



Artículo original

Análisis de la expresión proteica de pacientes con rechazo de trasplante renal

Protein expression analysis in patients with renal transplant rejection



Josué Israel Olivares-del Moral,^{*} María Esther Ocharán-Hernández,[‡]
Juan Pablo Reyes-Grajeda,[§] Miguel Charco-Cruz,[¶] Carlos Florez-Zorrilla,^{||}
Isidoro Aczel Sánchez-Cedillo,^{**} José Horacio Cano-Cervantes,^{‡‡} Alejandra Núñez-Venzor,^{§§}
Lorena Lina-López,^{¶¶} Gandhy Thomas Fonseca-González^{***}

- * Cirugía de Trasplante, Centenario Hospital Miguel Hidalgo, Aguascalientes, Ags. Sección de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y Alumno de posgrado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica.
‡ Sección de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.
§ Subdirector de Investigación Básica. Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.
¶ Jefe de Departamento de Cirugía de Trasplante, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Ciudad de México.
|| Jefe de División de Trasplante. Hospital Regional «Dr. Valentín Gómez Farías», Zapopan, Jal.
** Jefe de Unidad de Trasplante. Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga», Ciudad de México.
‡‡ Jefe de Departamento de Nefrología de Trasplante. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Ciudad de México.
§§ Profesor adjunto. Hospital General «Manuel Gea González», Ciudad de México.
¶¶ Fellow Cirugía de Trasplante. Hospital General de México «Dr. Eduardo Liceaga», Ciudad de México.
*** Profesor adjunto Nefrología de Trasplante. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Ciudad de México.

RESUMEN

ABSTRACT

Introducción: el trasplante renal es el único tratamiento que mejora la calidad de vida en los pacientes con enfermedad renal crónica, al cierre de 2021 en México se realizaron 1,971 trasplantes. Dentro de las principales complicaciones observadas después del trasplante encontramos infecciones, alteraciones asociadas a la inmunosupresión, recurrencia de enfermedad de base y el rechazo. La incidencia de rechazo reportada a nivel mundial oscila entre 12 y 14%. El diagnóstico de rechazo es histopatológico; sin embargo, no se han reportado marcadores moleculares que nos permitan sospechar el desarrollo de esta entidad antes de que se inicie el deterioro estructural del injerto. Los métodos actuales para monitorizar el rechazo en el injerto son la elevación de creatinina, la presencia de proteinuria y el desarrollo de anticuerpos antidonor específico (ADES). Una biopsia renal implica riesgo de hematuria y hematoma perirrenal (2 a 4%). **Antecedentes:** existe una gran cantidad de biomarcadores nuevos, no invasi-

Introduction: renal transplantation is the only treatment that improves the quality of life of patients with chronic kidney disease; at the end of 2021, 1,971 transplants were performed in Mexico. Among the main complications observed after transplantation are infections, alterations associated with immunosuppression, recurrence of the underlying disease and rejection. The incidence of rejection reported worldwide ranges between 12 and 14%. The diagnosis of rejection is histopathological; however, no molecular markers have been reported that allow us to suspect the development of this entity before the onset of structural deterioration of the graft. Current methods to monitor graft rejection are creatinine elevation, the presence of proteinuria and the development of specific anti-donor antibodies (ADES). A renal biopsy implies a risk of hematuria and perirenal hematoma (2 to 4%). **Background:** there are a large number of new, non-



vos en muestras de orina y de sangre periférica que se encuentran en investigación durante los últimos años, la mayoría de ellos con valor pronóstico o diagnóstico, así como diferentes grados de éxito clínico y preclínico. Algunos de ellos con relación al rechazo agudo, se han investigado miR146a-5p en suero del receptor y orina panel de tres genes (estudio CTOT 03 para rechazo celular mediado por células T (TCMR), el estudio KALIBRE (panel de 7 genes para TCMR) estudio GoCAR (panel de 17 genes para TCMR) kSORT (estudio AART), para rechazo mediado por células T y rechazo mediado por anticuerpos, fragmentos de complemento para rechazo mediado por anticuerpos, CXCL 9 para TCMR y ABMR CSCL 10, para ABMR por mencionar algunos de los trabajos que hasta el momento se han realizado. El desarrollo de nuevas tecnologías para identificar proteínas asociadas a un proceso metabólico ha demostrado la posibilidad de tener un impacto favorable en identificar procesos tales como el rechazo del injerto trasplantado. La proteómica consiste en una serie de técnicas bioquímicas y analíticas para identificar proteínas diferencialmente expresadas que podrían ser utilizadas como biomarcadores para este fin. **Material y métodos:** se incluyeron 23 pacientes trasplantados de riñón del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, sometidos a biopsia de injerto renal en un periodo de cuatro meses, los cuales se clasificaron en dos grupos, un grupo con función estable del injerto n = 13 y un grupo con rechazo activo mediado por anticuerpos n = 13. Se realizó análisis demográfico con moda, mediana y rangos sin encontrar diferencias significativas en ambos grupos. Las muestras de suero de los pacientes fueron analizadas en cuanto a su integridad, una vez que fueron cuantificadas por el método colorimétrico 2D-Quant, se eligieron las muestras más representativas por su contenido proteico, es decir, aquellas cuya concentración proteica se encontraba por arriba de 20 mg/dL. Posteriormente, éstas se sometieron al análisis de separación electroforética de geles bidimensionales con la finalidad de identificar proteínas diferenciales en ambos grupos de estudio. **Resultados:** se sistematizó la toma, preservación y transporte de muestras de pacientes trasplantados de riñón del hospital 20 de Noviembre. Se estandarizó la cuantificación de proteínas para realizar análisis con geles bidimensionales y se realizó un análisis preliminar de patrones diferenciales de expresión, sentando los precedentes para los posteriores análisis y la identificación de las proteínas diferenciales por espectrometría de masas. Comparando ambos geles, encontramos la representación de proteínas de alta abundancia como inmunoglobulina, haptoglobina, factores de complemento, alfa 1 antitripsina, por mencionar algunas que resultan de mayor representación en los geles y denotan la adecuada preservación y manejo de los tejidos, llama la atención moléculas como CXC 7 y proteína ABMP, con mayor representación en el gel maestro de los pacientes con rechazo. **Conclusiones:** la proteómica clásica en el estudio de proteínas diferenciales para el desarrollo de protocolos para el descubrimiento de proteínas en pacientes que reciben un trasplante, con la finalidad de identificar potenciales marcadores moleculares que pudieran ser útiles para el diagnóstico de rechazo es una herramienta útil que se encuentra en desarrollo, requiere de tiempo y análisis de datos específicos para lograr resultados objetivos y trascendentales. Proteínas como CXC 7 y proteína ABMP resultan representativas para

*invasive biomarkers in urine and peripheral blood samples under investigation in recent years, most of them with prognostic or diagnostic value, as well as varying degrees of clinical and preclinical success. Some of them, in relation to acute rejection have been investigated miR146a-5p in recipient serum and urine, three-gene panel (CTOT 03 study for T-cell mediated rejection (TCMR), the KALIBRE study (7-gene panel for TCMR), GoCAR study (17-gene panel for TCMR), kSORT (AART study), for T cell-mediated rejection and antibody-mediated rejection, complement fragments for antibody-mediated rejection, CXCL 9 for TCMR and ABMR, CSCL 10, for ABMR to mention some of the work that has been done so far. The development of new technologies to identify proteins associated with a metabolic process has demonstrated the possibility of having a favorable impact in identifying processes such as transplant graft rejection. Proteomics consists of a series of biochemical and analytical techniques to identify differentially expressed proteins that could be used as biomarkers for this purpose. **Material and methods:** 23 kidney transplanted patients from the Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, who underwent renal graft biopsy in a period of four months, were classified in two groups, one group with stable graft function n = 13 and one group with active rejection mediated by antibodies n = 13. Demographic analysis was performed with mode, median and ranges without finding significant differences in both groups. The patients' serum samples were analyzed for integrity, once they were quantified by the 2D-Quant colorimetric method, the most representative samples were chosen for their protein content, i.e., those whose protein concentration was above 20 mg/dL. Subsequently, these were subjected to electrophoretic separation analysis of two-dimensional gels in order to identify differential proteins in both study groups. **Results:** we systematized the collection, preservation and transport of samples of kidney transplanted patients from the 20 de Noviembre hospital. Protein quantification was standardized for analysis with two-dimensional gels and a preliminary analysis of differential expression patterns was performed, setting the precedents for subsequent analysis and identification of differential proteins by mass spectrometry. Comparing both gels, we found the representation of high abundance proteins such as immunoglobulin, haptoglobin, complement factors, alpha 1 antitrypsin, to mention some that are of greater representation in the gels and denote the adequate preservation and management of tissues, molecules such as CXC 7 and ABMP protein, with greater representation in the master gel of patients with rejection. **Conclusions:** classical proteomics in the study of differential proteins for the development of protocols for the discovery of proteins in patients receiving a transplant, with the aim of identifying potential molecular markers that could be useful for the diagnosis of rejection is a useful tool that is still under development and requires time and analysis of specific data to achieve objective and transcendental results. Proteins such as CXC 7 and ABMP protein are representative for this study, and validation studies should be performed in addition to mass spectrometry identification to assess the possibility of identifying proteins different from those reported in the literature.*

este estudio, y que deberán realizarse estudios de validación además de la identificación con espectrometría de masas para valorar la posibilidad de identificar proteínas diferentes a las reportadas en la literatura.

Palabras clave: trasplante renal, rechazo mediado por anticuerpos, proteómica, rechazo, injerto renal.

Keywords: renal transplantation, antibody-mediated rejection, proteomics, rejection, renal graft.

INTRODUCCIÓN

El trasplante renal es el único tratamiento que mejora la calidad de vida en los pacientes con enfermedad renal crónica en fase terminal, al cierre de 2019 en México se realizaron 2,987 trasplantes de riñón, la pandemia por COVID-19 afectó esta cifra para 2020 habiéndose realizado 915 trasplantes de riñón en el país; sin embargo, para el año 2021 se realizaron 1,971 trasplantes, esto en el contexto del plan de reactivación de programas de trasplante por parte del Centro Nacional de Trasplantes. Hoy en día, existen más de 17,020 pacientes con enfermedad renal crónica en espera de un trasplante renal.

Dentro de las principales complicaciones observadas después del trasplante encontramos infecciones, alteraciones asociadas a la inmunosupresión, recurrencia de enfermedad de base y el rechazo. La incidencia de rechazo reportada a nivel mundial oscila entre 12 y 14%. El diagnóstico de rechazo es histopatológico; sin embargo, no se han reportado marcadores moleculares que nos permitan sospechar del desarrollo de esta entidad antes de que se inicie el deterioro estructural del injerto. Los métodos actuales para monitorizar el rechazo en el injerto son la elevación de creatinina, la presencia de proteinuria y el desarrollo de anticuerpos antidonador específico (ADES).⁵ Una biopsia renal implica riesgo de hematuria y hematoma perirrenal (2 a 4%).

El desarrollo de nuevas tecnologías para identificar proteínas asociadas a un proceso metabólico ha demostrado la posibilidad de tener un impacto favorable en identificar procesos tales como el rechazo del injerto trasplantado.

El uso de las ciencias ómicas en el área de trasplante se ha convertido en una herramienta útil para el descubrimiento de nuevos biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico de ciertas patologías, así como para desarrollar tratamientos farmacológicos.

La proteómica se encarga del análisis de proteínas expresadas por el genoma completo, siendo un estudio dinámico de la expresión de procesos metabólicos en una determinada ruta de metabolismo,

en este caso, echaremos mano de esta tecnología para descubrir moléculas con potencial valor biológico que permitan diagnosticar la evolución hacia un rechazo inmunológico en los pacientes con trasplante renal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio exploratorio, prospectivo, observacional, transversal y comparativo en un periodo de cuatro meses en Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, que incluyó 23 pacientes, dividiendo al grupo control en pacientes de 18 años o más con trasplante renal y función estable del injerto por al menos tres meses previos a la toma de biopsia. El grupo de estudio fueron pacientes de 18 años o más con trasplante renal y que se hayan sometido a biopsia de injerto renal por disfunción aguda del injerto. Se tomaron muestras simultáneas de sangre para extraer el suero, manteniéndolo en ultracongelación a -70 °C, para posteriormente someter las muestras a cuantificación de proteínas mediante el método 2D Want (colorimétrico), eligiendo cinco muestras con mayor concentración proteica de cada grupo (20 mg/dL), y se formó un pool de muestras. Estos pools se sometieron a separación electroforética en geles de acrilamida de gradiente (pH4-7), y se tiñeron con colorante azul para posteriormente someterlos a biofotografía y análisis visual, correlacionando con base de datos Swiss 2DPAGE proteínas de suero.

RESULTADOS

De los pacientes sometidos a biopsia protocolaria (n = 26) en un periodo de cuatro meses, obtuvimos plasma a través de la toma de muestra por punción. Se excluyeron tres pacientes por no contar con expediente completo o no tener resultado de biopsia al momento del análisis. De los 23 pacientes restantes dividimos los grupos de estudio en un grupo control en los que la muestra del injerto demostró no tener cambios sugerentes de rechazo, y, por el contrario evolucionaron de manera estable hasta el

momento del estudio (n = 8), el grupo de casos (n = 15) presentó de manera característica datos que sugieren rechazo activo mediado por anticuerpos. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 25 y STATA 14.0.

La mediana de edad para ambos grupos fue de 48 años con un rango de 17 a 72 años. La distribución en cuanto al sexo fue de dos mujeres y seis hombres para el grupo control y seis mujeres y nueve hombres en el grupo de casos. El origen del trasplante en el grupo control fueron de donante cadavérico, uno de donante vivo relacionado y un paciente recibió un injerto de donante vivo no relacionado, mientras que en el grupo con rechazo siete recibieron un trasplante renal de donante vivo relacionado, dos recibieron un trasplante renal de donante vivo no relacionado y seis pacientes recibieron un trasplante de donante cadavérico.

En cuanto a las condiciones generales de los casos, en el índice de masa corporal encontramos una mediana de 25.9 para el grupo control y 23.7 para el grupo con rechazo (p = 0.8) sin diferencia significativa en ambos grupos, para la creatinina sérica en ambos grupos encontramos una mediana de 1.4 mg/dL (rango 0.9-1.65) para el grupo con evolución estable del injerto y 1.29 (rango 0.9-1.7) para el grupo con rechazo (p = 0.9). La etiología reportada como causante de enfermedad renal crónica para este grupo incluye nefropatía diabética, lesión renal aguda, enfermedad renal poliquística y nefropatía por IgA, y cuatro de los ocho pacientes no contaban con diagnóstico etiológico de la enfermedad renal crónica, el riesgo pretrasplante para CMV en este grupo fue alto en cuatro pacientes e intermedio en otros cuatro. Como terapia de inducción a la inmunosupresión en el grupo control se utilizó

Tabla 1: Set de descubrimiento, N = 23.

	Sin rechazo (supervivencia de injerto)	Rechazo activo mediado por anticuerpos
n = 23	8	15
Sexo (Masculino/ Femenino)	2/6	6/9
Edad, mediana [rango]	48 [17-72]	32 [23-56]
Índice de masa corporal	25.9	23.7 p = 0.8
CrS, mediana [rango]	1.4 mg/dL [0.9-1.65]	1.29 mg/dL [0.9-1.7] p = 0.09

CrS = Creatinina sérica.

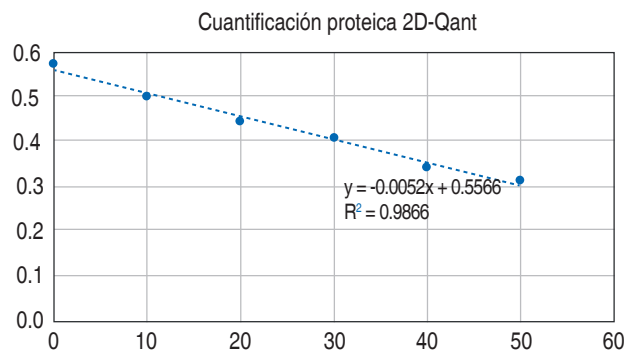


Figura 1: Curva de cuantificación proteica por muestra elegida en 2D-Qant, y = absorbancia del estándar, m = Pendiente de la curva estándar, b = Ordenada al origen de la curva estándar, x = Concentración del estándar en µg.

timoglobulina en tres pacientes, basiliximab en cuatro pacientes y en un paciente no se especificó qué terapia fue la elegida.

Por otro lado, para el grupo con rechazo la etiología para desarrollar enfermedad renal resultó diversa al igual que en el grupo anterior teniendo como diagnósticos hipoplasia renal, preeclampsia, nefritis tubulointersticial y nefropatía por IgA, con nueve pacientes sin diagnóstico etiológico previo al trasplante, el riesgo de CMV fue alto en seis pacientes, intermedio en seis y bajo en tres. La terapéutica empleada como terapia de inducción en cuatro pacientes fue con timoglobulina, ocho con basiliximab y en tres pacientes no fue especificado en el expediente, una vez comparados ambos grupos, se realizó un análisis de diferencia de medias para ambos grupos, encontrando que no existe diferencia significativa en ambos grupos en cuanto al rango de creatinina al momento de la biopsia o al índice de masa corporal (*Tabla 1*).

En todas las muestras se realizó cuantificación de proteína por el método 2-D-Quant, cuya curva se muestra en la *Figura 1*.

EL kit 2-D Quant está diseñado para determinación precisa de la concentración de proteínas de muestras que serán analizadas por técnicas electroforéticas de alta resolución, tales como electroforesis 2D, SDS-PAGE o IEF. Muchos de los reactivos utilizados en la preparación de las muestras, incluyendo detergentes, reductores, caotrópicos y anfólitos son incompatibles con otros métodos de cuantificación.

En este ensayo se trabaja con la precipitación cuantitativa de las proteínas. Está basado en la unión específica de los iones de cobre a las proteínas. Las proteínas precipitadas son resuspendidas en una so-

lución que contiene cobre, el cobre libre (no unido a proteínas) es medido a través de una reacción colorimétrica por lo que la densidad del color es inversamente proporcional a la concentración de proteína. El ensayo tiene una respuesta lineal en un rango de 0-50 µg de proteína.

Una vez realizado este procedimiento, se seleccionaron las cinco muestras de pacientes con mejor representación en cuanto a concentración proteica para tener resultados óptimos, dado que el análisis demográfico no arrojó diferencias significativas en cuanto a los grupos a estudiar.

En la **Tabla 2** se describen las características histopatológicas de las biopsias obtenidas de los injertos renales. Se representa el número total de muestras obtenidas de pacientes que recibieron un trasplante renal, y se describe el diagnóstico histopatológico mediante el uso del puntaje de Banff, con lo que posteriormente se realizó la división de dos grupos de estudio, teniendo en cuenta a los casos con evolución estable del injerto y aquéllos con rechazo agudo, mediados por anticuerpos.

Una vez obtenidos estos resultados y habiendo elegido el número de muestra a estudiar se separaron en un concentrado de muestras con la intención de

Tabla 2: Características histopatológicas en biopsia de injerto renal.

Número	i	t	v	g	ptc	C4d
1	0	0	0	0	3	NA
2	0	0	0	1	1	1
3	0	0	0	1	1	0
4	0	0	0	1	2	0
5	0	0	0	1	2	1
6	0	0	0	0	1	0
7	1	0	0	1	2	1
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	2	0	1	3	1
11	0	0	0	1	2	1
12	0	0	0	0	2	0
13	0	0	0	2	3	1
14	0	1	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
18	0	0	1	2	1	0
20	0	0	0	1	2	1
21	0	0	0	1	3	0

i = inflamación intersticial; t = tubulitis, v = vasculitis; g = glomerulitis; ptc = capilaritis peritubular; C4d = inmunohistoquímica para C4d.

Tabla 3: Pool control (biopsia sin rechazo).

Paciente	Biopsia (puntaje de BANFF)					
	i	t	v	g	ptc	C4d
3	0	0	0	1	1	0
6	0	0	0	0	1	0
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	2	0
14	0	1	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0

i = inflamación intersticial; t = tubulitis; v = vasculitis; g = glomerulitis; ptc = capilaritis peritubular; C4d = inmunohistoquímica para C4d.

Tabla 4: Pool casos (biopsia con rechazo activo mediado por anticuerpos).

Paciente	Biopsia (puntaje de BANFF)					
	i	t	v	g	ptc	C4d
1	0	0	0	0	3	1
2	0	0	0	1	1	0
4	0	0	0	1	2	1
5	0	0	0	1	2	1
7	1	0	0	1	2	1
10	0	2	0	1	3	1
11	0	0	0	1	2	1
13	0	0	0	2	3	1
18	0	0	1	2	1	0
20	0	0	0	1	2	1
21	0	0	0	1	3	0

i = inflamación intersticial; t = tubulitis; v = vasculitis; g = glomerulitis; ptc = capilaritis peritubular; C4d = inmunohistoquímica para C4d.

realizar un gel maestro. A continuación se describen las características de las biopsias de cada grupo, y las que se eligieron para el gel maestro.

De esta manera, en la **Tabla 3** se concentran los pacientes con diagnóstico histopatológico de evolución estable del injerto, es decir, que no presentan datos de rechazo activo de mediado por anticuerpos, considerando las muestras identificadas con el número 3, 6, 8, 9, 12 y 14 para el análisis comparativo y la elaboración de un pool de muestras toda vez que la concentración proteica de estas muestras se observó por dentro del estándar de concentración de 20 µg por µL para obtener el análisis proteico completo.

En la *Tabla 4* observamos, por otro lado, el número de muestras de pacientes con diagnóstico de rechazo agudo mediado por anticuerpos, tomando en consideración las muestras 4, 5, 7, 10 y 11, las cuales presentan una concentración óptima ($20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) de proteínas para formar el pool de muestras y comparar con el pool de pacientes con evolución estable del injerto.

Las muestras representativas se resaltan en las *Tablas 3 y 4*. Se sometieron las muestras de plasma y suero a un análisis de integridad proteica, encontrando que las muestras obtenidas de los pacientes contenían un promedio de $77 \mu\text{g}$ de proteínas por μL de muestra obtenida, este análisis se realizó mediante el método 2D Quant, para cuantificación de proteínas. Una vez obtenido este resultado de la concentración de proteínas por muestra, se eligieron una vez más las muestras con mayor contenido proteico y que presentarán datos demográficos, clínicos e histopatológicos similares, esto con el objetivo de realizar un análisis dividido en dos grupos (casos y controles), con el objetivo de identificar proteínas diferenciales, que pudieran tener un significado analítico como potenciales marcadores moleculares.

El resultante de estas técnicas se muestra en las *Figuras 2 y 3*, teniendo como resultado integridad de proteínas mediante métodos electroforéticos.

Integridad controles SDS-PAGE

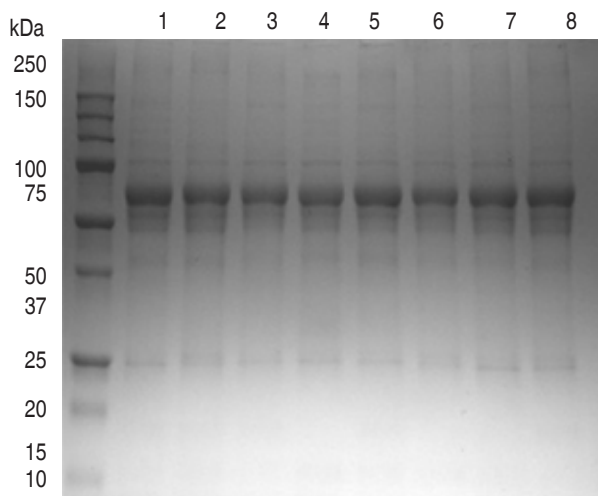


Figura 2: Gel de integridad de proteínas para el grupo control. Se muestra en el eje de las «x» el número consecutivo de las muestras de plasma tomadas de pacientes incluidos en el estudio, en el eje de las «y» se muestra el peso molecular para cada marcador, lo que corresponde al peso molecular de las proteínas a estudiar.

Gel de acrilamida al 12% Mini-PROTEAN Precast BIO-RAD, marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ BIO-RAD.

Integridad SDS-PAGE

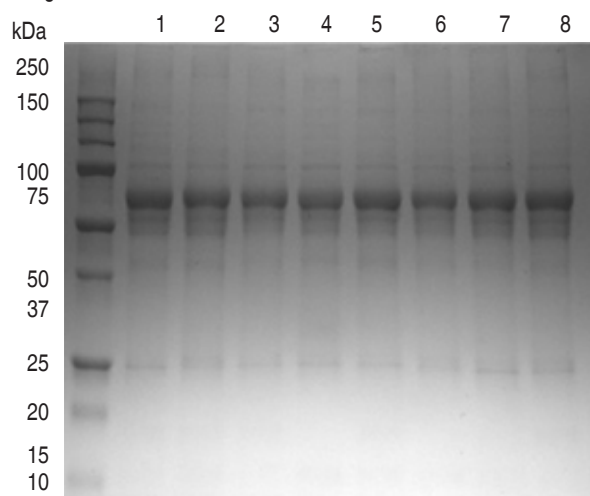


Figura 3: Gel de integridad de proteínas para el grupo casos. Se muestra en el eje de las x el número consecutivo de las muestras de plasma tomadas de pacientes incluidos en el estudio, en el eje de las y se muestra el peso molecular para cada marcador, lo que corresponde al peso molecular de las proteínas a estudiar.

Gel de acrilamida al 12% Mini-PROTEAN Precast BIO-RAD, marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ BIO-RAD. El resultado de estas muestras denota que las muestras se encuentran con integridad adecuada para continuar con un siguiente paso de separación para búsqueda de proteínas diferenciales, siendo adecuado el método de dos dimensiones con un gel de gradiente de acrilamida con pH 4-7.

En la *Figura 2* se observa un gel de una dimensión en el que se determina la integridad proteica para el grupo control, observando en el carril 1 el marcador de peso molecular, y en el carril 1 al 8 las muestras representativas del grupo control.

En este experimento se realizó una nueva corrida para el grupo con rechazo (*Figura 3*), en donde el carril sin etiqueta representa el marcador de peso molecular y del carril 1 al 8 las muestras elegidas para este grupo.

En la *Figura 4* se observa el patrón de separación electroforético en dos dimensiones del pool de muestras control, lográndose observar enriquecimiento de proteínas de alta abundancia como haptoglobina (pM: 48kDa pI4.9), inmunoglobulina (pM: 48kDa pI 6.8) apolipoproteína (pM: 32 kDa, pI6.4), alfa 1 antitripsina (pM: 51kDa pI 4.5), por otro lado, y en relación con estudios previos, analizamos la posible asociación en función del peso molecular y punto isoeléctrico de proteínas como el factor 4 de complemento (pM: 10kDa pI: 5.91) el cual se identificó en el grupo de rechazo, mientras que no se observó en el grupo control, otra proteína de interés, la apo-

lipoproteína A-I (pM: 22kDa, pl: 5.48) se observa en ambos geles y la glicoproteína alfa 2 rica en leucina (pM: 49kDa pl: 4.58). El factor I de complemento (pM: 37900kDa pl: 5.03) se puede identificar en el grupo control y no así en el grupo con rechazo.

Una de las proteínas que se observa de manera interesante en el grupo con rechazo y que además ha sido compatible con pacientes que presentan enfermedad renal y proteína tubular es la proteína AMBP, la cual no se identifica en el grupo control, pero se observa de manera representativa en el grupo con rechazo y proteinuria tubular (proteína AMBP pl: 4.86, pM: 32kDa), otra proteína de interés, la citosina CXC 7 (pl: 7.27 pM: 83), la cual ha sido descrita en estudios previos con muestras de orina, resulta también positiva en el gel del grupo con rechazo. En el análisis visual comparativo, también se observa factor I de complemento

Controles (set descubrimiento)

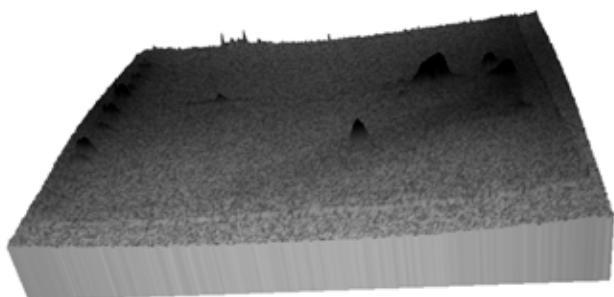
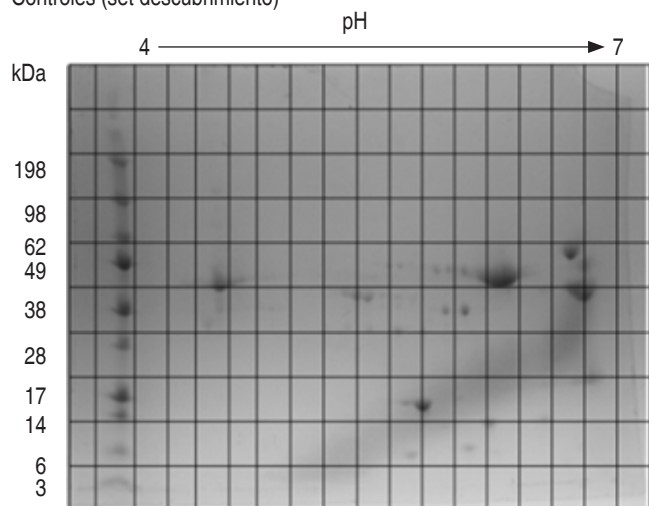


Figura 4: Set de descubrimiento para el grupo control (pacientes con función estable del injerto), en 2 dimensiones, pH 4-7, con gel de gradiente 4-15%, en el eje del gradiente de pH obtenido posterior a análisis de isoelectroenfoque con bandas de 7cm, rango de pH 4-7, IPGphor 3 de GE, y electroforesis con reconstrucción electrónica.

Casos (set de descubrimiento)

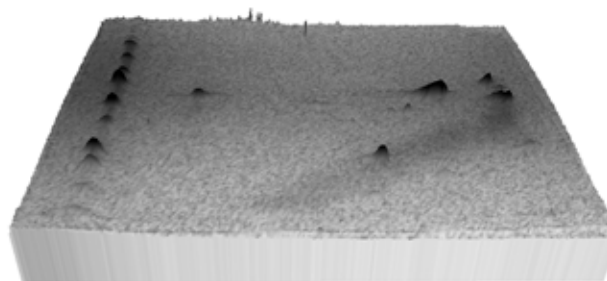
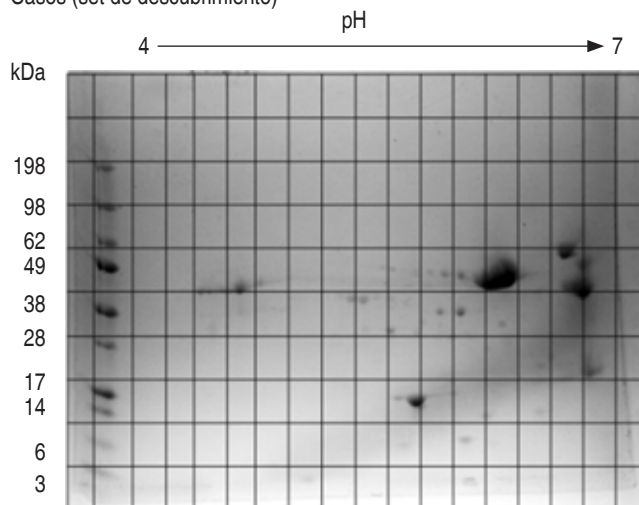


Figura 5: Set de descubrimiento para el grupo casos (pacientes con función estable del injerto), en 2 dimensiones, pH 4-7, con gel de gradiente 4-15%, en el eje del gradiente de pH obtenido posterior a análisis de isoelectroenfoque con bandas de 7 cm, rango de pH 4-7, IPGphor 3 de GE, y electroforesis con reconstrucción electrónica.

(pl: 5.03 y pM: 37900kDa) y factor IV de complemento (pl: 6.41, pM: 31kDa).

Con estos resultados (*Figura 5*), podemos observar que se ha seguido un patrón electroforético de separación adecuado, y que, al realizar un análisis visual, resulta representativo con lo reportado en la literatura y en las bases de datos de geles bidimensionales. Cabe destacar que llaman la atención proteínas como CXC 7 y la proteína AMBP² en el grupo con rechazo, y que, aunque han sido descritas en estudios previos, podrían representar moléculas de estudio para estudios posteriores.

Para este trabajo, el análisis de espectrometría de masas, el cual resulta adecuado para el análisis de la identificación experimental, no se ha realizado; sin embargo, las proteínas representativas presentan un patrón identificable en resultados de muestras públicas.

DISCUSIÓN

El trasplante renal es hoy en día el tratamiento preferido para la enfermedad renal crónica siendo éste el estándar de oro, el reto que la inmunología del trasplante representa para conservar el injerto renal es parte de la lucha diaria en la atención de los pacientes a pesar de las nuevas tecnologías en tema de inmunosupresión. En este estudio se busca abrir la puerta al desarrollo de nuevas formas de identificar, monitorizar y tratar a los pacientes trasplantados con la finalidad de evitar o prolongar el desarrollo de rechazo. El paciente con trasplante está sometido a intervenciones que pueden comprometer la integridad del trasplante; sin embargo, son indispensables para poder integrar un diagnóstico. Observamos que el desarrollo de trasplante es independiente de factores tales como la edad, sexo, uso de algún tipo de tratamiento de inducción a la inmunosupresión, al igual que el tratamiento de mantenimiento otorgado, tampoco encontramos diferencias significativas en el análisis de medias entre los casos con evolución estable del injerto y a los pacientes con diagnóstico de rechazo activo mediado por anticuerpos. Con este resultado, para las curvas de normalidad encontramos que no cumplen con los criterios y se decidió utilizar para el análisis estadístico mediana, moda y rango, sin encontrar significancia estadística para las variables demográficas, el análisis estadístico se realizó con SPSS versión 25 y STATA 14.0. Una vez obtenidos estos resultados, se tomaron las muestras de plasma de cinco casos de ambos grupos para realizar un análisis de proteínas mediante proteómica clásica.

Para este análisis, se realizaron pruebas de integridad de proteínas, en donde encontramos que el contenido proteico de cada grupo fue suficiente para el análisis en geles de una dimensión, esto con la finalidad de tener material proteico suficiente para realizar pruebas más específicas. Una vez analizadas las muestras en cuanto a su integridad, se decidió hacer un set de descubrimiento con el grupo de rechazo y un set de descubrimiento con el grupo sin rechazo, esto se realizó analizando las proteínas de ambos grupos en geles bidimensionales obteniendo resultados alentadores, pues pudimos observar que existen proteínas diferenciales en ambas muestras de los pacientes, que si bien no necesariamente son de bajo peso molecular, podrían fungir como marcadores moleculares en las etapas siguientes del análisis de muestras. Por mencionar dos en particular, y

que corresponden a lo reportado en la literatura, la citocina proinflamatoria CXC 7 y la proteína AMBP, las cuales se intensifican en los casos que presentan datos histopatológicos de rechazo, otras proteínas de alta abundancia como inmunoglobulinas, haptoglobinas, apolipoproteínas, alfa 1 antitripsina se representan en ambas poblaciones de estudio, lo que nos permite aseverar que las muestras tomadas, analizadas y cuantificadas son realmente representativas del tejido estudiado.²

Es importante reconocer que el proceso de búsqueda de biomarcadores es el resultado de la selección, transporte, procesamiento y análisis estricto y sistemático de las muestras obtenidas. Para esto se ha establecido una ruta precisa en cada una de las etapas, mediante la sistematización de los procesos, lo que permitirá replicar el análisis cuantas veces sea necesario sin tener pérdidas en ninguna de las etapas del estudio.

Como bien sabemos, éste es el paso inicial de un estudio de descubrimiento en el que, con la acumulación de más sujetos de estudio y el continuo análisis, se lograrán establecer las condiciones específicas para detectar patrones o moléculas proteicas que en un segundo momento deberán ser analizadas mediante cromatografía de masas de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas. Proceso que indudablemente deberá realizarse una vez que hayamos obtenido resultados normales en las pruebas que se realizan actualmente y se analicen los resultados para la optimización de recursos.

CONCLUSIONES

Se requiere de un análisis por espectrometría de masas para identificar proteínas diferenciales; sin embargo, en este estudio podemos concluir que existen diferencias potenciales entre los grupos de estudio en cuanto a características proteicas. Este estudio corresponde a la fase inicial de un protocolo de búsqueda de biomarcadores moleculares, tomando en cuenta que la sistematización y estandarización de cada fase de este estudio nos acercará a obtener resultados alentadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Plattner BW, Chen P, Cross R, Leavitt MA, Killen PD, Heung M. Complications and adequacy of transplant kidney biopsies: A comparison of techniques. *J Vasc Access*. 2018; 19 (3): 291-296.

2. Quaglia M, Merlotti G, Guglielmetti G, Castellano G, Cantaluppi V. Recent advances on biomarkers of early and late kidney graft dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (15): 5404.
3. Van Loon E, Naesens M. Blood transcriptomics as non-invasive marker for kidney transplant rejection. *Nephrol Ther.* 2021; 17: S78-S82.
4. Parajuli S, Swanson KJ, Alstott J, Aziz F, Garg N, Zhong W et al. Transplant kidney biopsy for proteinuria with stable creatinine: findings and outcomes. *Clin Transplant.* 2021; 35 (10): e14436.
5. Michon A, Durrbach A, Gautier JC, Benain X, Lunven C, Jagerschmidt A, et al. Investigation of new biomarkers of kidney injury in renal transplant recipients undergoing graft biopsy. *Clin Transplant.* 2021; 35 (9): e14408.
6. Patel MD, Young SW, Scott Kriegshauser J, Dahiya N. Ultrasound-guided renal transplant biopsy: practical and pragmatic considerations. *Abdom Radiol (NY).* 2018; 43(10): 2597-2603.
7. Peters B, Molne J, Hadimeri H, Hadimeri U, Stegmayr B. Sixteen Gauge biopsy needles are better and safer than 18 Gauge in native and transplant kidney biopsies. *Acta Radiol.* 2017; 58 (2): 240-248.
8. Aldrete-Velasco JA, Chiquete E, Rodríguez-García JA, Rincón-Pedrero R, Correa-Rotter R, Peña-García R et al. Chronic kidney disease mortality and its relation to diabetes in Mexico. *Med Int Mex.* 2018; 34 (4): 536-550.
9. Alachkar N. Serum and urinary biomarkers in acute kidney transplant rejection. *Nephrol Ther.* 2012; 8 (1): 13-19.
10. Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, Del Favero J, Bosmans JL, Claas FHH et al. Cell-Free DNA: an upcoming biomarker in transplantation. *Am J Transplant.* 2015; 15 (10): 2541-2551.
11. Kwek JL, Tey V, Yang L, Kanagalingam D, Kee T. Renal and obstetric outcomes in pregnancy after kidney transplantation: Twelve-year experience in a Singapore transplant center. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015; 41 (9): 1337-1344.
12. Jacquemont L, Souillou JP, Degauque N. Blood biomarkers of kidney transplant rejection, an endless search? *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17 (7): 687-697.
13. Bohmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int.* 2019; 32 (8): 775-788.
14. Singh N, Samant H, Hawxby A, Samaniego MD. Biomarkers of rejection in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2019; 24 (1): 103-110.
15. Mortensen LA, Svane AM, Burton M, Bistrup C, Thieson HC, Marcussen N et al. Proteomic analysis of renal biomarkers of kidney allograft fibrosis-a study in renal transplant patients. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (7): 2371.
16. Sakai K, Oguchi H, Muramatsu M, Shishido S. Protocol graft biopsy in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton).* 2018; 23 Suppl 2: 38-44.
17. 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. *Am J Transplant.* 2012; 12 (2): 388-399.
18. Cooper JE. Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020; 15 (3): 430-438.
19. Bloom RD, Augustine JJ. Beyond the biopsy: monitoring immune status in kidney recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021; 16 (9): 1413-1422.
20. Goldberg RJ, Weng FL, Kandula P. Acute and chronic allograft dysfunction in kidney transplant recipients. *Med Clin North Am.* 2016; 100 (3): 487-503.
21. Williams WW, Taheri D, Tolkoff-Rubin N, Colvin RB. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol.* 2012; 8 (2): 110-121.
22. 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. *Am J Transplant.* 2008; 8 (4): 753-760.
23. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, Gwinner W, Marquet P. Establishing biomarkers in transplant medicine: a critical review of current approaches. *Transplantation.* 2016; 100 (10): 2024-2038.
24. 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. *Am J Transplant.* 2013; 13 (10): 2634-244.
25. Faddoul G, Nadkarni GN, Bridges ND, Goebel J, Hricik DE, Formica R et al. Analysis of biomarkers within the initial 2 years posttransplant and 5-year kidney transplant outcomes: results from clinical trials in organ transplantation-17. *Transplantation.* 2018; 102 (4): 673-680.
26. Mockler C, Sharma A, Gibson IW, Gao A, Wong A, Ho J et al. The prognostic value of urinary chemokines at 6 months after pediatric kidney transplantation. *Pediatric Transplantation.* 2018; 22 (5): e13205.
27. Xu CX, Shi BY, Jin ZK, Hao JJ, Duan WL, Han F et al. Multiple-biomarkers provide powerful prediction of early acute renal allograft rejection by combination of serum fractalkine, IFN- γ and IP-10. *Transpl Immunol.* 2018; 50: 68-74.
28. Chen D, Zhang J, Peng W, Weng C, Chen J. Urinary C-X-C motif chemokine 13 is a noninvasive biomarker of antibody-mediated renal allograft rejection. *Mol Med Rep.* 2018; 18 (2): 2399-2406.
29. Nielsen MB, Krogstrup NV, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Oltean M, Dor FJMF, Jespersen B et al. P-NGAL Day 1 predicts early but not one year graft function following deceased donor kidney transplantation-The CONTEXT study. *PLoS One.* 2019; 14 (2): e0212676.
30. De Holanda MI, Matuck T, de Carvalho DDBM, Domingues EMFL, Curvo R, Glasberg DS et al. Soluble CD30, acute rejection, and graft survival: pre- and 6-month post-transplant determinations-when is the best time to measure? *Transplant Proc.* 2018; 50 (3): 728-736.
31. Landsberg A, Sharma A, Gibson IW, Rush D, Wishart DS, Blydt-Hansen TD. Non-invasive staging of chronic kidney allograft damage using urine metabolomic profiling. *Pediatr Transplant.* 2018; 22 (5): e13226.
32. Oellerich M, Sherwood K, Keown P, Schütz E, Beck J, Stegbauer J et al. Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat Rev Nephrol.* 2021; 17 (9): 591-603.
33. O'Callaghan JM, Knight SR. Noninvasive biomarkers in monitoring kidney allograft health. *Curr Opin Organ Transplant.* 2019; 24 (4): 411-415.
34. Meng H, Liang Y, Hao J, Lu J. Comparison of rejection-specific genes in peripheral blood and allograft biopsy from kidney transplant. *Transplant Proc.* 2018; 50 (1): 115-123.
35. Marsh CL, Kurian SM, Rice JC, Whisenant TC, David J, Rose S et al. Application of TruGraf v1: A novel molecular biomarker for managing kidney transplant recipients with stable renal function. *Transplant Proc.* 2019; 51 (3): 722-728. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.01.054>
36. Crespo E, Roedder S, Sigdel T, Hsieh SC, Luque S, Cruzado JM et al. Molecular & functional noninvasive immune monitoring

in the ESCAPE study for prediction of subclinical renal allograft rejection. *Transplantation*. 2017; 101 (6): 1400-1409.

37. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med*. 2014; 11 (11): e1001759.
38. Van Baardwijk M, Cristoferi I, Ju J, Varol H, Minnee RC, Reinders MEJ et al. A decentralized kidney transplant biopsy classifier for transplant rejection developed using genes of the Banff-Human organ transplant panel. *Front Immunol*. 2022; 13:

841519. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.841519/full>

Correspondencia:

Dr. Josué Israel Olivares-del Moral
Centenario Hospital Miguel Hidalgo
Av. Manuel Gómez Morín S/N,
Alameda, 20259, Aguascalientes, Ags.
E-mail: jiolivaresdelmoral@gmail.com

www.medigraphic.org.mx