



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe de Proyecto: miRNAs como biomarcadores de rechazo agudo mediado por anticuerpos en pacientes con trasplante renal

Miguel Angel Vázquez Toledo

Matrícula: 2183067952

Asesor Interno: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Asesor Externo: Dr. Fausto Sanchez Muñoz

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Periodo: 6 de Febrero de 2023 al 7 de Agosto de 2023

1. Introducción

La enfermedad renal crónica (ERC) es uno de los principales desafíos de salud global y es un factor de riesgo independiente para enfermedad cardiovascular (ECV), además de aumentar el riesgo de mortalidad prematura y disminuir la calidad de vida en cada etapa de la enfermedad (Hill, et al., 2021). A nivel global, se estima que la prevalencia de la ERC oscila entre el 11 y el 13 % con la mayoría en etapa 3, calculándose que entre 4,902 y 7,083 millones desarrollaran enfermedad renal en etapa terminal (ERT) y requerimiento de terapia de reemplazo renal (TRR). Debido a la asociación entre ERC y riesgo cardiovascular, dicha enfermedad impacta directamente en la carga global de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Instituto Mexicano del Seguro Social (2019) En México, se han reportado altas tasas de incidencia y prevalencia de ERC, junto con desigualdades en el acceso a la terapia de reemplazo renal (TRR) para pacientes que se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad (González-Espinoza L., *et al* 2020).

El trasplante renal es el tratamiento más exitoso para la ERC irreversible, pero enfrenta desafíos como el rechazo inmunológico y la disponibilidad de órganos, entre los principales tipos de rechazo está el rechazo agudo (RA), el celular y el mediado por anticuerpos (RAMA) y el más común (Carrillo, M. V. C., & de León, J. C. B. 2022). Para diagnosticar el rechazo, se requiere una biopsia de injerto renal, no obstante, esta técnica procedimiento invasivo que predispone a un riesgo significativo de complicaciones y está limitado por el error de muestreo y la variabilidad entre observadores. Motivo por el cual se buscan nuevos métodos diagnósticos no invasivos para el diagnóstico del rechazo agudo mediado por anticuerpos (RAMA) (Olivares-del Moral, J. I., 2022).

Los miARN (microARN) son pequeñas moléculas de ARN (ácido ribonucleico) no codificante que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Los miARN desempeñan un papel crucial en una variedad de procesos biológicos, incluida la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis (muerte celular programada), el desarrollo embrionario y la respuesta inmunológica. Además, se ha demostrado que los miARN están implicados en diversas enfermedades, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades renales, entre otras (Çakmak, H. A., et al., 2020). Recientes estudios han evaluado el papel de los miRNAs como biomarcadores para diagnosticar el rechazo inmunológico (Roshanravan, H., et al., 2020). desarrollo un estudio donde se evalúa la concentración de diferentes miRNAs en sangre periférica, observando una disminución significativa en la concentración del miRNA 150-5p y un aumento de MBD6 cuya desregulación podría tener consecuencias clínicas.

Motivo por el cual el objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión de los miRNAs 1, 21, 126, 155 y 150 en plasma de pacientes receptores de trasplante renal con y sin rechazo mediado por anticuerpos para evaluar su utilidad clínica y correlación con hallazgos histológicos.

2. Marco Teórico

2.1 Enfermedad renal crónica (ERC)

La enfermedad renal crónica (ERC) es una condición en la que los riñones disminuyen progresiva y permanente su función en el tiempo. Se caracteriza por la pérdida gradual de la capacidad de los riñones para filtrar los desechos y el exceso de líquidos de

la sangre, lo que lleva a la acumulación de toxinas y líquidos en el cuerpo (Castro Cevallos, J. Y. 2023).

La ERC se clasifica en diferentes etapas, desde la etapa 1 (leve) hasta la etapa 5 (enfermedad renal en etapa terminal o ERT), Cada etapa se caracteriza por el grado de deterioro de la función renal. A continuación, se detallan las etapas de la ERC:

- Etapa 1: En esta etapa, la función renal está ligeramente disminuida, pero los riñones aún son capaces de filtrar los desechos y mantener el equilibrio hídrico y de electrolitos en el cuerpo. No hay síntomas evidentes en esta etapa, y la enfermedad a menudo se detecta mediante pruebas de laboratorio (National Kidney Foundation 2020).
- Etapa 2: La función renal continúa disminuyendo, pero aún se mantiene dentro de un rango moderado. Puede haber una ligera elevación en los niveles de creatinina en sangre y otros marcadores de función renal. Al igual que en la etapa 1, es posible que no se presenten síntomas notorios en esta etapa (National Kidney Foundation 2020).
- Etapa 3: En esta etapa, la función renal se reduce aún más, y los síntomas pueden comenzar a manifestarse. Pueden aparecer signos de daño renal, como retención de líquidos, hipertensión arterial, desequilibrios electrolíticos y cambios en la frecuencia urinaria (National Kidney Foundation 2020).
- Etapa 4: La función renal se encuentra en un estado avanzado de deterioro en esta etapa. Los síntomas se vuelven más pronunciados, y es posible que se requiera la intervención médica para controlar la progresión de la enfermedad y prevenir complicaciones. La terapia de reemplazo renal se vuelve una consideración importante en esta etapa (National Kidney Foundation 2020).
- Etapa 5 (ERT): En esta etapa, los riñones están significativamente dañados y no pueden cumplir adecuadamente sus funciones. Los síntomas son más graves y pueden incluir fatiga extrema, retención de líquidos, niveles anormales de electrolitos en sangre y complicaciones relacionadas con la disfunción renal. La terapia de reemplazo renal, como la diálisis o el trasplante renal, se vuelve necesaria para mantener la vida (National Kidney Foundation 2020).

2.2 Terapia de trasplante renal (TRR)

La terapia de trasplante renal, también llamada trasplante de riñón, es un procedimiento quirúrgico en el que un riñón sano y funcional se trasplanta de un donante a un receptor con enfermedad renal terminal (ERT). Es considerada una opción de tratamiento preferida para pacientes con ERT, ya que puede mejorar significativamente su calidad de vida y supervivencia en comparación con la diálisis (Hart *et al.*, 2020).

Sin embargo, es importante destacar que el trasplante renal no es una cura definitiva para la enfermedad renal crónica. Después del trasplante, el receptor requerirá tomar medicamentos inmunosupresores de por vida para prevenir el rechazo del órgano trasplantado por parte del sistema inmunológico, sin embargo, el rechazo sigue siendo una de las principales causas de la pérdida del injerto (Gaber *et al.*, 2020)

2.3 Rechazo de trasplante renal

El rechazo inmunológico de un trasplante renal es una respuesta del sistema inmunológico del receptor que reconoce y ataca al riñón trasplantado como un tejido

extraño. Esta reacción puede ocurrir a pesar de los esfuerzos para compatibilizar el donante y el receptor (De Pasquale, *et al.*, 2020)

Existen dos tipos principales de rechazo inmunológico:

- Rechazo crónico: Ocurre a lo largo del tiempo y puede manifestarse meses o años después del trasplante. Se caracteriza por la presencia de daño gradual y progresivo al riñón trasplantado. El rechazo crónico puede ser causado por una combinación de factores, incluyendo rechazo agudo no tratado o parcialmente tratado, lesiones vasculares y otros factores de riesgo (Banasik *et al.*, 2021).
- Rechazo agudo: Ocurre en las primeras semanas o meses después del trasplante. Puede ser mediado por anticuerpos o por células T. El rechazo agudo mediado por anticuerpos es causado por la producción de anticuerpos contra el tejido del donante, lo que puede provocar daño al riñón trasplantado. El rechazo agudo mediado por células T es una respuesta de las células T del receptor contra las células del donante (Einecke *et al.*, 2020).

En el rechazo celular y el rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal, intervienen diferentes mecanismos inmunológicos y vías de señalización. A continuación, se describen algunos de los principales:

2.4 Rechazo celular:

Reconocimiento de antígeno: Las células T del receptor reconocen antígenos extraños presentados por las células del riñón trasplantado a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Madill-Thomsen *et al.*, 2023).

Activación de células T: La interacción entre el complejo MHC y el receptor de células T (TCR) desencadena la activación de las células T, estimulando su proliferación y liberación de citocinas proinflamatorias (Pontrelli *et al.*, 2020).

Respuesta inflamatoria: Las citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e interferón gamma (IFN- γ), reclutan y activan células inflamatorias adicionales, como macrófagos y células natural killer (NK), amplificando la respuesta inmunológica (Ravindranath MH., *et al.*, 2021).

Citotoxicidad: Sablik *et al.* 2019 demostraron que las células T y las MP eran los tipos de células dominantes en los glomérulos de los receptores de aloinjertos renales con rechazo activo crónico mediado por anticuerpos (ABMR). Las células T citotóxicas (CD8+) pueden reconocer y destruir directamente las células del riñón trasplantado mediante la liberación de granzimas y perforinas (Sablik KA., *et al.*, 2019).

2.5 Rechazo Agudo Mediado por Anticuerpos (RAMA).

Producción de anticuerpos: El sistema inmunológico del receptor produce anticuerpos específicos contra antígenos presentes en las células del riñón trasplantado. Estos anticuerpos pueden ser preexistentes o anticuerpos específicos del donante (ADEs) (Mayer *et al.*, 2022).

Fijación de anticuerpos: Los anticuerpos se unen a los antígenos en el tejido del riñón trasplantado, formando complejos inmunes.

Respuesta inflamatoria y daño tisular: Los complejos inmunes activan el sistema del complemento y desencadenan la liberación de mediadores inflamatorios, como la quimiotaxis de leucocitos y la activación de células inflamatorias, lo que puede causar daño tisular en el riñón trasplantado.

Activación de células efectoras: Los complejos inmunes también pueden unirse a receptores Fc en células como los macrófagos, desencadenando su activación y producción de citocinas proinflamatorias.

2.6 Papel de los miARNs en el rechazo de trasplante renal

Los miARN (microARN) se han convertido en importantes reguladores de la expresión génica y se han implicado en varios procesos biológicos, incluidas las respuestas inmunitarias y el trasplante de órganos. Varios estudios han investigado el papel de los miARN en el rechazo agudo mediado por anticuerpos (RAMA) en pacientes con trasplante renal. A continuación, se presentan algunos hallazgos clave de la literatura científica:

Un estudio de Danger et al. (2019) [16] encontraron que miARN específicos, como miR-142-3p y miR-155, estaban regulados al alza en biopsias de trasplante de riñón con AMR en comparación con aquellas sin rechazo. Estos miARN se asociaron con la infiltración de células inmunitarias y las respuestas inflamatorias.

El estudio llevado a cabo por Alfaro *et al.*, 2021, donde se estudiaron múltiples miRNAs en sangre periférica de pacientes con trasplante renal y diagnóstico de rechazo agudo vs no rechazo para ser utilizados como biomarcadores, observándose disminución en la expresión de miR-150-5p, con un aumento de MBD6 considerándose que su desregulación podría encontrarse en relación con rechazo agudo.

En un estudio de Zeng, Z. et al. (2019) [19], miRNA21 y miR-155 se identificaron como biomarcadores potenciales para AMR. Mostraron expresión diferencial en biopsias de trasplante de riñón durante episodios de rechazo, lo que sugiere su participación en la patogénesis de AMR.

La investigación realizada por Lorenzen et al. (2020) identificaron miR-155 y miR-210 como biomarcadores potenciales para AMR en muestras de orina de receptores de trasplantes de riñón. Estos miRNAs mostraron niveles de expresión alterados durante los episodios de rechazo y podrían servir como herramientas de diagnóstico no invasivas.

Sarvestani, *et al.* 2021 investigó el papel del miRNA-126 en la protección renal mediante la técnica de postcondicionamiento isquémico en un modelo de lesión de isquemia/reperfusión renal en ratones. El estudio encontró que el miRNA-126 estaba involucrado en la regulación de la respuesta inflamatoria y la función endotelial en este contexto.

3. Objetivo General

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

3.1 Objetivo Específicos

1. Reclutar y caracterizar a los pacientes participantes del protocolo de trasplante renal
2. Recopilar muestras de plasma de pacientes receptores de trasplante renal con y sin rechazo mediado por anticuerpos.
3. Realizar análisis de expresión génica para determinar las concentraciones de los miARNs 1, 21, 126 y 155 en las muestras de suero.
4. Evaluar la asociación entre las concentraciones de los miARNs y la presencia de rechazo mediado por anticuerpos en los pacientes receptores de trasplante renal.
5. Interpretar y discutir los hallazgos sobre su posible relevancia clínica en el contexto de la evaluación del rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal.

4. Metodología

4.1 Características clínicas

Se reclutaron 30 pacientes con antecedente de trasplante renal, pero 2 se eliminaron debido a datos incompletos. Se realizaron biopsias en 28 pacientes en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Los criterios de inclusión fueron receptores de trasplante renal mayores de 18 años, con filtrado glomerular estimado por creatinina sérica ≥ 20 ml/min/1.73 m² y tiempo post-trasplante > 12 semanas. Se excluyó a un paciente con rechazo celular y se integraron 27 pacientes para el análisis estadístico. Se excluyeron casos de falla primaria del injerto, neoplasias activas, infecciones activas y pacientes con información incompleta. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado. Se evaluaron características sociodemográficas, tiempo de trasplante, tiempo de rechazo, tasa de filtración glomerular estimada y creatinina en los pacientes trasplantados.

4.2 Características inmunológicas

Todos los receptores inscritos recibieron una terapia inmunosupresora triple, conformada por un inhibidor de calcineurina (tacrolimus oral), antimetabolito (micofenolatomofetilo) y esteroide (prednisona), todos interrogados sobre el apego a tratamiento, así como determinación de niveles de tacrolimus (FK).

4.3 Determinación de miRNAs

4.3.1 Materiales y reactivos

- Sistema PCR rápida en tiempo real Applied Biosystems 7900HT
- Sistema de PCR de tiempo Applied Biosystems 7300/7500/7500 Rápido Real
- Termociclador GeneAmp® PCR System 9700
- Placa de reacción óptica de 96 pocillos ABI PRISM®
- ABI PRISM® Placa de reacción óptica transparente de 384 pocillos
- Cubiertas adhesivas ópticas ABI PRISM® (cantidad 100)
- Coberturas Adhesivas Ópticas (cantidad 25)

- Tapas ópticas ABI PRISM® , 8 tapas/tira
- Películas adhesivas Covers MicroAmp™
- Almohadillas de compresión óptica (cantidad 5)
- Tubos de reactivo de Applied Biosystems con tapas, 10 ml
- Centrifuga con portaplacas
- Puntas de pipeta, resistentes a aerosoles, sin nucleasas: rango de 1 a 20 µL, rango de 20 a 200 µL, rango de 100 a 1000 µL
- Pipetas (desplazamiento positivo, desplazamiento de aire o multicanal): rango de 1 a 20 µL, rango de 20 a 200 µL, rango de 100 a 1000 µL
- Tubos de polipropileno
- Agua filtrada estéril y libre de ARNasa
- Vórtice
- Microsoft® Excel o software de análisis y hoja de cálculo equivalente
- Cloroformo (sin alcohol isoamílico añadido)
- Etanol (70%, 80% y 96–100%)
- Puntas de pipeta estériles y sin ARNasa de 200 µL, 10 µL y 1000 µL
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml o 2 ml
- Microcentrifuga Megafuge 16R Heraeus
- Guantes desechables
- Kit de suero/plasma miRNeasy
- kit miRCURY RNA Spike-In, para RT (n.º de cat. 339390)
- Tubos de recolección
- Columnas de centrifugación RNeasy® MinElute® (cada una empaquetada con un tubo de recolección de 2 ml)
- Tubos de recogida (1,5 ml)
- Tubos de recogida (2 ml)
- Reactivo de lisis QIAzol®
- Tampón RWT
- RPE tampón
- Agua sin ARNasa
- Spike-in Control miRNeasay serum/Plasma (Mat. No. 1070596)

4.3.2 Procesamiento de las muestras de plasma de los pacientes:

- Centrifugar las muestras de plasma a una velocidad de 3500 RPM a 4°C durante 15 min, AC (aceleración) 9 y DC (desaceleración) 9
- Transferir 500µL de plasma en tubos eppendorf de 600 µL estériles y almacenar a -70°C

4.3.3 Purificación de miRNA total a partir de plasma

Centrifugar las muestras de a 8000 xG durante 10 minutos a 4°C DC 9, AC 9 (para muestras congeladas)

Preparación de Spike-in

Disolución 1

- Tomar 16 μL de agua sin ARNasa y transferir en un tubo eppendorf estériles de 200 μL
- Tomar 4 μL de Spike-in control y suspender en el agua libre de ARNasas.

Disolución 2

- Tomar 16 μL de agua sin ARNasa y transferir en un nuevo tubo eppendorf estériles de 200 μL
- Tomar 2 μL de la disolución 1 y suspender en 48 μL de agua sin ARNasa

1. Descongelar las muestras congeladas centrifugando durante 10 minutos a 8000 xG a 4°C
2. Agregar 5 volúmenes de QIAzol® e inmediatamente mezclar por vortex durante 10 segundos y dejar incubar 5 minutos
3. Tomar 3.5 μL de spike-in y agregar a la mezcla obtenida del paso 2 y homogeneizar por vortex durante 10 segundos.
4. Colocar el tubo que contiene el lisado en la mesa de trabajo a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5 minutos.
5. Agregar cloroformo en un volumen igual al de la muestra inicial al tubo que contiene el lisado y tápelo de forma segura (consulte la Tabla 2 para conocer las pautas). Vórtice o agite vigorosamente durante.
La mezcla completa es importante para la posterior separación de fases.
6. Colocar el tubo que contiene el lisado sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente durante 2–3 min.
7. Centrifugar durante 15 min a 12.000 xG a 4°C. Después de la centrifugación, caliente la centrífuga a temperatura ambiente si se utilizará la misma centrífuga para los siguientes pasos de centrifugación.

Después de la centrifugación, la muestra se separa en 3 fases: una fase acuosa superior, incolora, que contiene ARN; una interfase blanca; y una fase orgánica inferior, roja.

8. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo de recolección (no suministrado).
9. Pipetear hasta 700 μl de la muestra, incluido cualquier precipitado que se haya formado, en una columna de centrifugación RNeasy MinElute en un tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Cierre la tapa suavemente y centrifugue a $\geq 8000 \times$ ($\geq 10\,000$ rpm) durante 15 s a temperatura ambiente. Deseche el líquido sobrante.

Reutilizar el tubo de recolección en el paso 10.

10. Repetir el paso 8 utilizando el resto de la muestra. Deseche el líquido sobrante

Reutilizar el tubo de recolección en el paso 11.

11. Agregar 700 μl de tampón RWT a la columna de centrifugación RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a $\geq 8000 \times$ flujo ($\geq 10\,000$ rpm) para lavar la columna. Descartar el continuo.

Reutilizar el tubo de recolección en el paso 12.

12. Pipetear 500 μ l de tampón RPE en la columna de centrifugación RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugar durante 15 s a $\geq 8000 \times$ flujo (≥ 10.000 rpm) para lavar la columna. Descartar el continuo.

Reutilizar el tubo de recolección en el paso 13.

13. Pipetear 500 μ l de etanol al 80 % en la columna de centrifugación RNeasy MinElute. Cierre la tapa suavemente y centrifugue durante 2 min a $\geq 8000 \times$ (≥ 10.000 rpm) para lavar la membrana de la columna y desechar el tubo de recolección con el flujo
14. Colocar la columna de centrifugación RNeasy MinElute en un nuevo tubo de recogida de 2 ml (suministrado). Abra la tapa de la columna giratoria y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana.

Desechar el tubo de recolección con el flujo continuo.

15. Colocar la columna de centrifugación RNeasy MinElute en un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml (suministrado). Agregue 14 μ l de agua libre de ARNasa directamente al centro de la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa suavemente y centrifugue durante 1 min a máxima velocidad para eluir el ARN.

Almacenar los miRNA extraídos en ultracongelación a -70°C

4.5 Cuantificación de miRNAs utilizando PCR-RT

4.5.1 Preparación de la mezcla maestra para la transcripción inversa (RT).

1. Permita que los componentes del kit se descongelen en hiel
2. En un tubo de polipropileno, prepare la mezcla maestra escalando los volúmenes enumerados a continuación al número deseado de reacciones RT.

Componente	Máster mix Volumen de reacción (μ L)
dNTP de 100 mM (con dTTP)	0.1
Transcriptasa inversa MultiScribe™, 50 U/ μ L	0.6
10 \times Búfer de transcripción invers	1
Inhibidor de ARNasa, 20U/ μ	0.12
Agua libre de nucleasas	5.68
Muestra de ARN	2
Total	10

Tabla 1. Componentes para la preparación de la mezcla Máster mix.

3. Mezclar suavemente. Centrifugar para llevar la solución al fondo del tubo
4. Coloque la mezcla maestra RT en hielo hasta que prepare la reacción de miRNAs

Preparación de las reacciones RT

5. Para cada reacción de RT de 15 μ L, combine la mezcla maestra de RT (del paso 2) con el ARN total en la proporción de 7 μ L RT master mix a 5 μ L de ARN total

6. Mezclar suavemente. Centrifugar para llevar la solución al fondo del tubo
7. Antes de abrir los tubos de RT Primer, descongelar en hielo y mézclelos en un vórtex, luego centrifúguelos.
8. Para cada reacción de RT de 15 μ L, dispense 12,0 μ L de la mezcla maestra de RT que contiene ARN total (del paso 5) en un tubo de reacción de polipropileno de 0,2 ml. (Este es el tubo de reacción RT).
9. Transferir 3 μ l de cebador de RT (tubo etiquetado como Cebador de RT) de cada conjunto de ensayo al tubo de reacción de RT o pocillo de la placa correspondiente.
10. Sellar el tubo y mezcle suavemente. Centrifugar para llevar la solución al fondo del tubo.
11. Incubar el tubo en hielo durante 5 min y manténgalo en hielo hasta que esté listo para cargar el termociclador.

4.5.2 Transcripción inversa

12. Dejar el termociclador en el modo Emulación 9600 (predeterminado), use los siguientes valores de parámetros para programar el termociclador:

Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
30	16
30	42
5	85
Infinito	4

Tabla 2. Condiciones para llevar a cabo la reacción RT-PCR

4.5.3 Análisis estadístico

Los datos cuantitativos de la RT-PCR se analizarán utilizando el método del ciclo de umbral comparativo (Ct), utilizando hsa-miR-16 o U6 como referencias endógenas para plasma y sangre total, respectivamente. La cantidad de miARN se calculará mediante la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct representa el punto en el que la fluorescencia de la reacción del ensayo TaqMan supera el umbral establecido. ΔCt representa la diferencia en los valores de Ct entre el miARN objetivo y el control hsa-miR-16 y U6 para plasma y sangre total, respectivamente. ΔCt se obtiene restando el valor de Ct de hsa-miR-16 o U6 al valor de Ct de cada miARN. Es importante tener en cuenta que los niveles de expresión relativos (normalizados a los niveles de hsa-miR-16 en la misma muestra) son valores sin unidades por definición y posteriormente se analizarán estadísticamente con el software SPSS versión 26 para Windows.

5. Resultados

Se analizó la expresión en plasma de hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155, hsa-miR-21, hsa-miR-126 y hsa-miR-1, los cuales se han reportado que están involucrados en el daño vascular, así como en RAMA. Sin embargo, solo encontramos diferencias para hsa-miR-150-5p, específicamente, un mayor nivel de expresión de miR-150-5p en el grupo con RAMA (medianas: 1,60 vs. 0,42) ($p < 0,0012$) (Figura 1a). Luego, para evaluar la capacidad predictiva del miR-150-5p validado para el riesgo de RAMA, se construyó una curva AUC-ROC para el análisis comparando los casos de RAMA con los pacientes que no experimentaron rechazo. Esto se realizó utilizando datos obtenidos con la técnica de validación de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. Los resultados revelan que miR-150-5p demostró una capacidad discriminatoria efectiva, con un AUC de 0,87 (IC del 95 %: 0,7195 a 1,00). El umbral de expresión óptimo para predecir RAMA se estableció en $>0,96$, lo que proporcionó una sensibilidad del 63,16% y una especificidad del 89,47% (Figura 1b). Finalmente, utilizando el índice de Youden, establecimos un punto de corte óptimo para miR-150-5p y, para basarnos en este punto de corte, dividimos a todos los pacientes en dos grupos para realizar la prueba de Fisher con un análisis cruzado. Curiosamente, encontramos un mayor riesgo de RAMA en el grupo de miR-150-5p de alto nivel (OR: 12) (Figura 1c).

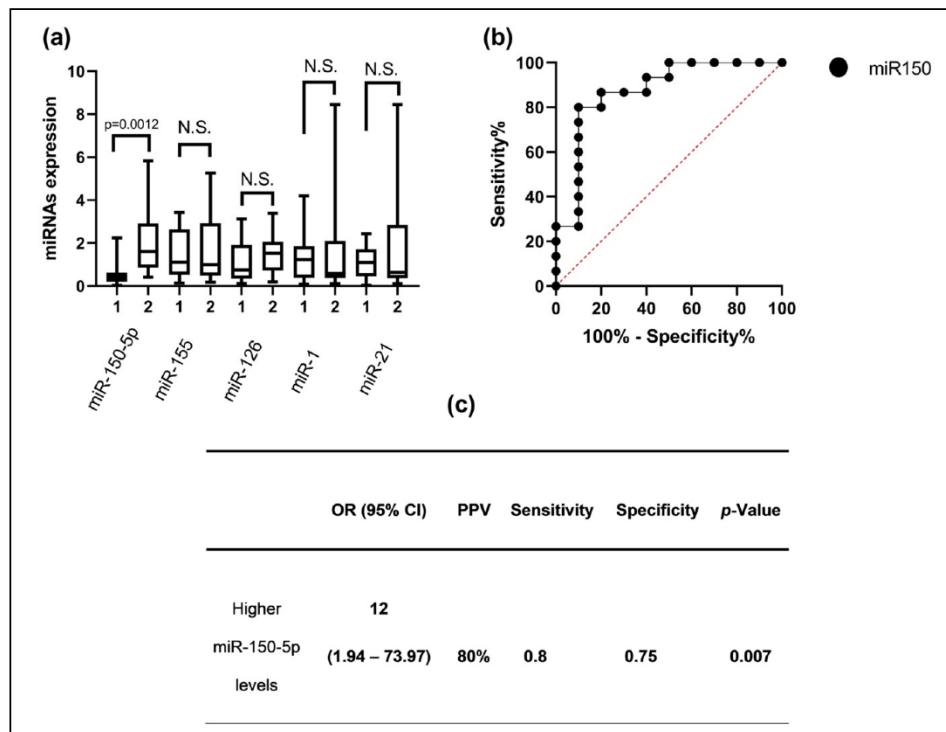


Figura 1. ((a) Niveles de expresión de miR-150-5p entre pacientes con y sin rechazo del trasplante. (b) Análisis ROC del área bajo la curva miR-150-5p para discriminar entre dos grupos de interés. (d) Análisis cualitativo mediante la prueba de Fisher con riesgo relativo calculado. 1= Sin Rechazo; 2= RAMA; NS= NO significativo.

6. Análisis de Resultados

En nuestro estudio se analizaron 5 mRNA implicados en el daño endotelial en suero de pacientes con sospecha de rechazo agudo mediado por anticuerpos para buscar biomarcadores capaces de diferenciar RAMA de pacientes sin rechazo, considerando que el endotelio es el principal sitio de daño en pacientes con RAMA.

Considerando que actualmente existe una búsqueda no satisfecha de biomarcadores que permitan el diagnóstico más temprano, no invasivo y seguimiento dinámico del rechazo, se han descrito múltiples variaciones en los niveles de miRNA en pacientes con patologías renales, donde se han descrito de igual forma modificaciones en los niveles de mRNA en pacientes con trasplante renal y rechazo.

En los miRNAs analizados en el estudio se encontró un aumento de miR-150-5p en pacientes con RAMA, asociado a funciones reguladoras inmunitarias, proliferación, activación y apoptosis de los linfocitos B y T, y expresado selectivamente en los ganglios linfáticos, el bazo, células T y B maduras. Además, se ha observado que el miRNA-150-5p podría ser un supresor de la generación de angiotensina II con un papel clave en la resolución de la lesión vascular y la reducción de la mortalidad resultante de la sepsis, así como su sobre expresión en ratones con nefritis lúpica y su papel pronóstico en pacientes con Nefropatía por IgA (Rajput *et al.*, 2016).

El miRNA-150-5p se ha estudiado en pacientes con rechazo agudo donde se ha mostrado elevación en su expresión en pacientes con rechazo celular agudo en comparación con pacientes sin rechazo donde la determinación de los miRNAs fue realizada a través de la extracción de RNA en bloques de parafina, por otra parte, Alfaro *et al.*, 2021 al observar una disminución en la expresión de miR-150-5p en pacientes con rechazo agudo independientemente del tipo de rechazo, donde se obtuvieron mediante el aislamiento de leucocitos de sangre periférica, observándose que las células CD4+, disminuyen los niveles de miR-150 intracelulares en pacientes con rechazo agudo. El estudio de Candia *et al.*, demostró que después de activar las células CD4+, se produce una disminución de miR-150 a nivel intracelular correlacionado con el aumento del suero. Esta premisa es compatible con nuestro estudio, donde los pacientes con RAMA aumentan los niveles séricos de miRNA-150-5p, provocado por la activación de las células CD4+ daño Microvascular podrían estar condicionando el incremento en los niveles séricos. Nuestro hallazgo es compatible con lo reportado en los modelos de trasplante pancreático murino, donde se ha documentado elevación del miR-150-5p en plasma, el cual se asoció con el rechazo del injerto y la destrucción de las células β (Candia *et al.*, 2013). Se ha propuesto que el miR-150-5p como un posible mediador funcional de la fibrosis renal que en pacientes con nefropatía por IgA, podría predecir el riesgo de progresión [19], en este contexto, la presencia de miRNA 150-5p en pacientes con RAMA podría estar condicionando la regulación de la fibrosis. Como se demuestra en un estudio experimental de ratones realizado por Luan *et al.*, 2020 donde la inhibición de miR-150 tuvo potencial para prevenir la fibrosis tubulointersticial, mediante la supresión de la vía SOCS1/JAK/STAT, evidenciando de igual forma que el aumento en la expresión de miRNA 150 en tejido renal condiciona mayor fibrosis. Hasta donde tenemos conocimiento, nuestro estudio, es el primero en realizar una relación entre los niveles de expresión de miRNA 150-5p y hallazgos histopatológicos,

evidenciando que la elevación sérica es mayor en aquellos que presentan inflamación microvascular, explorándose tanto el grado de fibrosis así como la inflamación aguda sobre crónica, sin encontrar diferencias significativas en los niveles de expresión de miRNA 150-5p, aunque sí una tendencia a la disminución con un mayor grado de fibrosis.

El aumento en la expresión de miR-150-5p en pacientes con RAMA podría estar asociados a un conjunto de genes diana como el gen MBD6, que traduce la proteína MBD6, que es una proteína que se une al ADN metilado y participa en procesos de envejecimiento, proliferación y supervivencia celular (Alfaro *et al.* 2021). Considerando que la modificación de sus niveles séricos podría ser una respuesta importante para atenuar un evento de rechazo renal, sin embargo, es importante destacar que los diferentes estudios que han intentado validar al miR-150-5p no han sido homogenizados en cuanto al tipo de rechazo así como el sitio de extracción del miRNA, teniendo en cuenta que nuestro estudio tiene la intención de proponer al miRNA-150-5p como un biomarcador., es importante destacar que la extracción de dicho miRNA fue serico, donde se evidencia su elevación a diferencia del estudio de Alfaro *et al.* dicha variación es compatible con la activación de CD4+. Consideramos que una limitante importante al igual que muchos de los estudios que han intentado validar miRNAs como biomarcador es el número de pacientes, siendo necesarios estudios a futuro con mayor número de pacientes. Otra parte importante, es considerar que este miRNA, únicamente fue explorado en pacientes con RAMA, descartando los rechazos celulares, ya que actualmente, este tipo de rechazo es mucho menos frecuente gracias a las nuevas terapias de inducción.

7. Conclusión

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que los pacientes con RT que presentan ABMR tienen un aumento en la expresión sérica de miR-150-5p a diferencia de los trasplantes sin rechazo, con estos hallazgos consideramos que miR-150-5p podría tener un potencial para diagnosticar ABMR. No obstante, se necesitan futuros estudios para corroborar estos resultados y aplicarlos en la práctica clínica que puedan sustituir la biopsia renal o como prueba previa que no condicione innecesariamente un procedimiento invasivo.

8. Referencias:

1. Alfaro, R., Legaz, I., Jimenez-Coll, V., El Kaaoui El Band, J., Martínez-Banaclocha, H., Galián, J. A., Parrado, A., Mrowiec, A., Botella, C., Moya-Quiles, M. R., Boix, F., de la Peña-Moral, J., Minguela, A., Llorente, S., & Muro, M. (2021). MicroRNA Expression Changes in Kidney Transplant: Diagnostic Efficacy of miR-150-5p as Potential Rejection Biomarker, Pilot Study. *Journal of clinical medicine*, 10(13), 2748. <https://doi.org/10.3390/jcm10132748>
2. Banasik, M., Boratynska, M., & Kościelska-Kasprzak, K. (2021). Cellular immune response in acute rejection after kidney transplantation. *Journal of Clinical Medicine*, 10(2), 313. doi: 10.3390/jcm10020313
3. Çakmak, H. A., & Demir, M. (2020). MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balkan medical journal*, 37(2), 60–71. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.1.94>
4. Candia P., Torri A., Gorletta T., Fedeli M., Bulgheroni E., Cheroni C., Marabita F., Crosti M., Moro M., Pariani E., et al. Intracellular Modulation, Extracellular Disposal and Serum Increase of MiR-150 Mark Lymphocyte Activation. *PLoS ONE*. 2013;8:e75348. doi: 10.1371/journal.pone.0075348.
5. Carrillo, M. V. C., & de León, J. C. B. (2022). Prevalencia de rechazo de injerto mediado por anticuerpos en pacientes pediátricos con trasplante renal: Estudio observacional en un centro único. *Revista de la Sociedad Ecuatoriana de Nefrología, Diálisis y Trasplante*, 10(2), 108-114.
6. Castro Cevallos, J. Y. (2023). *Proceso atención de enfermería en paciente adulto con enfermedad renal crónica* (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB-FCS, 2023).
7. Danger, R., Pallier, A., Giral, M., & Martinez-Llordella, M. (2019). Crosstalk between microRNAs, toll-like receptors, and cytokines in kidney transplantation. *Frontiers in Immunology*, 10, 15. doi: 10.3389/fimmu.2019.00015
8. De Pasquale, C., Pistorio, M. L., Veroux, M., Indelicato, L., Biffa, G., Bennardi, N., Zoncheddu, P., Martinelli, V., Giaquinta, A., & Veroux, P. (2020). Psychological and Psychopathological Aspects of Kidney Transplantation: A Systematic Review. *Frontiers in psychiatry*, 11, 106. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00106>
9. Einecke, G., Reeve, J., Sis, B., Mengel, M., & Hidalgo, L. (2020). Antibody-mediated microvascular injury in kidney transplantation: Lessons from clinical and molecular studies. *American Journal of Transplantation*, 20(S4), 8-17. doi: 10.1111/ajt.16021
10. Gaber, A. O., Mulgaonkar, S., Cockfield, S., Thompson, C. B., Boucher, R., Burke, J., Chandraker, A., Gaston, R. S., Liao, L., Malone, A. F., Meier-Kriesche, H. U., Michael, M., Morrison, Y., Patel, D., & Sinha, R. (2020). Renal transplantation in highly sensitized patients: Challenges, advances, and outcomes. *Transplantation*, 104(4), 724-734. doi: 10.1097/TP.0000000000003080
11. GARCIA, M. D. C. G. (2022). EFICACIA DE LA HEMODIALISIS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRONICA EN EL AREA DE URGENCIAS EN EL HOSPITAL GENERAL REGIONAL 251 DE ENERO A JUNIO 2020.
12. González-Espinoza L, Rojas-Campos E, Ortega-Pérez F, et al. Incidencia, prevalencia y mortalidad de la enfermedad renal crónica en México: estudio epidemiológico poblacional. *Nefrología*. 2020;40(1):64-72. doi: 10.1016/j.nefro.2019.03.002. PMID: 31005547.

13. Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Wilk, A. R., Robinson, A., Wainright, J. L., Snyder, J. J., Kasiske, B. L., & Israni, A. K. (2020). OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*, 20(S1), 20-130. doi: 10.1111/ajt.15695
14. Instituto Mexicano del Seguro Social. (2019). Trasplante renal. Enfermedad renal crónica (ERC). Guía de Práctica Clínica. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/478423/Trasplante_Renal.pdf
15. Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7-11.
16. Lorenzen, J. M., Schauerte, C., Hübner, A., Kölling, M., Martino, F., Scherf, K., Batra, R., Haller, H., Thum, T., & Gwinner, W. (2020). Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *American Journal of Transplantation*, 20(2), 437-448. doi: 10.1111/ajt.15620
17. Luan J, Fu J, Wang D, Jiao C, Cui X, Chen C, Liu D, Zhang Y, Wang Y, Yuen PST, Kopp JB, Pi J, Zhou H. miR-150-Based RNA Interference Attenuates Tubulointerstitial Fibrosis through the SOCS1/JAK/STAT Pathway In Vivo and In Vitro. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020 Oct 14;22:871-884. doi: 10.1016/j.omtn.2020.10.008. PMID: 33230482; PMCID: PMC7658580.
18. Madill-Thomsen, K. S., Böhmig, G. A., Bromberg, J., Einecke, G., Eskandary, F., Gupta, G., Myslak, M., Viklicky, O., Perkowska-Ptasinska, A., Solez, K., Halloran, P. F., & the INTERCOMEX Investigators (2023). Relating Molecular T Cell-mediated Rejection Activity in Kidney Transplant Biopsies to Time and to Histologic Tubulitis and Atrophy-fibrosis. *Transplantation*, 107(5), 1102–1114. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000004396>
19. Mayer, K. A., Budde, K., Jilma, B., Doberer, K., & Boehmig, G. A. (2022). Emerging drugs for antibody-mediated rejection after kidney transplantation: a focus on phase II & III trials. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 27(2), 151-167.
20. National Kidney Foundation. (2020). Chronic Kidney Disease. Recuperado de <https://www.kidney.org/atoz/content/about-chronic-kidney-disease>
21. Olivares-del Moral, J. I., González, M. E. O., Reyes-Grajeda, J. P., Charco-Cruz, M., Florez-Zorrilla, C., Sánchez-Cedillo, I. A., ... & Fonseca-González, G. T. (2022). Análisis de la expresión proteica de pacientes con rechazo de trasplante renal. *Revista Mexicana de Trasplantes*, 11(3), 81-90.
22. Pontrelli, P., Grandaliano, G., & Van Kooten, C. (2020). Editorial: Kidney Transplantation and Innate Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 603982. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603982>
23. Rajput C, Tauseef M, Farazuddin M, Yazbeck P, Amin MR, Avin Br V, Sharma T, Mehta D. La supresión de la generación y señalización de la angiopoetina-2 de MicroRNA-150 es crucial para resolver la lesión vascular. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Feb;36(2):380-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306997. Epub 2016 7 de enero PMID: 26743170; PMCID: PMC4732888.
24. Ravindranath MH, El Hilali F and Filippone EJ (2021) The Impact of Inflammation on the Immune Responses to Transplantation: Tolerance or Rejection? *Front. Immunol*. 12:667834. doi: 10.3389/fimmu.2021.667834
25. Roat R., Hossain M.M., Christopherson J., Free C., Guay C., Regazzi R., Guo Z. Circulating miRNA-150-5p is associated with immune-mediated early β -cell loss in a humanized mouse model. *Xenotransplantation*. 2019;26:e12474. doi: 10.1111/xen.12474.

26. Roshanravan, H., & Dryer, S. E. (2020). Dysregulation of MicroRNAs in Chronic Kidney Disease: Role in Pathogenesis and Potential as Therapeutic Targets. *Kidney International Reports*, 6(2), 251-263. doi: 10.1016/j.ekir.2020.11.020.
27. Sablik KA, Jordanova ES, Pocorni N, Clahsen-van Groningen MC, Betjes MGH. Immune Cell Infiltrate in Chronic-Active Antibody-Mediated Rejection. *Front Immunol* (2019) 10:3106. doi: 10.3389/fimmu.2019.03106
28. Sarvestani, F. S., Azarpira, N., Al-Abdullah, I. H., & Tamaddon, A. M. (2021). microRNAs in liver and kidney ischemia reperfusion injury: Insight to improve transplantation outcome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110944.
29. Zeng, Z., Liao, R., Zhou, Y., Zhang, W., Wen, W., Wu, J., ... He, X. (2019). A pilot study of microRNA-21 and microRNA-155 as biomarkers for acute rejection after renal transplantation. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 23(3), 407-416. doi: 10.1007/s40291-019-00390-2