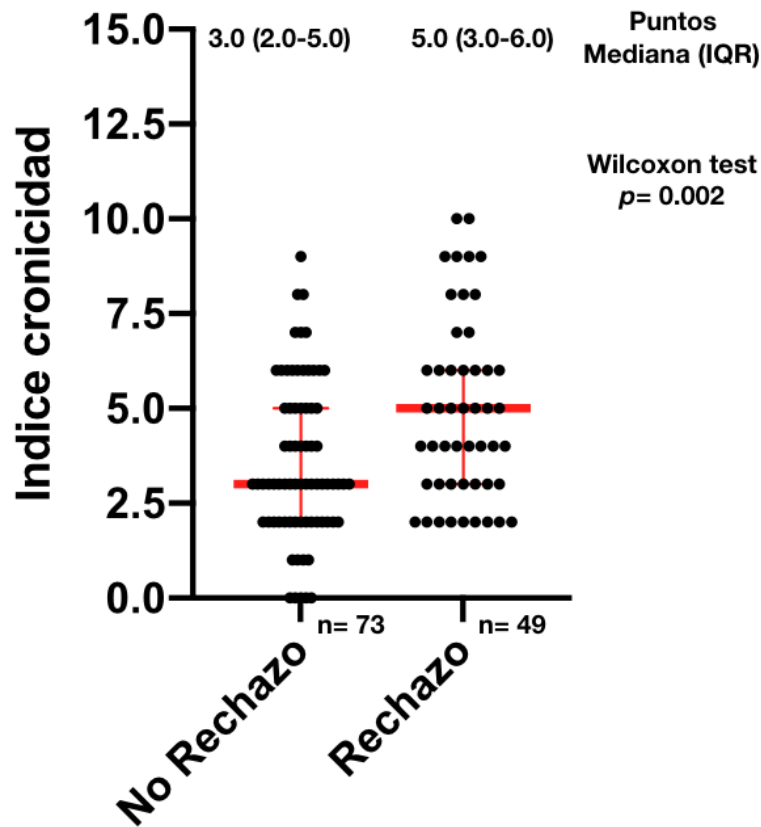
### Índice de cronicidad en las biopsias renales

Así mismo con cada uno de los diagnósticos de la biopsia del injerto se calculó un índice de cronicidad utilizando cada uno de los puntajes de los ítems de

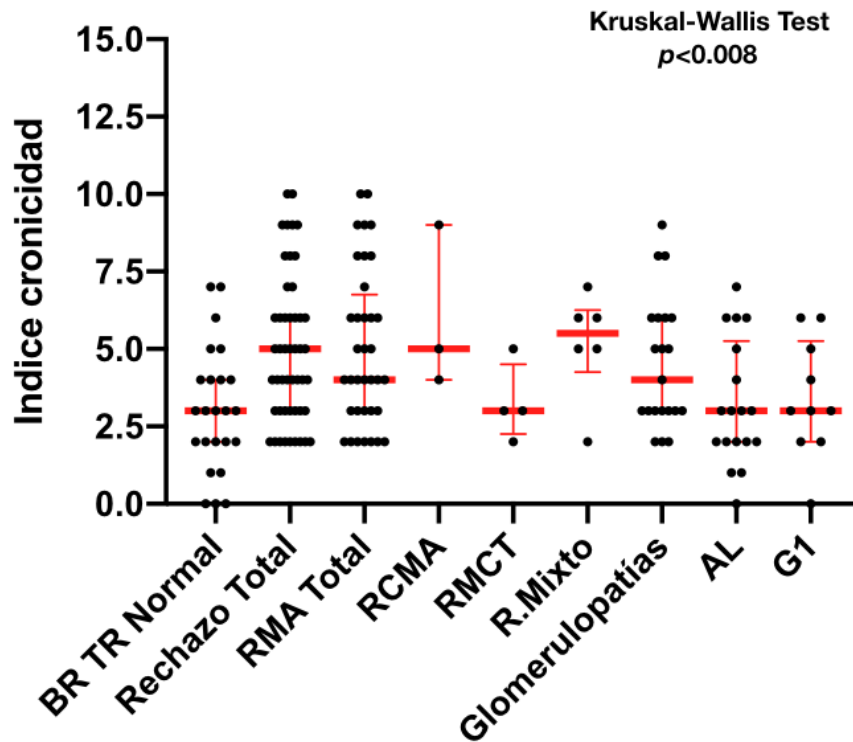


cronicidad de acuerdo con Banff 2017, que va de cero a tres puntos, integrado por duplicación de membrana basal glomerular (cg), fibrosis intersticial (ci), atrofia tubular (ct), engrosamiento fibroso de la íntima vascular (cv), expansión mesangial (mm) con un valor total mínimo de cero y un máximo de doce puntos por paciente. Se encontró mayor índice de cronicidad en el grupo de pacientes con rechazo comparado con el grupo sin rechazo, 5.0 (IQR, 3.0-6.0) puntos versus 3.0 (IQR, 2.0-5.0) puntos,  $p=0.002$ , ver **figura 10**.

En el análisis por grupos se encontró diferencia estadísticamente significativa por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con valor de  $p=0.008$ . El grupo con mayor índice de cronicidad fue el de rechazos mixtos con 5.5 (IQR, 5.0-6.0) puntos, seguido de rechazo crónico mediado por anticuerpos con 5.0 (IQR, 4.5-7.0) puntos, resto de grupos se muestran en la **tabla 4** y **figura 11**.



**Figura 10.** Índice de cronicidad comparado entre el grupo de pacientes con Rechazo versus grupo de sin Rechazo



	BR TR normal n=24	RMA n=36	RCMA n=3	RMCT n=4	R.Mixtos n=6	Glomerulopatías n= 21	AL puros n= 18	G1 n=10
Índice cronicidad	3.0 (2.0-4.0)	4.0 (3.0-6.5)	5.0 (4.5-7.0)	3.0 (2.5-4.0)	5.5 (5.0-6.0)	4.0 (3.0-6.0)	3.0 (2.0-5.0)	3.0 (2.0-5.0)

Figura 11. Índice de cronicidad entre los diferentes grupos de diagnósticos en las biopsias de injerto.

### Medición de moléculas sICAM, sVCAM y sC5bC9 en orina

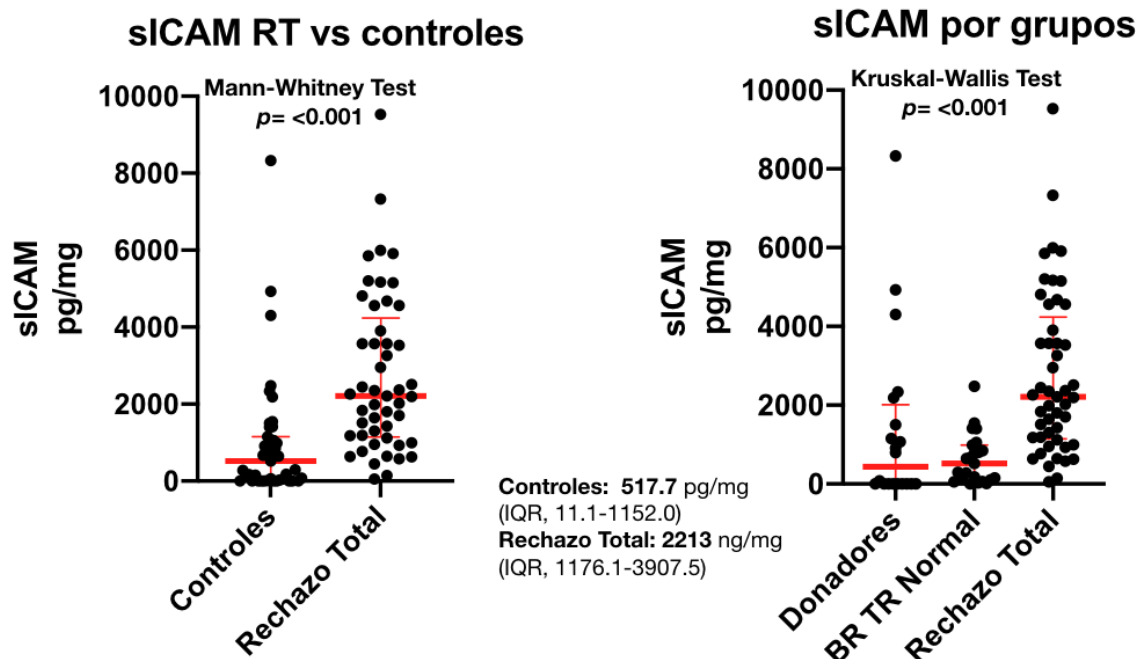
Los niveles urinarios para todas las moléculas fueron normalizados con creatinina urinaria ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  o  $\text{ng}/\text{mg}$ ) para corregir las diferencias en la dilución de la orina.

#### sICAM:

Se encontró una mayor concentración urinaria de sICAM en el grupo de los pacientes con rechazo total (RT) comparada con el grupo control, integrado por el grupo de biopsia del injerto normal y el grupo de los donadores renales (**figura 12-A**). Esta diferencia persistió aún cuando se analizaron los dos subgrupos controles por separado, el grupo de biopsia del injerto normal y grupo de donadores renales, 2213.3 (IQR, 1176.1-3907.5)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  versus 517.6 (IQR, 126.5-916.3) y 437.0 (IQR, 0.0-1844.1)  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente. Ver **figura 12-B**.

A)

B)



**Figura 12.** sICAM urinario. A) Grupo control (donadores mas grupo de biopsia injerto normal) comparado con grupo Rechazo total. B) Comparación entre grupo donadores, biopsia injerto normal y grupo con Rechazo total por separado.

Los niveles urinarios de sICAM fueron significativamente mayores en el grupo de rechazos mixtos, seguido por el grupo de rechazo mediado por anticuerpos (RMA), posteriormente el grupo de rechazo total (RT), el resto de los grupos y los valores urinarios de sICAM se muestra en la **tabla 5**.

En el análisis de diferentes grupos de diagnósticos en la biopsia de injerto de sICAM urinario mostro diferencia estadísticamente significativa por medio de la prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ , como se muestra en la **Figura 13**.

Así mismo los grupos de alteraciones limítrofes puros (AL), glomerulitis leve (G1) y glomerulopatías sin rechazo tuvieron niveles urinarios mas elevados de sICAM con diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo de biopsia normal y el grupo donadores renales. El grupo de rechazo mediado por células T (RMCT) no tuvo diferencia estadísticamente significativa comparado con el grupo de biopsia normal (294.0 [IQR, 22.1-837.4] pg/mg vs 517.6 [IQR, 126.5-916.3] pg/mg,  $p = 0.863$ ). No se encontró diferencia entre grupo de rechazo total ni el grupo rechazo mediado por anticuerpos comparado con el grupo de glomerulopatías, con mediana de sICAM urinario de 2213.3 (IQR,

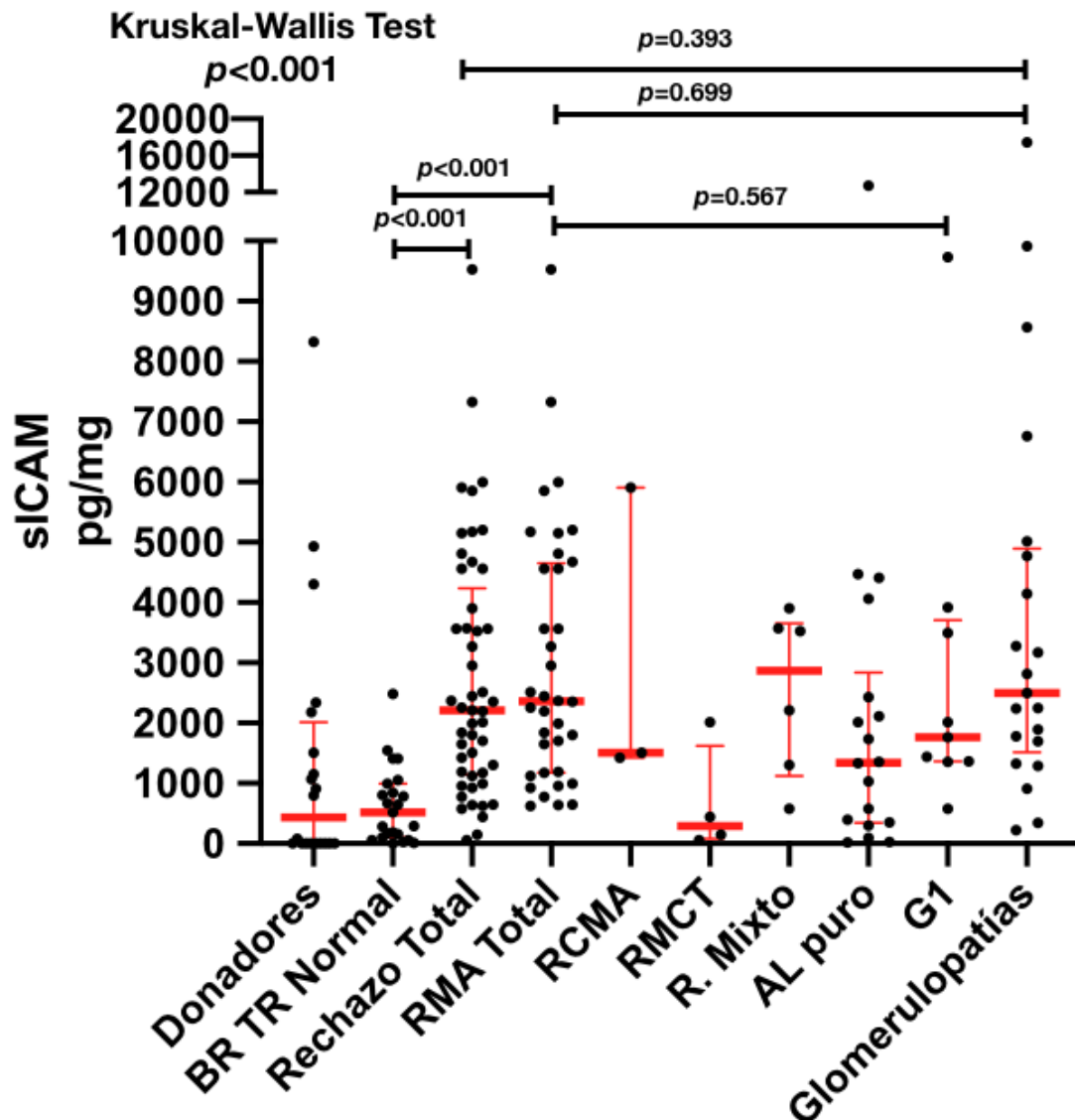


1176.1-3907.5)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y 2363.3 (IQR,1184.7-4592.1)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  versus 2498.8 (IQR, 1697.6-4775.9)  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $p= 0.39$  y  $0.69$  respectivamente.

Los niveles urinarios de sICAM fueron mas elevados en grupo de RMA comparados contra los grupos de rechazo mediado por células T (RMCT) y alteraciones limítrofes, mediana de 2363.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (IQR, 1184.7-4592.1)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  vs mediana de 294.0 (22.1-837.4)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y 1343.9 (364.9-2350.7)  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , con  $p= 0.006$  y  $0.021$ . Ver **tabla 5** y **figura 13**.

	Donadores n=20	BR TR normal n=24	Rechazo Total n=49	RMA n=36	RCM n=3	RMCT n=4	R. Mixtos n=6	AL puro n= 18	G1 n=10	Glomerulopatias n= 21
sICAM $\mu\text{g}/\text{mg}$	437 (0.0- 1844.1)	517.6 (126.5- 916.3)	2213.36 (1176.1- 3907.5)	2363.3 (1184.7- 4592.1)	1509.3 (1468.5- 3708.8)	294.0 (22.1- 837.4)	2869.8 (1530.1- 3562.3)	1343.9 (364.9- 2350.7)	1762.5 (1365- 3496.7)	2498.8 (1697.6-4775.9)

**Tabla 5.** Comparación de niveles urinarios de la molécula sICAM entre los diferentes grupos de diagnóstico en las biopsias de injerto. Se muestran sus valores y rangos intercuartílicos (IQR).

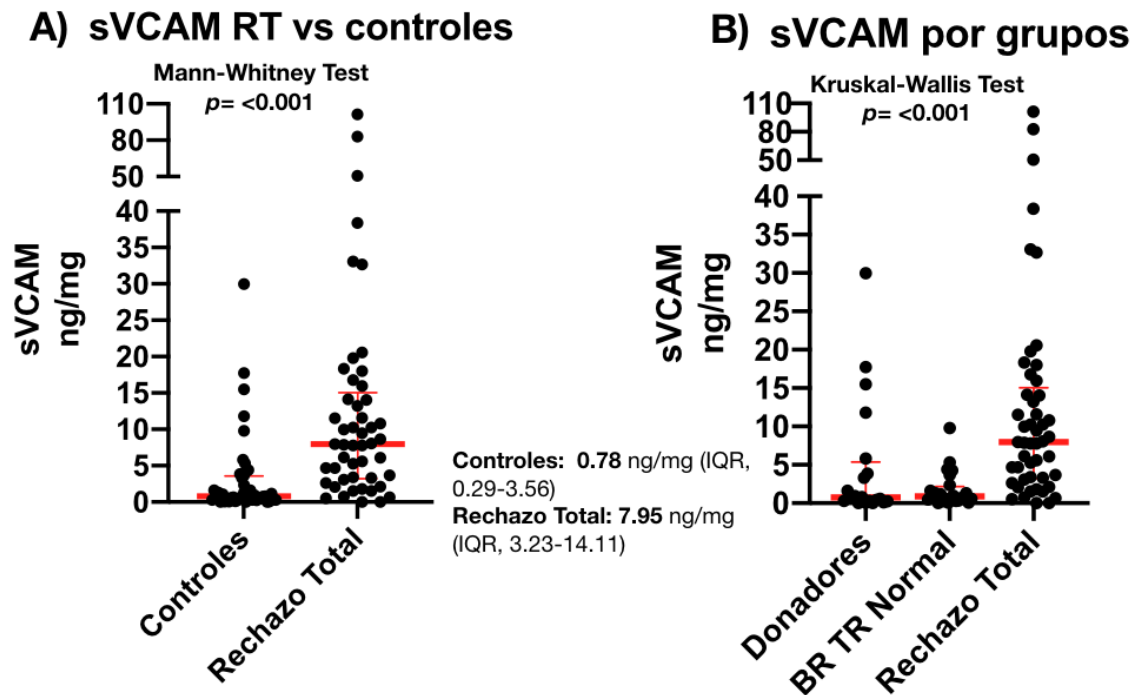


**Figura 13.** Comparación de niveles urinarios de sICAM por prueba de Kruskal-Wallis entre diferentes grupos de rechazo. También se muestran comparaciones entre grupos por medio de prueba de Wilcoxon.

**sVCAM:**

Se encontró mayor concentración urinaria de sVCAM en el grupo de los pacientes con rechazo total (RT) comparada con un grupo control, integrado por la integración del grupo de biopsia del injerto normal y el grupo de los donadores renales (**figura 14-A**). Dicha diferencia persiste cuando se compara el grupo de rechazo total con el grupo de biopsia del injerto normal y grupo de donadores renales por separado, 7.95 (IQR, 3.33-14.11) ng/mg versus 0.87 (IQR, 0.37-2.16) ng/mg y 0.73 (IQR, 0.28-4.84) ng/mg, respectivamente (**figura 14-B**).





**Figura 14.** sVCAM urinario. A) Grupo control (donadores mas grupo de biopsia normal) comparado con grupo Rechazo total. B) Comparación entre grupo donadores, biopsia injerto normal y grupo con Rechazo total.

Los niveles urinarios de sVCAM fueron significativamente mayores en el grupo de rechazos mixtos, seguido por el grupo de rechazo crónico mediado por anticuerpos (RCMA), posteriormente el grupo de rechazo mediado por anticuerpos (RMA), el resto de los grupos y los valores urinarios de sVCAM se muestra en la **tabla 6 y figura 15**.

	Donadores n=20	BR TR normal n=24	Rechazo Total n=49	RMA n=36	RCMA n=3	RMCT n=4	R. Mixtos n=6	AL puros n= 18	G1 n=10	Glomerulopatías n= 21
sVCAM ng/mg	0.73 (0.28-4.84)	0.87 (0.37 - 2.16)	7.95 (3.33-14.11)	7.91 (3.15- 11.99)	9.99 (6.70- 12.02)	8.60 (2.44- 14.56)	11.48 (5.72- 17.94)	1.44 ( 0.68- 2.52)	3.35 (1.30- 4.79)	7.06 (3.99-14.86)

**Tabla 6.** Comparación de niveles urinarios de la molécula sVCAM entre los diferentes grupos de diagnóstico en las biopsias de injerto. Se muestran sus valores y rangos intercuartílicos (IQR).

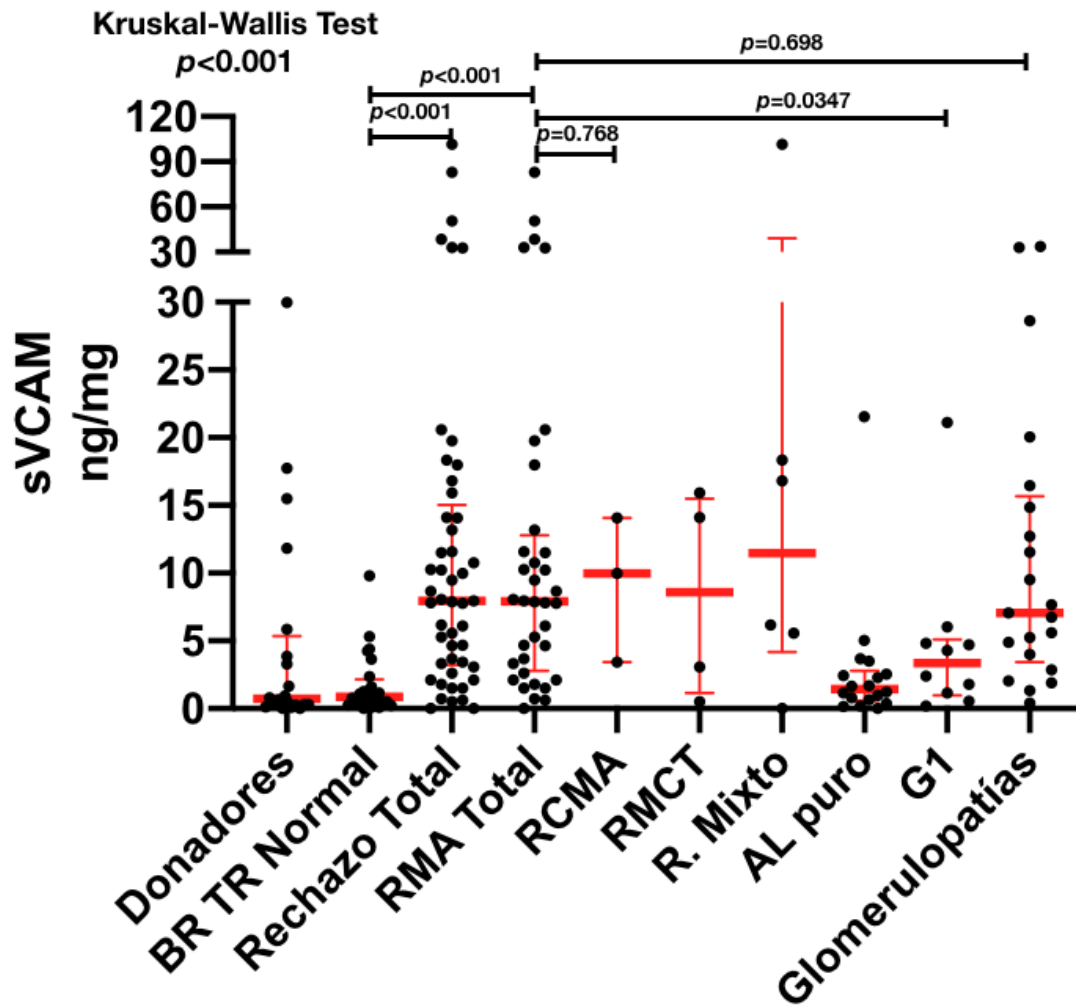
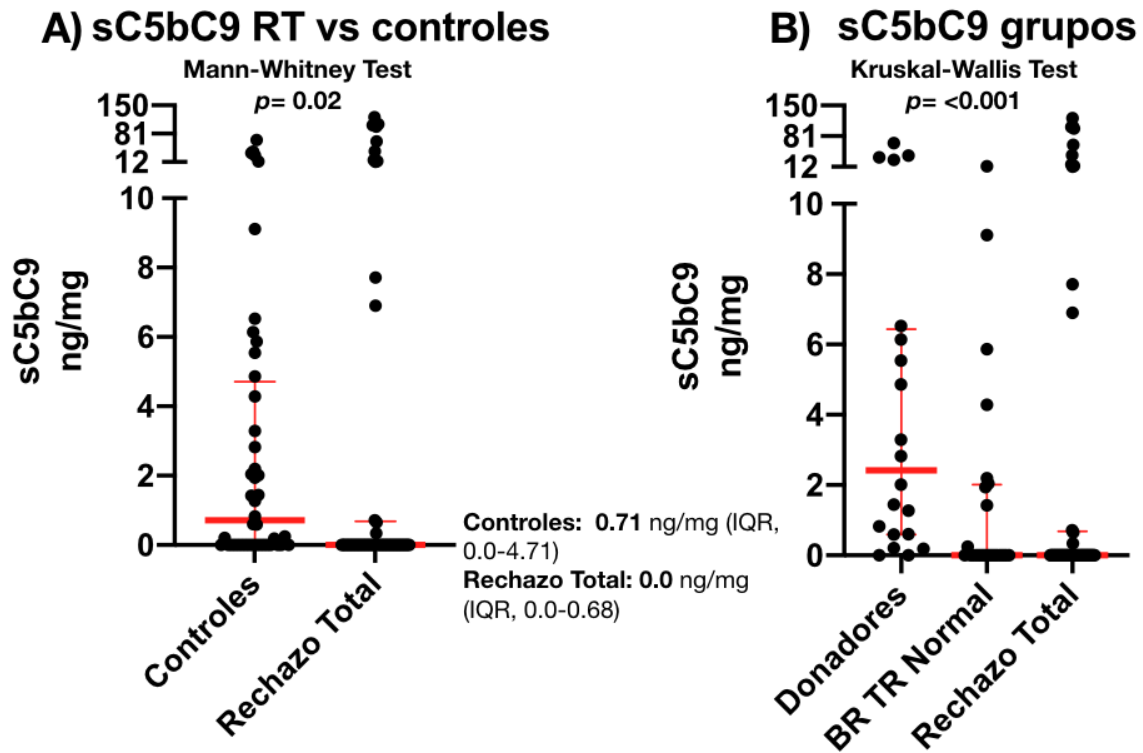


Figura 15. Comparación de niveles urinarios de sVCAM por prueba de Kruskal-Wallis entre diferentes grupos de rechazo

**sC5bC9:**

Contrario a lo esperado, se encontró menor concentración urinaria de sC5bC9 en el grupo de pacientes con rechazo (*figura 16-A*) y cuando separamos los donadores sanos de los controles con biopsia de injerto normal, se observa mayores niveles en el grupo de donadores de riñón comparada con los otros dos grupos, 2.41 (IQR, 0.59-6.43) ng/mg versus 0.0 (IQR, 0.0-2.01) ng/mg y 0.0 (IQR, 0.0-0.68) ng/mg, respectivamente. Ver *figura 16-B*.



**Figura 16.** sC5bC9 urinario. A) Grupo control (donadores mas grupo de biopsia normal) comparado con grupo Rechazo total. B) Comparación entre grupo donadores, biopsia injerto normal y grupo con Rechazo total.

En el análisis por grupos, el grupo de donadores sanos presentó niveles más elevados de sC5bC9 urinario, sin diferencia entre los otros grupos como se muestra en la **Tabla 7 y Figura 17**.

	Donadores n=20	BR TR normal n=24	Rechazo Total n=49	RMA n=36	RCMA n=3	RMCT n=4	R.Mixtos n=6	AL puros n= 18	G1 n=10	Glomerulopatías n= 21
sC5bC9 ng/mg	2.41 (0.59-6.43)	0.00 (0.0-1.96)	0.00 (0.0-0.65)	0.00 (0.0-7.10)	0.00 (0.0-6.04)	0.00 (0.0-0.0)	0.00 (0.0-0.0)	0.00 ( 0.0-1.19)	0.00 (0.0-0.0)	0.00 (0.0-0.0)

**Tabla 7.** Comparación de niveles urinarios de la molécula sC5bC9 entre los diferentes grupos de diagnóstico en las biopsias de injerto. Se muestran sus valores y rangos intercuartílicos (IQR).

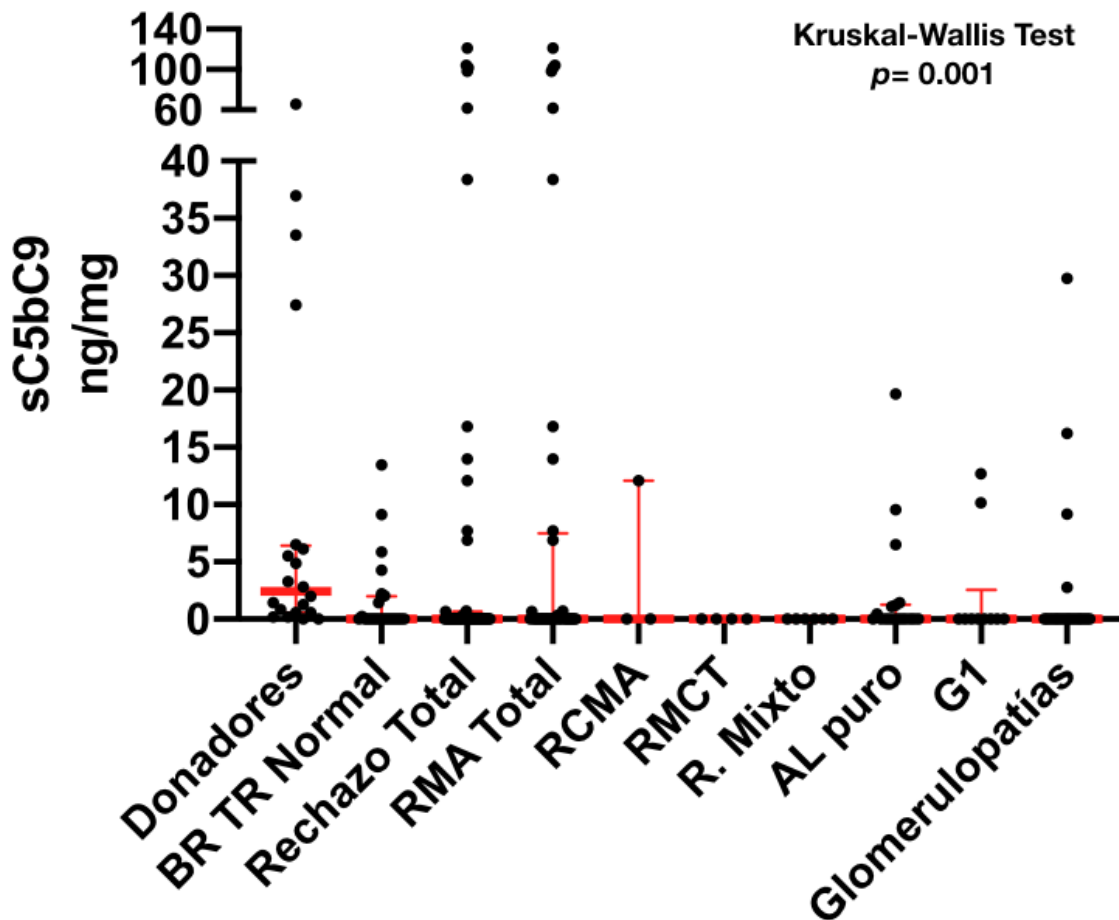


Figura 17. Comparación de niveles urinarios de sC5bC9 por prueba de Kruskal-Wallis entre diferentes grupos de rechazo.

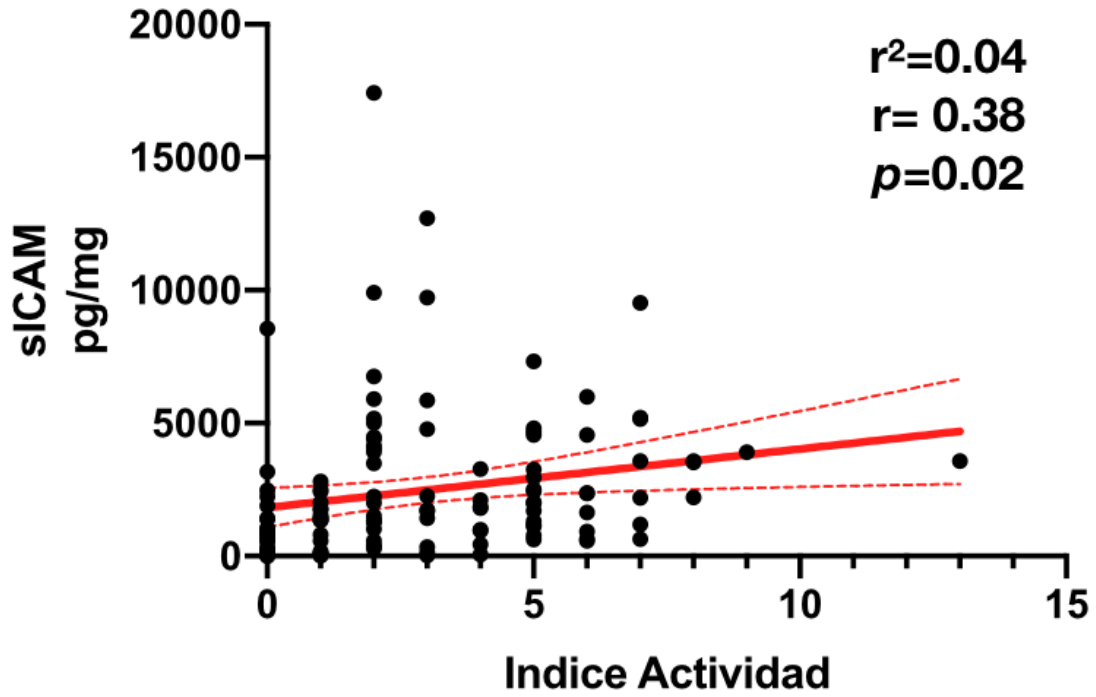
### Análisis de correlación entre índices de actividad

Se realizó análisis de correlación y regresión lineal con la concentración urinaria de cada una de las moléculas de adhesión celular (sICAM y sVCAM) y sC5bC9 con el grado de actividad en la biopsia de injerto renal.

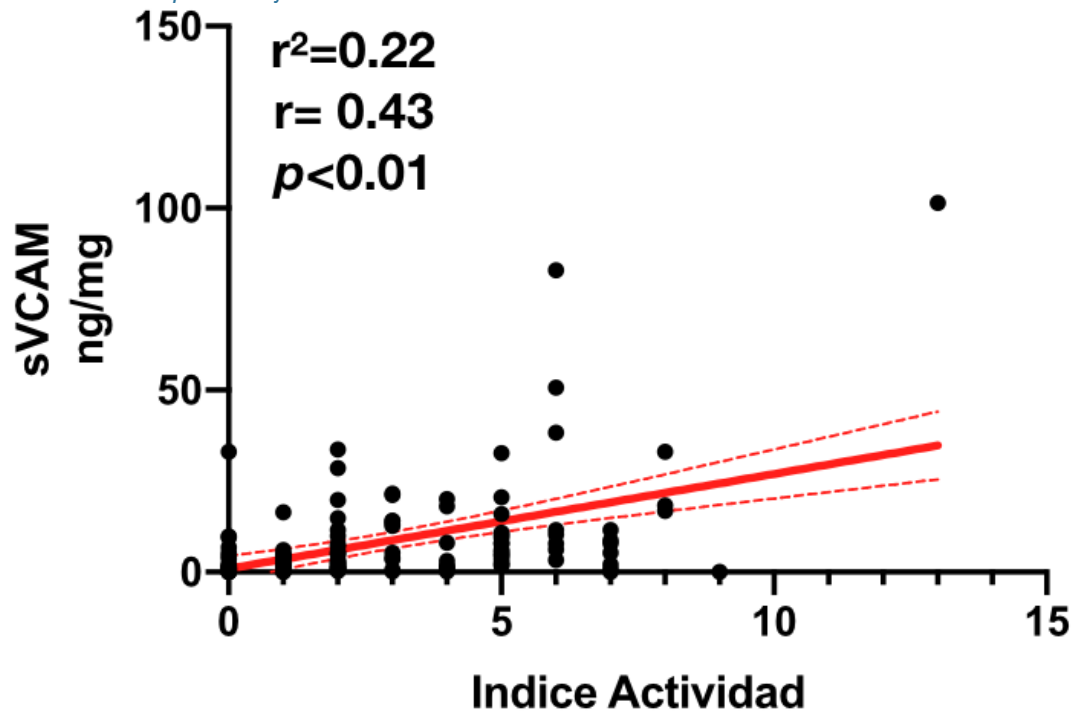
Para la molécula sICAM urinaria se obtuvo una  $r^2$  de 0.04 con  $r$  de Spearman de 0.38, con valor de  $p=0.02$ . Ver **figura 18**.

En la molécula sVCAM urinaria se obtuvo  $r^2$  de 0.22 con  $r$  de Spearman de 0.43, con valor de  $p<0.01$ . Ver **figura 19**.

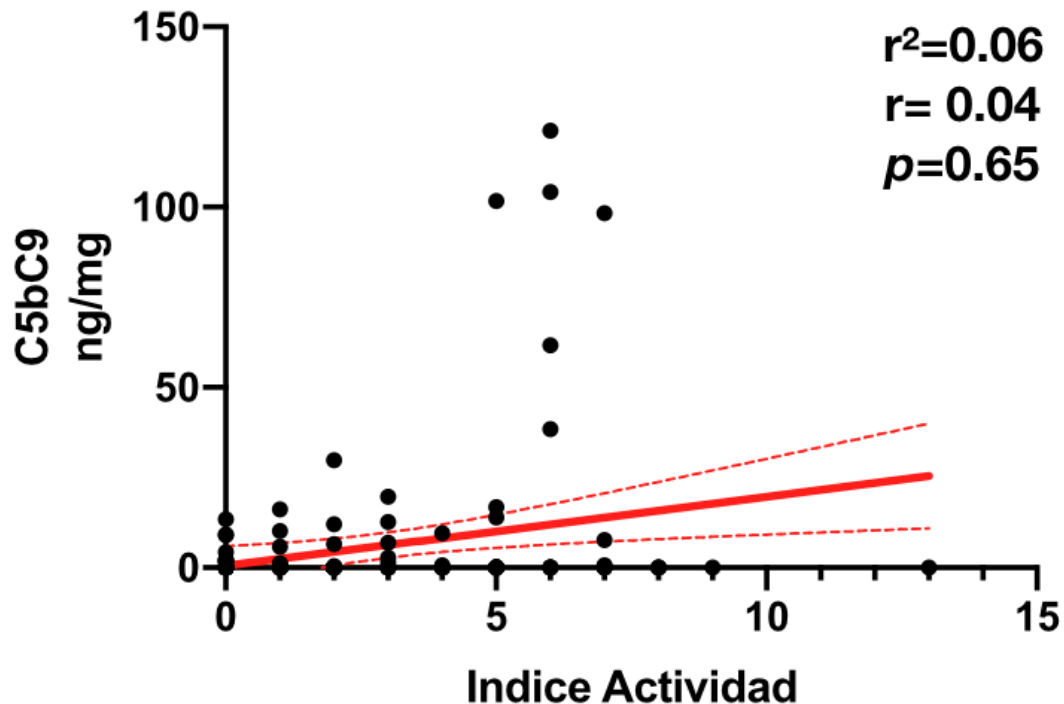
Para la molécula sC5bC9 urinaria se calculó una  $r^2$  de 0.058 con  $r$  de Spearman de 0.04, con valor de  $p=0.65$ . Ver **figura 20**.



*Figura 18. Análisis de correlación y regresión lineal entre concentración de sICAM urinaria y el índice de actividad en la biopsia de injerto renal.*



*Figura 19. Análisis de correlación y regresión lineal entre concentración de sVCAM urinaria y el índice de actividad en la biopsia de injerto renal.*

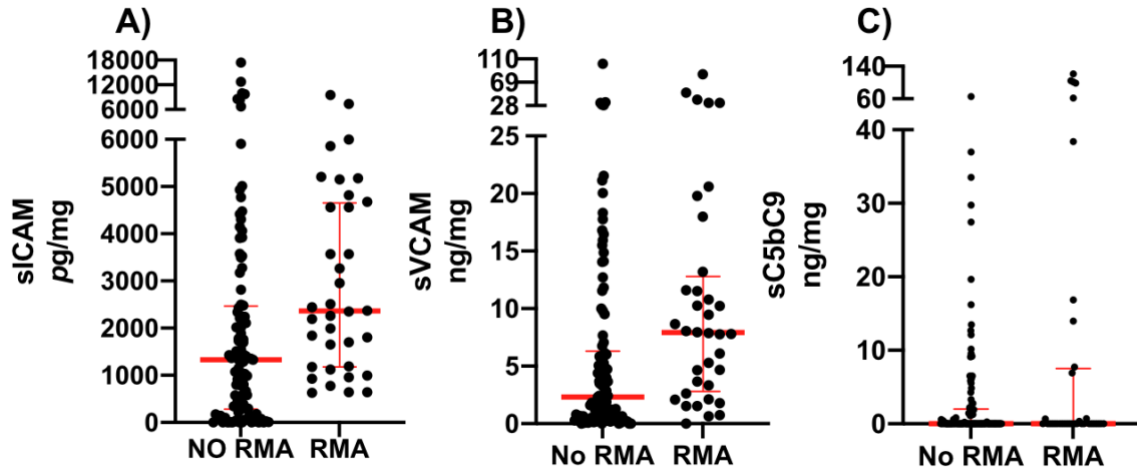


**Figura 20.** Análisis de correlación y regresión lineal entre concentración de sC5bC9 urinaria y el índice de actividad en la biopsia de injerto renal.

### Análisis de rendimiento diagnóstico de sICAM, sVCAM y sC5bC9 para rechazo mediado por anticuerpos

Para evaluar el rendimiento diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos (RMA) de cada molécula se utilizó análisis por medio de curva de característica operativa del receptor (ROC). La mediana de concentración de sICAM y sVCAM en orina fue mayor en el grupo con RMA comparado con el resto de los grupos sin rechazo mediado por anticuerpos, con diferencia estadísticamente significativa. En la molécula sC5bC9 no se encontró diferencia entre los grupos. Ver **figura 21 y tabla 8**.

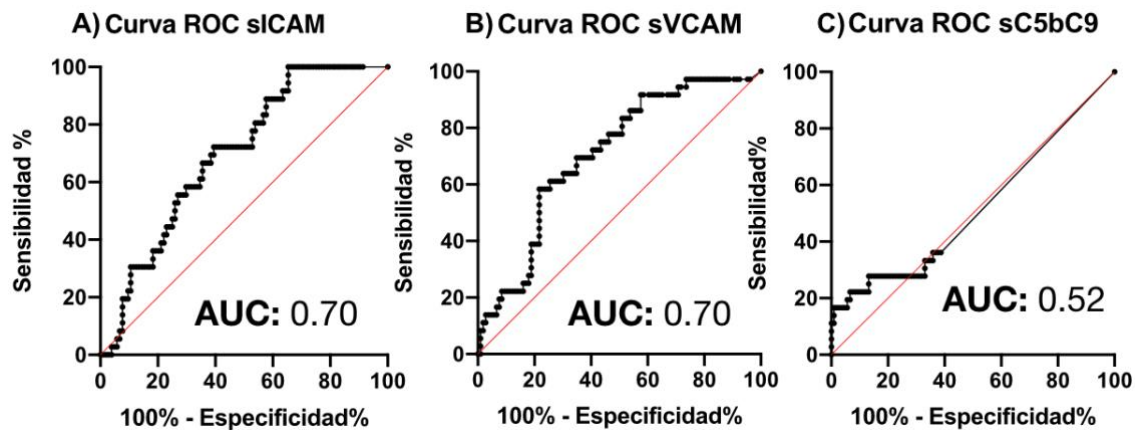
Para la molécula de sICAM se calculó un área bajo la curva de 0.70 (IC 95%, 0.60-0.78) y los mejores parámetros se obtuvieron con un punto de corte de 1599 pg/mg. Para molécula sVCAM se calculó un área bajo la curva de 0.70 (IC 95%, 0.61- 0.80) con un punto de corte de 3.66 ng/mg y sC5bC9 se calculó un área bajo la curva de 0.52 (IC 95%, 0.40-0.75) con un punto de corte de 6.71 ng/mg. El resto de la información se presenta en la **figura 22 y tabla 9**.



**Figura 21.** Comparación de niveles urinarios entre el grupo de no rechazo mediado por anticuerpos y grupo de rechazo mediado por anticuerpos. A) sICAM, B) sVCAM y C) sC5bC9. RMA: Rechazo mediado por anticuerpos.

Molécula	No Rechazo mediado por anticuerpos=106	Rechazo mediado por anticuerpos=36	Valor $p^*$
sICAM pg/mg	1331 (284-2468)	2363 (1179-4649)	$p < 0.001$
sVCAM ng/mg	2.33 (0.55-6.31)	7.91 (2.80-12.80)	$p < 0.001$
sC5bC9 ng/mg	0.0 (0.0-2.18)	0.0 (0.0-7.50)	$p = 0.31$

**Tabla 8.** Comparación de medianas y rangos intercuartílicos de cada una de las moléculas. \*Prueba de U de Mann Whitney.



**Figura 22.** Curvas de característica operativa del receptor (ROC) A) sICAM, B) sVCAM y C) sC5bC9 para diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos. AUC, área bajo la curva.

Molécula	AUC (IQR)	Punto corte	Sensibilidad (IQR)	Especificidad (IQR)	VPP (%)	VPN (%)	RVP	RVN	Prevalencia (%)
sICAM pg/mg	0.70 (0.60-0.78)	1599	72.2 (56.0-84.2)	60.6 (50.1-69.4)	38.8	86.3	1.83	0.46	25.7
sVCAM ng/mg	0.70 (0.61-0.80)	3.66	72.2 (56.0-84.1)	59.4 (49.9-68.3)	37.1	86.1	1.74	0.47	25.4
sC5bC9 ng/mg	0.52 (0.40-0.75)	6.71	27.7 (15.8-44.0)	86.8 (79.0-91.9)	45.8	67.8	1.61	0.9	34.5

**Tabla 9.** Precisión diagnóstica de sICAM, sVCAM y sC5bC9 para diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos. AUC, área bajo la curva; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RVP, razón de verosimilitud positiva; RVN, razón de verosimilitud negativa; IQR, rango intercuartílico.



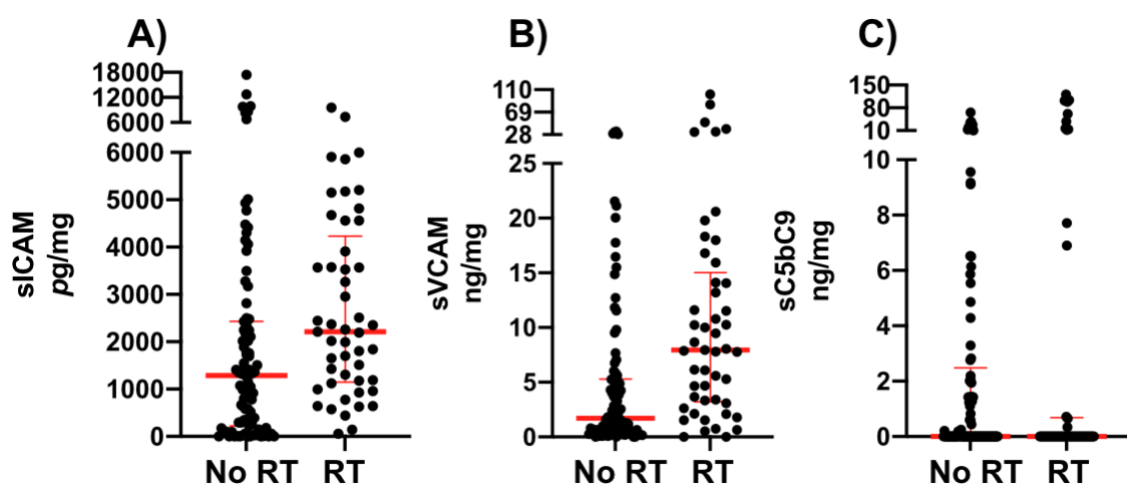


### Análisis de rendimiento diagnóstico de sICAM, sVCAM y sC5bC9 para cualquier tipo de rechazo (rechazo total)

También se realizó evaluación de rendimiento diagnóstico de las moléculas agrupando todos los tipos de rechazo (RMA, RMCT, RCMA, Rechazo mixto) en uno solo grupo denominado Rechazo total, y se analizó por medio de curva ROC.

De la misma manera se encontró mayor concentración de las moléculas sICAM y sVCAM en orina en el grupo de Rechazo total comparado con el resto de los grupos sin rechazo, con diferencia estadísticamente significativa. Para molécula sC5bC9 no se encontró diferencia entre los grupos. Ver **figura 23 y tabla 10**.

Para la molécula de sICAM se calculo un área bajo la curva de 0.67 (IC 95%, 0.58-0.76) y los mejores parámetros se obtuvieron con un punto de corte de 1419 pg/mg. Para la molécula sVCAM se calculo un área bajo la curva de 0.727 (IC 95%, 0.635-0.820) con un punto de corte de 3.66 ng/mg y para sC5bC9 se calculo un área bajo la curva de 0.45 (IC 95%, 0.38-0.56) con un punto de corte de 0.09 ng/mg, resto de los resultados se muestran en la **figura 24 y tabla 11**.



**Figura 23.** Comparación de niveles urinarios entre el grupo de no rechazo total y grupo de rechazo total. A) sICAM, B) sVCAM y C) sC5bC9. RT: Rechazo total.





Molécula	No Rechazo Total=93	Rechazo Total=49	Valor $p^*$
sICAM pg/mg	1289 (223-2431)	2213 (1148-4234)	$p < 0.001$
sVCAM ng/mg	1.70 (0.54-5.30)	7.95 (3.21-15.03)	$p < 0.001$
sC5bC9 ng/mg	0.00 (0.00-1.32)	0.00 (0.00-0.68)	$p = 0.81$

Tabla 10. Comparación de medianas y rangos intercuartílicos de cada una de las moléculas. \*Prueba de U de Mann Whitney.

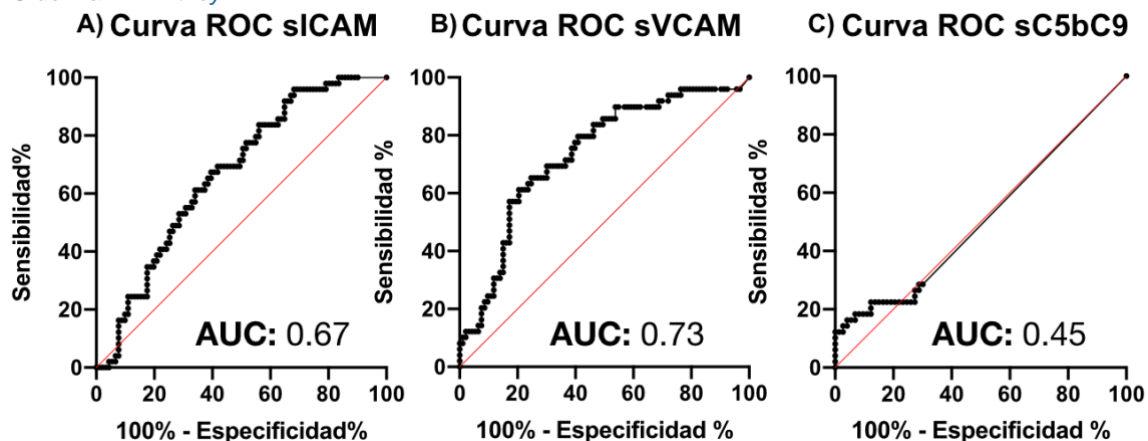


Figura 24. Curvas de característica operativa del receptor (ROC) A) sICAM, B) sVCAM y C) sC5bC9 para diagnóstico de Rechazo total. AUC, área bajo la curva.

Molécula	AUC (IQR)	Punto corte	Sensibilidad (IQR)	Especificidad (IQR)	VPP (%)	VPN (%)	RVP	RVN	Prevalencia (%)
sICAM pg/mg	0.67 (0.58-0.76)	1419	69.4 (55.5-80.5)	58.2 (48.0-67.8)	47.2	77.9	1.66	0.53	35
sVCAM ng/mg	0.73 (0.64-0.82)	2.97	77.5 (64.1-87.0)	60.2 (50.5-69.6)	50.7	83.6	1.95	0.37	34.5
sC5bC9 ng/mg	0.45 (0.38-0.56)	0.09	29.0 (17.9-42.4)	57.0 (46.8-66.5)	25.9	60.2	0.66	1.25	34.5

Tabla 11. Precisión diagnóstica de sICAM, sVCAM y sC5bC9 para diagnóstico de rechazo total. AUC, área bajo la curva; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo; RVP, razón de verosimilitud positiva; RVN, razón de verosimilitud negativa; IQR, rango intercuartílico.



## DISCUSIÓN

La enfermedad renal crónica es un problema muy grave de salud pública y el trasplante de riñón es el mejor tratamiento; sin embargo, el rechazo mediado por anticuerpos es la principal causa de pérdida del injerto. En la fisiopatología del rechazo mediado por anticuerpos, los anticuerpos pueden inducir daño al activar la cascada del complemento o a través de daño mediado celularmente al funcionar como marcaje para que los fagocitos destruyan las células endoteliales. Así, la migración de células inflamatorias (leucocitos) es un proceso elemental para el daño de este. Esta migración está orquestada por moléculas de adhesión como las integrinas (LFA-1 y VLA-4) en la superficie de los leucocitos y sus ligandos sICAM y sVCAM en la superficie de las células endoteliales. Se produce un aumento en la expresión de estas moléculas en los procesos inflamatorios como los son el rechazo del injerto y por la activación de la cascada del complemento. La migración celular de la circulación sanguínea al glomérulo y túbulo es elemental para el rechazo mediado por células; sin embargo, en el rechazo mediado por anticuerpos también se requiere de migración de células inflamatorias en el injerto para encontrarse con los anticuerpos donador específicos para poder causar lesión celular a nivel del glomérulo y endotelio vascular junto con la activación paralela de la cascada del complemento (11).

En el presente estudio proponemos como nuevos potenciales biomarcadores de diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos, así como también de cualquier tipo de rechazo a las moléculas de adhesión celular (sICAM y sVCAM) así como la molécula de la parte final de la vía del complemento sC5bC9, medidas en orina. La tasa de incidencia de rechazo del injerto de nuestro estudio fue alta (40.2%) comparado con lo previamente descrito por Mengel y cols del 12.2% (91) y de Cooper y cols del 10% a un año (92); sin embargo, una posible explicación de por qué tuvimos una prevalencia mayor de rechazo (rechazo mediado por anticuerpos en el 73% de los casos) es que nosotros incluimos tanto biopsias de protocolo como de indicación, además también se incluyeron biopsias de control post tratamiento de un episodio de rechazo. Por otro lado, la incidencia de rechazo mediado por anticuerpos en



nuestro estudio fue muy parecida lo reportado previamente por Bertrand y cols (93), el cual reportó incidencia de hasta el 40% en biopsias renales, en las cuales la indicación fue por aparición de ADES de *novo* con función del injerto conservada. En nuestro estudio las biopsias por indicación por aparición de anticuerpos donador específico (ADES) de *novo* fue en el 32% de los casos.

Actualmente existen múltiples estudios de potenciales biomarcadores para diagnóstico de rechazo, con diferentes perfiles de precisión (25,72). En este estudio demostramos que tanto los niveles urinarios de sICAM y de sVCAM se encuentra elevados tanto en el grupo de rechazo mediado por anticuerpos como en el grupo de rechazo total (rechazo mediado por anticuerpos, rechazos mixtos, rechazo mediado por células T y rechazo crónico mediado por anticuerpos) comparados con el grupo control (biopsia normal del injerto renal de pacientes trasplantados y biopsia de donadores renales). Esto concuerda con lo previamente informado por Betchel y colaboradores (86), donde encontraron una concentración urinaria de sICAM de  $7.1 \pm 0.72$  ng/dL en el grupo de rechazo agudo resistente esteroide (en la actualidad probablemente este tipo correspondería a rechazo mediado por anticuerpos) comparado con  $2.4 \pm 0.3$  ng/dL en el grupo control y  $3.1 \pm 0.77$  ng/dL en un grupo de rechazo sensible a esteroides (probablemente correspondería a un rechazo mediado por células T). A diferencia del estudio de Betchel y cols. las unidades de medición fueron distintas en nuestro estudio, los niveles urinarios de sICAM y de sVCAM fueron normalizados por creatinina urinaria, *pg/mg* y *ng/mg* respectivamente, para evitar errores por concentración en la muestra de orina.

En nuestro estudio no se encontró diferencia en la medición urinaria de sC5bC9 entre los grupos de rechazo y el grupo de biopsia normal en los pacientes trasplantados, lo mismo se reportó por Betchel y cols. Fuera del estudio previamente citado no se encontró otro mas referente a medición de sC5bC9 en orina en pacientes trasplantados, a excepción de lo reportado de Gou y cols (90) en pacientes pero con vasculitis asociada a ANCA, donde los grupos con vasculitis activa y en remisión tuvieron niveles mas elevados en orina de sC5bC9 comparada con controles. Nosotros utilizamos los mismos kits comerciales de ELISA (Quidel Corporation, San Diego, CA) de la molécula



sC5bC9 usados por Gou y cols, la única diferencia fue que la recolección de la muestra de orina se almaceno inmediatamente en un tubo con EDTA, el cual se ha descrito previamente como un método apropiado para inhibir la sobre activación de la vía final del complemento debido a la ausencia de proteínas inhibitorias en la orina y de esta manera evitar falsas lecturas elevadas de la molécula en orina (87); sin embargo, esta puede ser la razón de por que en nuestro estudio encontramos niveles tan bajos de la molécula sC5bC9 urinaria y que en muchos casos incluso no fue posible detectar la concentración de la molécula en el grupo de rechazo total, rechazo mediado por anticuerpos ni en el grupo con biopsia normal; sin embargo, la concentración urinaria en el grupo de donares renales, que se corrió posteriormente, si se logró encontrar concentraciones mas elevadas de sC5bC9, incluso mas elevada que en los grupos con rechazo y con glomerulopatías. Esto nos lleva a concluir que probablemente se trató de una falla técnica en la manipulación y/o procesamiento de las muestras. Esto es importante por que en la practica clínica rutinaria tendría una amplia variabilidad en los resultados con una dependencia muy grande del operador de las muestras. Lamentablemente los recursos asignados al protocolo de estudio fueron limitados y debido al alto costo de los kits de ELISA, fue imposible procesar de nueva cuenta la molécula sC5bC9.

En el estudio de Reinhold y cols (88) se realizó medición sVCAM urinario en pacientes trasplantados divididos en tres grupos, grupo A, 8 pacientes con rechazo mediado por células T (RMCT) en biopsia de protocolo a los 14 días, grupo B, 9 pacientes sin RMCT en la biopsia de protocolo a los 14 días pero con desarrollo de RMCT en la biopsia de control a los 2-3 meses post trasplante renal y grupo C, 18 pacientes como grupo control, en los cuales no se identificó datos de RMCT ni en la biopsia renal de protocolo a los 14 días del trasplante ni a los 2-3 meses. Los niveles urinarios de sVCAM fueron significativamente mas altos en el grupo de RMCT (grupo A) versus el grupo control (grupo C) en la biopsia renal de los 14 días, con  $p < 0.001$ . Así también los niveles en orina de sVCAM medidos a los 14 días, fueron mas elevados en el grupo B comparado contra el grupo C (grupo control), con  $p = 0.002$ , como predictor de rechazo agudo a los 2-3 meses; sin embargo, no especifican



medianas ni rangos intercuartílicos de ninguno de los grupos. Estos hallazgos también son congruentes con nuestros resultados, donde encontramos mayor elevación de sVCAM en el grupo de RMCT (8.60 ng/mg, IQR 2.44-14.56) comparado con el grupo de trasplantados renales con biopsia normal (mediana de 0.87 ng/mg, IQR 0.37 -2.16) y en los donadores renales (mediana de 0.73, IQR, 0.28-4.84). En nuestro estudio no se analizó el rendimiento diagnóstico para RMCT posterior al trasplante (en este grupo se tenía solo 4 pacientes), el objetivo principal fue evaluar el rendimiento diagnóstico para rechazo total y rechazo mediado por anticuerpos. Asumimos que también en la fisiopatología del rechazo mediado por anticuerpos se aumenta la expresión de sVCAM para facilitar la migración celular como ya expuso previamente. El rendimiento diagnóstico de la molécula sVCAM fue la mejor dentro de las 3 moléculas evaluadas con AUC de 0.69 y 0.72 con valor de corte de 3.21 y 3.66 ng/mg para diagnóstico de rechazo total y rechazo mediado por anticuerpos. Aún así comparando con Reinhold y cols donde se analizó el rendimiento diagnóstico de sVCAM para RMCT, esta molécula obtuvo en el análisis de la curva ROC un área bajo la curva (AUC) de 0.88 con valor de corte de sVCAM urinario de 0.32 ng/ml tuvo sensibilidad del 88%, especificidad del 94% y VPP del 88% para diagnóstico de RMCT en los pacientes del grupo A las 2 semanas posterior del trasplante. Para los pacientes del grupo B para el diagnóstico de RMCT 2 a 3 meses posterior del trasplante el AUC fue de 0.74, con valor de corte de 0.24 ng/mL tuvo sensibilidad de 33%, especificidad de 94% y valor predictivo positivo de 75%, lo cual apoya la probable utilidad de esta molécula como potencial biomarcador en el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos y por células. Sin embargo, el estudio tiene la limitante de un número pequeño de pacientes (solo 8 en el grupo A y 9 en el grupo B) por lo que es muy difícil concluir en la funcionalidad de la molécula.

Si bien el rendimiento diagnóstico para rechazo mediado por anticuerpos encontrado en el presente estudio es moderado, con un área bajo la curva para sVCAM y sICAM de 0.70 con sensibilidad de 72.2% para ambas moléculas y valores predictivos negativos de 86.1% y 86.3% respectivamente, es muy parecido a lo ya descrito para otras moléculas urinarias utilizadas en el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos, como lo mostrado por



Mertens y cols recientemente (94), donde evaluaron un perfil de 10 diferentes proteínas urinarias asociadas a su aumento de expresión génica en eventos inflamatorios como un rechazo mediado por anticuerpos (A1BG,AFM, SERPINAA1,SERPINACN1, etc). En la cohorte de validación obtuvieron un rendimiento diagnóstico con área bajo la curva (AUC) de 0.88, sensibilidad de 95%, especificidad de 76%, valor predictivo positivo del 33% y valor predictivo negativo del 99%.

Una ventaja adicional en el presente estudio fue que también se analizó el rendimiento diagnóstico de las moléculas agrupando todos los tipos de rechazo en un grupo llamado rechazo total y se comparo contra el resto de las glomerulopatías inflamatorias sin rechazo. En este análisis se encontró también un adecuado rendimiento para la molécula sVCAM con AUC de 0.73, sensibilidad de 77.5%, y valor predictivo negativo del 83.6% y un poco mas modesto para sICAM con AUC de 0.67, sensibilidad de 69.4%, y valor predictivo negativo del 77.9%. Estos resultados también correlacionan con lo previamente publicado por Bloom y cols (94), donde se midió DNA libre celular del donador (dd-cfDNA) en el suero de pacientes con episodios con rechazo. El rendimiento diagnóstico con un punto de corte de 1% de dd-cfDNA fue de un AUC de 0.74, sensibilidad de 85%, especificidad de 59%, valor predictivo positivo de 84% y valor predictivo negativo de 60%, muy parecido la precisión diagnóstica obtenida en nuestro estudio. En este mismo estudio se evaluó el dd-cfDNA para distinguir entre rechazo mediado por anticuerpos con el mismo punto de corte, obteniendo una AUC de 0.87, sensibilidad de 83%, valor predictivo positivo del 96% y valor predictivo negativo del 44%, que contrasta los resultados de nuestro estudio donde nuestro valor predictivo negativo es mas alto (VPN de sVCAM de 86.1% y VPN de sICAM de 86.3%) y nuestro valor predictivo positivo mas bajo (VPP de sVCAM de 37.1% y VPN de sICAM de 38.8%), lo que demuestra que tanto sVCAM y sICAM pudieran tener un papel mas importante al estar ausentes mas que cuando estén presentes al momento del diagnóstico de un episodio de rechazo. Esto es muy útil en el momento de decidir cuando realizar una biopsia del injerto por sospecha de rechazo y el paciente tiene contraindicaciones para la misma, un valor negativo





del biomarcador podría indicarnos que es poco probable que este cursando con un episodio de rechazo.

Una fortaleza del estudio fue que en todos los pacientes se obtuvo la información del puntaje de Banff 2017. Con esta información se calculó un índice de actividad con cada una de las variables de la inflamación de la microvasculatura y se realizó un análisis de correlación y de regresión lineal con los niveles de concentración urinaria con cada una de las moléculas de adhesión celular y la molécula sC5bC9 del complemento. Tanto para sICAM y sVCAM se encontró una correlación moderada con significancia estadística, lo que apoya nuestra hipótesis de que estas moléculas se elevan más entre mayor es la inflamación de la microvasculatura, como lo es en el caso de un episodio de rechazo y particularmente en un episodio de rechazo mediado por anticuerpos. Existen múltiples estudios de correlación entre moléculas y su asociación con fibrosis, atrofia tubular y pronóstico a largo plazo en pacientes con rechazo (96). Hasta nuestro conocimiento este es el primer estudio donde se correlaciona los niveles de concentración urinaria (sICAM, sVCAM y sC5bC9) y el índice de actividad en la biopsia del injerto.

Otra fortaleza del estudio es que la evaluación del rendimiento diagnóstico de cada una de las moléculas se llevo a cabo contra grupos de patologías con un componente inflamatorio muy importante, como lo es por ejemplo en el grupo de glomerulopatías, el paciente que mayor concentración del biomarcador sICAM (17,433  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) fue con el diagnóstico histológico de nefritis lúpica, el cual se sabe que tiene un componente inflamatorio muy importante. Esta patología se conoce por elevación muy importante de otros biomarcadores urinarios (moléculas del complemento) como son C1q, MLB, C3a, Bb, s C5bC9 y más recientemente descrita la molécula sCD163 de los macrófagos M2 (89,96). Esto permite retar de manera muy consistente a los biomarcadores, y a diferencia de otros estudios previamente citados (95), donde la comparación solo es contra un grupo sin rechazo sin incluir glomerulopatías, lo que baja el rendimiento diagnóstico de las moléculas en mundo real, debido a que las glomerulopatías son una causa muy importante de elevación de moléculas inflamatorias, como se observa en la **tabla 12** donde muestran los 10



diagnósticos histológicos con mayor concentración de cada una de las moléculas estudiadas.

Ranking	Diagnóstico	sICAM pg/mg	Diagnóstico	sVCAM ng/mg	Diagnóstico	sC5bC9 ng/mg
1	NLES	17433	R.Mixto	101.4	RMA	121.2
2	AL	12703	RMA	82.9	RMA	104.1
3	NTI	9913	RMA	50.7	RMA	101.7
4	G1	9731	RMA	38.36	RMA	98.3
5	RMA	9525	NLES	33.6	Donador	65.5
6	NIgA	8566	RMA	33.1	RMA	61.7
7	Donador	8327	NIgA	33.1	RMA	38.40
8	RMA	7327	RMA	32.7	Donador	36.9
9	Amiloidosis	6760	Donador	29.9	Donador	33.5
10	RMA	5997	NTI	28.7	NTI	29.7

*Tabla 12. Ranking de diagnósticos histológicos de concentración urinaria de las moléculas sICAM, sVCAM y sC5bC9 en orina. NLES, nefritis lúpica; AL, alteraciones limítrofes; NTI, nefritis túbulo intersticial; G1, glomerulitis grado 1; RMA rechazo mediado por anticuerpos; NIgA, nefropatía por IgA.*

En el presente estudio no se puede analizar de manera confiable la utilidad de las moléculas para distinguir entre otros grupos de rechazo, por ejemplo, rechazo mediados por células T, debido a la n tan pequeña, solo 4/122 pacientes (3.2%). Como era de esperar y con la inmunosupresión actual, cada vez es mas raro encontrar rechazos mediados por células T (98).





## **LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN**

### **Fortalezas**

- Población cautiva del servicio de trasplante del Instituto
- Diagnóstico por biopsia renal de todos los rechazos
- Comparación contra múltiples patologías inflamatorias

### **Limitaciones**

- Población pequeña en los grupos de rechazo mediado por células T, rechazo crónico mediado por anticuerpos y rechazo mixto que no permiten comparación entre ellos ni sacar conclusiones
- Estudio transversal, no contamos aún con seguimiento longitudinal para observar si se modifican las concentraciones de los marcadores en orina con el tratamiento de los episodios de rechazo



## **CONCLUSIONES**

Los pacientes con rechazo del injerto (incluyendo rechazo mediado por anticuerpos) tienen niveles elevados sICAM y sVCAM en orina; sin embargo, ambas moléculas tienen un rendimiento diagnóstico moderado.

En el presente estudio no se encontró utilidad de molécula sC5bC9 en orina para diagnóstico de rechazo en los pacientes con trasplante renal.



## ANEXO

Análisis Estadístico. Variables		
Variable	Definición	Tipo de variable
sICAM	Molécula de adhesión celular implicada en la activación, rodamiento y migración de leucocitos y monocitos a nivel vascular en un proceso inflamatorio que se puede encontrar en orina Medición por medio de ELISA en orina	Continua expresada pg/mg
sVCAM	Molécula de adhesión celular implicada en la activación, rodamiento y migración de leucocitos y monocitos a nivel vascular en un proceso inflamatorio que se puede encontrar en orina Medición por medio de ELISA en orina	Continua expresada ng/mg
sC5bC9/Cr	Vía final común de activación de cascada de complemento, que en conjunto forma el complejo ataque membrana que provoca lisis celular endotelial que se puede encontrar en orina Medición por medio de ELISA en orina	Continua expresada ng/mg
Cr urinaria	Compuesto orgánico generado del metabolismo de la creatina, de fuente de tejido muscular, se produce a una tasa constante, se filtran libremente por los glomérulos y se excreta a través de la orina Medición en orina	Continua expresada mg/dL
Rechazo agudo medido por anticuerpos (RAMA)	Rechazo agudo que requiere para diagnóstico evidencia morfológica de daño tisular agudo (glomerulitis, capilaritis), anticuerpos circulantes específicos del donante y evidencia inmunológica de un proceso mediado por anticuerpos (como la deposición de C4d en el aloinjerto) definido por consenso de Banff 2017	Dicotómica 1)Si 2)No

Tabla 12. Definición de las variables y su método de medición.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Johansen K, et al. 'United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2012 Jan;59(1 Suppl 1):A7, e1-420.
2. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Ishani A, et al. US Renal Data System 2013 Annual Data Report. American Journal of Kidney Diseases. 2014 Jan;63(1):A7.
3. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet (London, England). 2013 Jul 20;382(9888):260–72.
4. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. Lancet (London, England). 2015 May 16;385(9981):1975–82.
5. Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2005 Dec 1;20(12):2587–93.
6. Cueto-Manzano AM, Rojas-Campos E. Status of renal replacement therapy and peritoneal dialysis in Mexico. Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis. 2007;27(2):142–8.
7. Méndez-Durán A, Francisco Méndez-Bueno J, Tapia-Yáñez T, Montes AM, Aguilar-Sánchez L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. Diálisis y Trasplante. 2010 Jan;31(1):7–11.
8. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. The New England journal of medicine. 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
9. Valdez-Ortiz R, Navarro-Reynoso F, Olvera-Soto MG, Martín-Alemañy G, Rodríguez-Matías A, Hernández-Arciniega CR, et al. Mortality in Patients With Chronic Renal Disease Without Health Insurance in Mexico: Opportunities for a National Renal Health Policy. Kidney international reports. 2018 Sep;3(5):1171–82.
10. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2017 Jan;17 Suppl 1:21–116.
11. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. Ingelfinger JR, editor. The New England journal of medicine. 2018 Sep 20;379(12):1150–60.
12. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. American journal of transplantation :



- official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2011 Mar;11(3):450–62.
13. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004 Aug;4(8):1289–95.
  14. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 Feb;12(2):388–99.
  15. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 May;12(5):1157–67.
  16. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009 Mar;9(3):527–35.
  17. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014 Feb;14(2):255–71.
  18. Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018 Jan;18 Suppl 3:3–17.
  19. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010 Aug 1;21(8):1398–406.
  20. Orandi BJ, Chow EHK, Hsu A, Gupta N, Van Arendonk KJ, Garonzik-Wang JM, et al. Quantifying renal allograft loss following early antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015 Feb;15(2):489–98.
  21. Farkash EA, Colvin RB. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nature reviews Nephrology*. 2012 Mar 27;8(5):255–7.
  22. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Current opinion in organ transplantation*. 2010 Feb;15(1):42–8.
  23. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of*



- Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2010 Aug 15;10(8):1812–22.
24. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nature reviews Nephrology*. 2016 Sep 27;12(9):534–48.
  25. Dorr CR, Oetting WS, Jacobson PA, Israni AK. Genetics of acute rejection after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2018 Mar;31(3):263–77.
  26. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular research*. 2015 Aug 1;107(3):331–9.
  27. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007 Sep 1;7(9):678–89.
  28. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology*. 2013 May 1;190(9):4451–7.
  29. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biology*. 2007;8(5):215.
  30. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology*. 2008 Sep 1;9(9):949–52.
  31. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2018 Oct 2;9:2171.
  32. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature reviews Immunology*. 2015 Nov 16;15(11):692–704.
  33. Hogg N, Patzak I, Willenbrock F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature reviews Immunology*. 2011 Jun;11(6):416–26.
  34. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular research*. 2015 Aug 1;107(3):331–9.
  35. Shen A-R, Zhong X, Tang T-T, Wang C, Jing J, Liu B-C, et al. Integrin, Exosome and Kidney Disease. *Frontiers in physiology*. 2020;11:627800.
  36. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425–34.
  37. Etzioni A. Adhesion molecules--their role in health and disease. *Pediatric research*. 1996 Feb;39(2):191–8.
  38. Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nature Immunology*. 2008 Sep 1;9(9):981–7.
  39. Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K, et al. Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation*. 1993 Mar;55(3):610–5.
  40. Moolenaar W, Bruijn JA, Schrama E, Ferrone S, Daha MR, Zwinderman AH, et al. T-cell receptors and ICAM-1 expression in renal allografts during rejection. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1991 Sep;4(3):140–5.
  41. Mampaso F, Sanchez-Madrid F, Marcen R, Molina A, Pascual J, Bricio T, et al. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*. 1993 Sep;56(3):687–91.
  42. Ricklin D, Mastellos DC, Reis ES, Lambris JD. The renaissance of complement therapeutics. *Nature reviews Nephrology*. 2018 Jan 4;14(1):26–47.



43. Farrar CA, Zhou W, Sacks SH. Role of the lectin complement pathway in kidney transplantation. *Immunobiology*. 2016 Oct;221(10):1068–72.
44. Nauser CL, Farrar CA, Sacks SH. Complement Recognition Pathways in Renal Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017 Sep;28(9):2571–8.
45. Böhmig GA, Wahrmann M, Eskandary F, Rostaing L. Novel Approaches to Block Complement. *Transplantation*. 2018 Nov;102(11):1837–43.
46. Gaarkeuken H, Siezenga MA, Zuidwijk K, van Kooten C, Rabelink TJ, Daha MR, et al. Complement activation by tubular cells is mediated by properdin binding. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008 Nov;295(5):F1397-403.
47. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clinical and experimental immunology*. 1991 Dec;86(3):464–70.
48. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature reviews Nephrology*. 2012 Nov 2;8(11):670–8.
49. Schaub S, Hönger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation*. 2014 Aug 27;98(4):387–93.
50. Wiebe C, Gareau AJ, Pochinco D, Gibson IW, Ho J, Birk PE, et al. Evaluation of C1q Status and Titer of De Novo Donor-Specific Antibodies as Predictors of Allograft Survival. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017 Mar;17(3):703–11.
51. Stites E, Le Quintrec M, Thurman JM. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2015 Dec 15;195(12):5525–31.
52. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016 Jan 1;27(1):293–304.
53. Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *Journal of transplantation*. 2012;2012:193724.
54. Furness PN, Taub N, Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney international*. 2001 Nov;60(5):1998–2012.
55. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney international*. 1993 Aug;44(2):411–22.
56. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1997 Dec;8(12):1930–41.





57. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney international*. 1999 Feb;55(2):713–23.
58. Mueller A, Schnuelle P, Waldherr R, van der Woude FJ. Impact of the Banff '97 classification for histological diagnosis of rejection on clinical outcome and renal function parameters after kidney transplantation. *Transplantation*. 2000 Mar 27;69(6):1123–7.
59. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007 Mar;7(3):518–26.
60. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008 Apr;8(4):753–60.
61. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 Mar;12(3):563–70.
62. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014 Feb;14(2):272–83.
63. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2018 Feb;18(2):293–307.
64. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018 Nov;102(11):1795–814.
65. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002 Mar;13(3):779–87.
66. Matas AJ, Gaston RS. Moving Beyond Minimization Trials in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015 Dec 1;26(12):2898–901.
67. Lo DJ, Kaplan B, Kirk AD. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nature reviews Nephrology*. 2014 Apr 21;10(4):215–25.
68. Anglicheau D, Suthanthiran M. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation*. 2008 Jul 27;86(2):192–9.





69. Naesens M, Sarwal MM. Molecular diagnostics in transplantation. *Nature Reviews Nephrology*. 2010 Oct 24;6(10):614–28.
70. Perkins D, Verma M, Park KJ. Advances of genomic science and systems biology in renal transplantation: a review. *Seminars in immunopathology*. 2011 Mar 14;33(2):211–8.
71. Traitanon O, Poggio ED, Fairchild RL. Molecular monitoring of alloimmune-mediated injury in kidney transplant patients. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2014 Nov;23(6):625–30.
72. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, Gwinner W, Marquet P. Establishing Biomarkers in Transplant Medicine: A Critical Review of Current Approaches. *Transplantation*. 2016 Oct;100(10):2024–38.
73. Salvadori M, Tsalouchos A. Biomarkers in renal transplantation: An updated review. *World journal of transplantation*. 2017 Jun 24;7(3):161–78.
74. Safa K, Magee CN, Azzi J. A critical review of biomarkers in kidney transplantation. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2017 Nov;26(6):509–15.
75. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Sharma VK, Schwartz JE, et al. Urinary cell mRNA profiles predictive of human kidney allograft status. *Immunological reviews*. 2014 Mar;258(1):218–40.
76. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *The New England journal of medicine*. 2001 Mar 29;344(13):947–54.
77. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *The New England journal of medicine*. 2013 Jul 4;369(1):20–31.
78. Amrouche L, Rabant M, Anglicheau D. MicroRNAs as biomarkers of graft outcome. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2014 Jul;28(3):111–8.
79. Scian MJ, Maluf DG, David KG, Archer KJ, Suh JL, Wolen AR, et al. MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011 Oct;11(10):2110–22.
80. Maluf DG, Dumur CI, Suh JL, Scian MJ, King AL, Cathro H, et al. The urine microRNA profile may help monitor post-transplant renal graft function. *Kidney international*. 2014 Feb;85(2):439–49.
81. Hirt-Minkowski P, De Serres SA, Ho J. Developing renal allograft surveillance strategies - urinary biomarkers of cellular rejection. *Canadian journal of kidney health and disease*. 2015 Aug 18;2:28.
82. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013 Oct;13(10):2634–44.
83. Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, Aulagnon F, Benon A, Sauvaget V, et al. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Independently Improves the Noninvasive Diagnosis of Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015 Nov 1;26(11):2840–51.



84. Gwinner W, Metzger J, Husi H, Marx D. Proteomics for rejection diagnosis in renal transplant patients: Where are we now? *World journal of transplantation*. 2016 Mar 24;6(1):28–41.
85. Quintana LF, Solé-Gonzalez A, Kalko SG, Bañon-Maneus E, Solé M, Diekmann F, et al. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009 Feb 28;20(2):428–35.
86. Bechtel U, Scheuer R, Landgraf R, König A, Feucht HE. Assessment of soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, sELAM-1) and complement cleavage products (sC4d, sC5b-9) in urine. Clinical monitoring of renal allograft recipients. *Transplantation*. 1994 Oct 27;58(8):905–11.
87. van der Pol P, de Vries DK, van Gijlswijk DJ, van Anken GE, Schlagwein N, Daha MR, et al. Pitfalls in urinary complement measurements. *Transplant immunology*. 2012 Aug;27(1):55–8.
88. Reinhold SW, Straub RH, Krüger B, Kaess B, Bergler T, Weingart C, et al. Elevated urinary sVCAM-1, IL6, sIL6R and TNFR1 concentrations indicate acute kidney transplant rejection in the first 2 weeks after transplantation. *Cytokine*. 2012 Mar;57(3):379–88.
89. Marrugat J, Vila J, Pavesi M, Sanz F. [Estimation of the sample size in clinical and epidemiological investigations]. *Medicina clinica [Internet]*. 1998 Sep 12 [cited 2018 Dec 18];111(7):267–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789243>
90. Gou S-J, Yuan J, Wang C, Zhao M-H, Chen M. Alternative complement pathway activation products in urine and kidneys of patients with ANCA-associated GN. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2013 Nov 7;8(11):1884–91.
91. Mengel M, Bogers J, Bosmans J-L, Serón D, Moreso F, Carrera M, et al. Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allografts: results from a multicenter trial. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005 May;5(5):1050–6.
92. Cooper JE. Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15(3):430–8.
93. Bertrand D, Gatault P, Jauréguy M, Garrouste C, Sayegh J, Bouvier N, et al. Protocol Biopsies in Patients with Subclinical De Novo DSA After Kidney Transplantation: a multicentric study. *Transplantation*. 2019 Nov 26;1.
94. Mertens I, Willems H, van Loon E, Schildermans K, Boonen K, Baggerman G, et al. Urinary Protein Biomarker Panel for the Diagnosis of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Kidney international reports*. 2020 Sep;5(9):1448–58.
95. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017 Jul;28(7):2221–32.
96. Costa JS, Alves R, Sousa V, Marinho C, Romãozinho C, Santos L, et al. Fibrogenesis in Kidney Transplant: Dysfunction Progress Biomarkers. *Transplantation proceedings*. 2017 May;49(4):787–91.
97. Mejia-Vilet JM, Zhang XL, Cruz C, Cano-Verduzco ML, Shapiro JP, Nagaraja HN, et al. Urinary Soluble CD163: a Novel Noninvasive Biomarker of Activity



- for Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN. 2020;31(6):1335–47.
98. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17 Suppl 1(Suppl 1):21–116.